

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA



**MONITORAMENTO DE CISTOS DE *Giardia* spp. e OOCISTOS DE *Cryptosporidium* spp. EM UM MANANCIAL EUTROFIZADO COM PRESENÇA DE FLORAÇÕES DE CIANOBACTÉRIAS: REPRESA DE SALTO GRANDE, AMERICANA-SP**

Sandra Yamashiro

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Regina Maura Bueno Franco

Co-orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Romeu Cantusio Neto

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
*Sandra Yamashiro*  
*Regina Maura Franco*  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese de mestrado apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Parasitologia

CAMPINAS  
2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

<b>Y14m</b>	<p>Yamashiro, Sandra Monitoramento de cistos de <i>Giardia</i> spp. e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. em um manancial eutrofizado com presença de florações de cianobactérias: Represa de Salto Grande, Americana-SP / Sandra Yamashiro. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.</p> <p>Orientadores: Regina Maura Bueno Franco, Romeu Cantusio Neto. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Salto Grande, Reservatório de – Americana (SP). 2. Atibaia, Rio (SP). 3. Filtração. 4. <i>Giardia</i>. 5. <i>Cryptosporidium</i>. I. Franco, Regina Maura Bueno, 1958-. II. Cantusio Neto, Romeu. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">(rcdt/ib)</p>
-------------	---

**Título em inglês:** Monitoring of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in an eutrophic watershed with presence of cyanobacteria blooms: Salto Grande Reservoir, Americana-SP.

**Palavras-chave em inglês:** Salto Grande, Reservoir – Americana (SP, Brazil); Atibaia, River - (SP, Brazil); Filtration; *Giardia*.; *Cryptosporidium*.

**Área de concentração:** Parasitologia.

**Titulação:** Mestre em Parasitologia.

**Banca examinadora:** Regina Maura Bueno Franco, Marlene Tiduko Ueta, Luiz Antônio Daniel.

**Data da defesa:** 11/02/2010.

**Programa de Pós-Graduação:** Parasitologia.

Campinas, 11 de fevereiro de 2010.

BANCA EXAMINADORA

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Regina Maura Bueno Franco (Orientadora)

  
Assinatura

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Marlene Tiduko Ueta

  
Assinatura

Prof. Dr. Luiz Antonio Daniel

  
Assinatura

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Arício Xavier Linhares

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares

\_\_\_\_\_  
Assinatura

## **Agradecimentos**

A Deus por me dar paciência e dedicação para a execução deste trabalho;

Aos meus pais Tadashi e Amélia, que sempre me apoiaram financeiramente e com mensagens de otimismo e esperança ao longo dos meus anos de estudo;

À minha irmã Miriam que sempre esteve no meu lado, com paciência e me aconselhando nos momentos difíceis;

Aos meus amigos, Diego, Juliane, Nilson, Maurício, Solange, Luciana, Júlia, Lidi, pela amizade e colaborações no estudo.

À professora e orientadora Regina Maura Bueno Franco a quem eu respeito, pela enorme dedicação, paciência e por me ensinar a agir e me posicionar com dignidade e confiança.

Aos funcionários do laboratório de microbiologia e físico-químico da SANASA e a Romeu Cantusio Neto pela co-orientação que colaboraram com as análises microbiológicas e físico-químicas.

Ao Prof Dr Arício Xavier Linhares, pelo auxílio e dedicação na análise estatística.

Aos professores membros da pré-banca Prof. Arício Xavier, Prof<sup>a</sup> Selma Giorgio e Dr<sup>a</sup> Livia Agujaro pelas críticas e sugestões para o aperfeiçoamento e enriquecimento deste trabalho.

Ao Barco Escola da Natureza pela enorme colaboração, carinho e atenção durante as coletas na represa de Salto Grande.

À CAPES, pela concessão de bolsa de estudo.

## Resumo

O reservatório de Salto Grande é formado pelo rio Atibaia que contribui para a poluição das águas superficiais desta represa, devido ao despejo de efluentes domésticos. Além disso, o desenvolvimento urbano, a industrialização e atividade agrícola nas proximidades da represa, também proporcionam alteração da qualidade das águas deste manancial. Os protozoários gastrointestinais, *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. estão amplamente presentes em ambiente aquático e suas formas infectantes, cistos e oocistos, são resistentes às condições ambientais (temperatura, radiação solar) e ao processo de desinfecção da água (principalmente à cloração). Inúmeros surtos de gastroenterite foram causados por estes organismos devido à veiculação hídrica sendo que estes protozoários patogênicos tornaram-se uma preocupação constante para os sistemas produtores de água. Os objetivos desta pesquisa foram: verificar a ocorrência de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. nas águas superficiais em quatro locais da represa de Salto Grande (Ponto 1: Mini-Pantanal, Ponto 2: Saltinho, Ponto 3: Praia Azul e Ponto 4: late Clube) com periodicidade mensal (12 meses); avaliar a qualidade da água mediante análise microbiológica e físico-química deste manancial; comparar a ocorrência destes protozoários nos diferentes pontos (1, 2, 3 e 4); verificar a correlação entre *Giardia*, *Cryptosporidium* e os parâmetros analisados; verificar a aplicabilidade do método de filtração em membrana para detecção dos protozoários em um manancial eutrofizado; comparar qualitativamente dois kits comerciais de anticorpos monoclonais para detecção destes agentes parasitários. Para os ensaios parasitológicos, foi empregada a técnica de filtração em membrana de acordo com Franco et al (2001) e visualização mediante reação de imunofluorescência direta com anticorpos monoclonais comerciais; 2) para os ensaios microbiológicos visando a detecção de coliformes totais, termotolerantes e/ou *Escherichia coli* utilizando as técnicas de tubos múltiplos de acordo com os procedimentos descritos no "Standard Methods" (APHA,AWWA,WEF 2005) e; 3) a contagem de células de cianobactérias foi feita por sedimentação em câmara de Utermöhl, e utilização de microscópio invertido e retículo de Whipple (CETESB, Normalização técnica-NT-06.L5.303,2005). A análise estatística foi realizada com o emprego das técnicas de Análise de Variância, Teste de Comparação Múltipla de Médias (Teste de Duncan), Teste de Qui-Quadrado, Correlação de Pearson com o objetivo de comparar a positividade para os protozoários nos diferentes pontos de coleta e verificar a existência de correlação entre parâmetros biológicos, físico-químicos e parasitológicos das amostras de água do reservatório. De janeiro a dezembro de 2008, 48 amostras de água foram colhidas. Nos pontos 1 e 2, cistos de *Giardia* foram detectados em 16,6% (326 cistos/L) e 41,6% (785 cysts/L) das amostras, respectivamente. Oocistos de *Cryptosporidium* foram detectados somente no ponto 2, em 8,3% das amostras (170 cistos/L) enquanto nos pontos 3 e 4 não foram encontrados. A técnica de filtração em membranas apresentou eficiência de recuperação de 8,2% a 34,1% para cistos de *Giardia* e 5,3% a 8,3% para oocistos de *Cryptosporidium* (pontos 1 e 2) e para os pontos 3 e 4, as recuperações foram de 42,6% a 88,6% para cistos e 31,9% a 87,5% para oocistos. A separação imunomagnética não resultou em recuperação dos protozoários nas amostras de água que apresentaram floração de cianobactérias (pontos 3 e 4). Nas amostras de água dos pontos 1, 3 e 4,

não foram encontradas correlações entre os protozoários e coliformes enquanto no ponto 2, houve correlação entre cistos de *Giardia*, coliformes termotolerantes e *E.coli*.

Palavras-chave: Reservatório de Salto Grande, rio Atibaia, manancial eutrofizado, filtração, *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp.

## Abstract

The Salto Grande Reservoir is formed by the Atibaia River, that contributes to the pollution of this superficial water reservoir due to the discharge of domestic effluents. In addition, urban development, industrialization, and agricultural activity in the vicinity of the dam also cause degradation in water quality of this watershed. The gastrointestinal pathogenic protozoa *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp are ubiquitous in aquatic environments and their infectious forms, cysts and oocysts, are resistant against environmental conditions (temperature, solar radiation) and water disinfection process (chlorination). Numerous outbreaks of gastroenteritis have been caused by these organisms due to waterborne transmission, and these parasitic protozoa have become a permanent concern in water treatment plants. The aims of this study were: to investigate the occurrence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in superficial water samples of 4 sites of Salto Grande Reservoir (Point 1: Mini-Pantanal, Point 2: Saltinho, Point 3: Praia Azul and Point 4: late Clube) in 12 month period; to assess water quality by microbiological and physical-chemical analysis of water samples from 4 points of this reservoir; to compare the occurrence of these protozoa in different points (1, 2, 3 and 4); to verify the correlation among *Giardia*, *Cryptosporidium* and the analyzed parameters; to examine the applicability of the membrane filtration technique for the detection of protozoa in an eutrophic watershed; to qualitatively compare two commercial kits of monoclonal antibodies for detecting these parasites. For parasitological assays, the membrane filter technique according to Franco et al (2001) was employed following visualization by direct immunofluorescence assay (IFA) with commercial monoclonal antibody for enumerating cysts and oocysts in various samples; 2) for microbiological tests aiming the detection of total coliforms, thermotolerant and/or *E.coli*, the techniques of multiple tubes were used according to the procedures described in "Standard Methods" (APHA, AWWA, WEF, 2005) and 3) cyanobacteria cells counting was performed with Uttermohl Chamber and inverted microscopy and Whipple Grid (CETESB, Normalização técnica-NT-06.L5.303, 2005). Statistical analysis was performed using Analysis of Variance, Multiple Comparisons Test (Duncan's test), Chi-square Test and Pearson Correlation, in order to compare the occurrence of protozoa in different points, and to verify the presence of correlation among biological parameters, physical-chemical, and the presence of parasitic protozoa in water samples from the reservoir. From January to December in 2008, 48 water samples were collected. In points 1 and 2 (Mini-Pantanal e Saltinho), *Giardia* cysts were detected in 16,6% (326 cistos/L) and 41,6% (785 cysts/L) of the samples, respectively. *Cryptosporidium* oocysts were detected only in point 2 (Saltinho) in 8,3% (170 oocysts/L) of the samples, while in the others points (3 e 4), both parasites were not detected. The membrane filtration technique attained recovery efficiency range of 8,22% to 34,18% for *Giardia* cysts and 5,3% to 8,3% *Cryptosporidium* oocysts (points 1 and 2) and for points 3 and 4, the recoveries efficiency were 42,63% to 88,66% for cysts and 31,97% to 87,5% for oocysts. The immunomagnetic separation did not result in recovering of protozoa in water samples with cyanobacteria blooms (points 3 and 4). In water samples from points 1, 3, and 4, no correlations were found between parasites concentration and coliforms. Water samples from point 2, in contrast, had correlation among *Giardia* cysts, thermotolerant coliforms, and *E.coli*.

Key-words: Salto Grande Reservoir, Atibaia river, eutrophic watershed, filtration, *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp.

## Lista de figuras

Figura 1	Mapa da Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos 5 (UGRH 5)- Piracicaba, Capivari, Jundiá.....	10
Figura 2	Mapa do Reservatório de Salto Grande da cidade de Americana-SP.....	10
Figura 3	Modelo esquemático dos processos hidrodinâmicos que influenciam na sobrevivência e transporte de patógenos em uma represa.....	44
Figura 4	Localização dos pontos de coleta nos compartimentos do reservatório de Salto Grande, Americana-SP.....	56
Figura 5	Ponto 1: Mini-Pantanal.....	57
Figura 6	Ponto 2: Saltinho.....	57
Figura 7	Ponto 3: Praia Azul.....	57
Figura 8	Ponto 4: Iate Clube.....	57
Figura 9	Floração de Cianobactérias dos pontos 3 e 4.....	57
Figura 10	Filtração em membranas das amostras de água superficial dos pontos 1, 2, 3 e 4.....	59
Figura 11	Foto da microesfera paramagnética.....	62
Figura 12	Cisto de <i>Giardia</i> sp na amostra de água superficial do ponto 2 da represa de Salto Grande, Americana-SP no mês de março.....	79
Figura 13	Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> sp na amostra de água superficial do ponto 2 da represa de Salto Grande, Americana-SP no mês de maio....	79

Figura 14	Cianobactérias na amostra de água superficial do ponto 3 da represa de Salto Grande, Americana-SP no mês de fevereiro.....	79
Figura 15	Gráfico Box-Plot da distribuição dos valores de pH das amostras de água superficial dos pontos de coleta (1, 2, 3 e 4) da represa Salto Grande, Americana-SP.....	92
Figura 16	Presença de bovinos nas margens da região do ponto 2.....	123
Figura 17	Presença de porcos nas margens da região do ponto 2 .....	123
Figura 18	Floração de cianobactérias nos pontos 3 e 4.....	124
Figura 19	Macrófitas aquáticas nos pontos 3 e 4.....	124
Figura 20	Pescadores na região da Praia Azul.....	124
Figura 21	Peixe morto no reservatório de Salto Grande.....	124
Figura 22	Placa de “Proibido entrar na água” na Praia Azul (Ponto 3).....	125
Figura 23	Crianças se banhando na Praia Azul.....	125
Figura 24	Prática de esporte náutico (Jet-sky) no reservatório de Salto Grande....	125
Figura 25	Prancha 1. Aspectos de cistos e oocistos corados com Merifluor® e Crypto/Giardia-Cel® .....	126
Figura 26	Prancha 2. Organismos interferentes encontrados nas amostras de água superficial dos pontos 3 e 4.....	127

## Lista de tabelas

Tabela 1	Assembleias e espécies do gênero <i>Giardia</i> spp.....	26
Tabela 2	Espécies do gênero <i>Cryptosporidium</i> spp (Fayer, 2009; Fayer e Santin 2009).....	33
Tabela 3	Características de <i>Giardia</i> spp e <i>Cryptosporidium</i> spp que favorecem a transmissão por veiculação hídrica e alimentar.....	35
Tabela 4	Valores mensais e médias aritméticas dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos referentes às amostras de água bruta superficial do ponto 1, da represa de Salto Grande, Americana-SP.....	70
Tabela 5	Valores mensais e médias aritméticas dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos referentes às amostras de água bruta superficial do ponto 2, da represa de Salto Grande, Americana-SP.....	72
Tabela 6	Valores mensais e médias aritméticas dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos referentes às amostras de água bruta superficial do ponto 3, da represa de Salto Grande, Americana-SP.....	74
Tabela 7	Valores mensais e médias aritméticas dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos referentes às amostras de água bruta superficial do ponto 4, da represa de Salto Grande, Americana-SP.....	76
Tabela 8	Concentração de cistos de <i>Giardia</i> spp. e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. por litro de amostra de água bruta do reservatório de Salto Grande nos diferentes pontos de coleta, no período de janeiro a dezembro de 2008 (Merifluor®).....	78
Tabela 9	Eficiência de recuperação de cistos de <i>Giardia</i> spp e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp nos ensaios-controle da amostra de água do ponto 2 do reservatório de Salto Grande, utilizando a técnica de filtração em membrana e visualização dos protozoários com anticorpos monoclonais (Merifluor®).....	81
Tabela 10	Eficiência de recuperação de cistos de <i>Giardia</i> spp e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp nos ensaios-controle positivos de amostra de água superficial dos pontos 1, 3 e 4 (n=1) da represa de Salto Grande, utilizando a técnica de filtração em membrana e visualização com anticorpos monoclonais (Merifluor®).....	82

Tabela 11	Eficiência de recuperação de oocistos e cistos nos ensaios-controle positivos de amostra de água superficial dos pontos 1, 2, 3 e 4 (n=1) da represa de Salto Grande, utilizando a filtração em membrana, emprego da etapa de separação imunomagnética (IMS) e visualização com anticorpos monoclonais (Merifluor®).....	84
Tabela 12	Valores de ANOVA (teste <i>F</i> ) e probabilidade ( <i>P</i> ) entre os pontos de coleta (P1, P2, P3, P4) e estações do ano parâmetros físico-químicos (cor, turbidez e temperatura) das amostras de água superficial da represa de Salto Grande, Americana-SP.....	86
Tabela 13	Valores de ANOVA (teste <i>F</i> ) e probabilidade ( <i>P</i> ) entre os pontos de coleta (P1, P2, P3, P4) e estações do ano em relação aos parâmetros biológicos (cistos, oocistos, coliformes totais, coliformes termotolerantes, <i>E.coli</i> e cianobactérias) das amostras de água superficial da represa de Salto Grande, Americana-SP.....	87
Tabela 14	Valores de ANOVA (teste <i>F</i> ) e probabilidade ( <i>P</i> ) entre os ambientes lótico (P1 e P2) e lêntico (P3 e P4), meses do ano e densidade de cistos e oocistos das amostras de água superficial da represa de Salto Grande, Americana-SP.....	88
Tabela 15	Comparação múltipla de médias entre os parâmetros físico-químicos (cor, turbidez e temperatura) comparados entre os pontos de coleta (P1, P2, P3 e P4) de água superficial da represa de Salto Grande, Americana-SP.....	90
Tabela 16	Comparação múltipla de médias para os parâmetros físico-químicos comparados entre as estações do ano (primavera, verão, outono e inverno), das amostras de água superficial da represa de Salto Grande, Americana-SP.....	91
Tabela 17	Comparação múltipla de médias dos parâmetros biológicos (cistos, oocistos, coliformes termotolerantes, totais, <i>E.coli</i> e cianobactérias) comparados entre os pontos de coleta (P1, P2, P3 e P4) da represa de Salto Grande.....	95
Tabela 18	Comparação múltipla de médias para os parâmetros biológicos comparados entre as estações do ano (primavera, verão, outono e inverno), das amostras de água superficial dos pontos de coleta P1, P2, P3 e P4 da represa de Salto Grande.....	96
Tabela 19	Comparação múltipla de médias das densidades de cistos e oocistos comparados entre os ambientes lótico (P1 e P2) e lêntico (P3 e P4), das amostras de água superficial da represa de Salto Grande.....	97

Tabela 20	Comparação múltipla de médias das densidades de cistos e oocistos comparados entre os meses do ano das amostras de água superficial da represa de Salto Grande.....	98
Tabela 21	Freqüências observadas de cistos de <i>Giardia</i> dos pontos de coleta (1 e 2) nas estações do ano, em amostras de água superficial da represa de Salto Grande, Americana-SP.....	99
Tabela 22	Freqüências observadas de cianobactérias dos pontos de coleta (3 e 4) nas estações do ano, em amostras de água superficial da represa de Salto Grande, Americana-SP.....	99
Tabela 23	Matriz da Correlação linear de Pearson ( <i>r</i> ) dos parâmetros físico-químicos e biológicos das amostras de água superficial do ponto de coleta 1 (Mini-Pantanal) da represa de Salto Grande, Americana-SP.....	101
Tabela 24	Matriz da Correlação linear de Pearson ( <i>r</i> ) dos parâmetros físico-químicos e biológicos das amostras de água superficial do ponto de coleta 2 (Saltinho) da represa de Salto Grande, Americana-SP.....	102
Tabela 25	Matriz da Correlação linear de Pearson ( <i>r</i> ) dos parâmetros físico-químicos e biológicos das amostras de água superficial do ponto de coleta 3 (Praia Azul) da represa de Salto Grande, Americana-SP.....	103
Tabela 26	Matriz da Correlação linear de Pearson ( <i>r</i> ) dos parâmetros físico-químicos e biológicos das amostras de água superficial do ponto de coleta 4 (Iate Clube) da represa de Salto Grande, Americana-SP.....	104
Tabela 27	Parâmetros considerados na avaliação qualitativa dos kits comerciais de anticorpos monoclonais empregados na detecção de cistos e oocistos nas amostras de água da represa de Salto Grande, Americana-SP e <i>score</i> de pontuação.....	105

## SUMÁRIO

Resumo.....	v
Abstract.....	Vii
Lista de figuras.....	ix
Lista de tabelas.....	xi
1. Introdução.....	1
2. Revisão de literatura.....	11
2.1 Doenças de veiculação hídrica.....	11
2.2 Ocorrência de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. e cistos de <i>Giardia</i> spp. em águas superficiais de rios.....	16
2.3 Ocorrência de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. e cistos de <i>Giardia</i> spp. em efluentes de esgoto.....	19
2.4 Ocorrência de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp e cistos de <i>Giardia</i> em águas superficiais de lagos e represas.....	21
2.5 <i>Giardia</i> spp.....	23
2.5.1. Espécies de <i>Giardia</i> spp.....	26
2.6 <i>Cryptosporidium</i> spp.....	27
2.6.1 Espécies de <i>Cryptosporidium</i> spp. ....	31
2.7 Aspectos epidemiológicos de <i>Giardia</i> spp. e <i>Cryptosporidium</i> spp. ....	34
2.8 Fatores que controlam a presença e sobrevivência de patógenos em lagos e represas. ....	36
2.9 Fatores que controlam o transporte e distribuição de patógenos em lagos e represas. ....	40
2.10 Métodos para avaliação de cistos de <i>Giardia</i> spp. e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp em água. ....	45
3. Objetivos.....	53
4. Material e Métodos.....	54
4.1 Caracterização do local de coleta.....	54
4.2 Análise das amostras de água.....	58
4.2.1 Coleta das amostras.....	58

4.2.2 Análise Microbiológica e Físico-Química das amostras de água.....	58
4.2.3 Análise de cianobactérias.....	59
4.2.4 Análise Parasitológica.....	59
4.2.4.1 Método de Filtração em Membrana.....	59
4.2.4.2 Detecção dos parasitos.....	60
4.2.4.2.1 Purificação dos protozoários mediante separação imunomagnética.....	61
4.2.4.3 Estimativa do número de cistos e oocistos presentes em um litro da amostra (Franco et al, 2001).....	63
4.2.4.4 Determinação da sensibilidade da Técnica de Filtração em Membranas.....	63
4.2.4.4.1 Ensaios-controle negativos.....	63
4.2.4.4.2 Ensaios-controle positivos.....	64
4.2.4.4.3 Determinação da sensibilidade da técnica (eficiência de recuperação).....	65
4.3 Análise Estatística.....	65
4.4 Comparação qualitativa dos kits comerciais de anticorpos monoclonais fluorescentes.....	66
5. Resultados.....	67
5.1 Caracterização dos pontos 1, 2, 3 e 4.....	68
5.1.1 Ponto 1: Mini-Pantanal.....	68
5.1.2 Ponto 2: Saltinho.....	71
5.1.3 Ponto 3: Praia Azul.....	73
5.1.4 Ponto 4: Iate Clube.....	75
5.2 Ocorrência de protozoários patogênicos dos pontos de coleta (1, 2, 3 e 4) de água superficial da represa Salto Grande.....	77
5.2.1 Estimativa da eficiência de recuperação de oocistos e cistos dos ensaios-controle positivos das amostras de água superficial do ponto de coleta 2 da represa de Salto Grande. ....	80
5.2.2 Sensibilidade da metodologia de filtração em membrana com separação imunomagnética. ....	83
5.3 Análise Estatística dos pontos de coleta (1, 2, 3 e 4) das amostras de água superficial da represa de Salto Grande.....	85
5.3.1 Análise de Variância (ANOVA).....	85

5.3.2 Comparação múltipla de médias (Teste de Duncan) dos parâmetros físico-químicos e gráfico Box-plot para valores de pH.....	89
5.3.3 Comparação múltipla de médias (Teste de Duncan) dos parâmetros biológicos.....	93
5.3.4 Teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) das freqüências de cistos, oocistos, cianobactérias, entre os pontos de coleta (P1, P2, P3 e P4) e estações do ano.....	99
5.3.5 Teste de Correlação de Pearson dos parâmetros físico-químicos e biológicos de cada ponto de coleta (1, 2, 3 e 4) de água superficial da represa de Salto Grande.....	100
6. Discussão.....	106
7. Conclusões.....	128
8. Referências bibliográficas.....	130
9. Anexos.....	155

## 1. INTRODUÇÃO

O volume total da água no planeta é de 1,4 bilhões de km<sup>3</sup>, sendo a maior parte constituída por água salgada (97,5%) e aproximadamente 2,5% de água doce. A água doce no planeta está na forma de geleiras ou calotas polares (70%), sendo que cerca de 29,7% apresenta-se como água subterrânea e somente 0,3% na forma de rios e lagos (UN-WATER STATISTICS, 2009a).

No Brasil, a disponibilidade hídrica corresponde a 12% dos recursos hídricos do planeta e a vazão média anual dos rios é de 180 mil m<sup>3</sup>/s. Considerando a entrada de rios estrangeiros em território brasileiro (região Amazônica com vazão de 86.321 m<sup>3</sup>/s; Uruguai com 878 m<sup>3</sup>/s e Paraguai, 595 m<sup>3</sup>/s), estas vazões contribuem para a vazão média total do país, com 267 mil m<sup>3</sup>/s, ou melhor, 18% da disponibilidade hídrica do planeta (ANA 2007).

A disponibilidade hídrica sempre esteve associada ao desenvolvimento humano, mas a qualidade e a quantidade da água são fatores que limitam o crescimento do homem, além de ser importante na manutenção do ecossistema e produção de alimentos (SALATI et al, 2002).

Quanto ao uso, a maior parte dos recursos hídricos empregados no Brasil é destinada para atividades produtivas, com destaque para a irrigação cuja utilização da água é de 46%. Nas regiões Sudeste e Sul, onde se encontram as maiores concentrações urbanas e industriais brasileiras, as deficiências encontradas são, sobretudo, de qualidade da água (ANA, 2007).

O uso da água vem aumentando duas vezes mais do que a taxa de crescimento da população neste século, apesar de ainda não caracterizar um panorama de escassez global, o número de regiões com déficit de água vem aumentando. A situação se agravará rapidamente em áreas de crescimento urbano onde o aumento da demanda de água torna crítica a exigência da qualidade da água (UN-WATER, 2006).

As atividades antrópicas como desmatamento da cobertura vegetal, a agricultura, a intensa urbanização e crescimento das indústrias contribuem de forma significativa

para a degradação dos mananciais e poluição dos recursos hídricos, afetando a qualidade da água (SALATI et al, 2002).

A capacidade dos corpos d'água em neutralizar os efeitos adversos causados pelas cargas poluentes de efluentes urbano, industrial e rural é limitada, desta forma a degradação da água é a maior causa da escassez hídrica (UN-WATER, 2006).

No Brasil, entre 2001 a 2007, o volume de efluentes industriais lançados nos rios, diminuiu de 4.190 m<sup>3</sup> para 1.890 m<sup>3</sup>/ t de produto fabricado, devido a uma política de reuso das indústrias químicas (ABIQUIM, 2008).

Os efluentes industriais contêm em sua composição os poluentes persistentes (metais potencialmente tóxicos), pesticidas, fármacos e hormônios, que são os chamados micropoluentes (MACDONALD et al, 2000; FENNER et al, 2005; BILA et al, 2007) nas concentrações de µg.l<sup>-1</sup> e ng.l<sup>-1</sup>, porém com grande potencial toxicológico (JOBILING et al, 1998; OHE et al, 2004).

Quanto à bacia PCJ (Piracicaba, Capivari e Jundiaí), a carga orgânica industrial lançada na sub-bacia do Rio Atibaia provém, em sua maior parte, dos municípios de Itatiba e Paulínia, responsáveis por quase 60% dos lançamentos industriais na sub-bacia (CBH-PCJ, 2008). A análise do sedimento feita por Cetesb (2009) constatou presença de metais como Pb, Cr, Cu, Ni e Zn em vários pontos de amostragem localizados no rio Atibaia e reservatório de Salto Grande.

Segundo o IBGE (2000), o país coleta diariamente 14,5 milhões de m<sup>3</sup> de esgoto, sendo que 5,1 milhões de m<sup>3</sup> são tratados. A região Sudeste apresenta a maior proporção de municípios com esgoto coletado e tratado (33,1%), seguido do Sul (21,7%), Nordeste (13,3%), Centro-Oeste (12,3%) e Norte (3,6%).

Em 2007, mais da metade dos domicílios brasileiros (51,5%) não dispunha de rede de coleta e tratamento de esgoto (TRATA BRASIL, 2007). Na cidade de Campinas, 80% do esgoto é tratado (SANASA, 2009) e no município de Americana, 85% (FGV, 2009). São despejados a cada dia, nos cursos d'água, 2 milhões de toneladas de esgoto no mundo (UN-WATER STATISTICS, 2009b).

Em virtude disto, as doenças de veiculação hídrica causadas por vírus, bactérias ou protozoários, apresentam grande relevância em saúde pública. Os principais agentes patogênicos de origem fecal, que são transmitidos pela ingestão de água

contaminada incluem: rotavírus, *Vibrio cholerae*, *Shigella* sp, *Escherichia coli* O157:H7 *Campylobacter* sp, *Giardia* sp, *Cryptosporidium* sp (WHO, 2005).

A diarreia é o principal sintoma gastrointestinal decorrente da ingestão destes patógenos (WHO, 2009). Aproximadamente 4 bilhões de casos de diarreia a cada ano, causam pelo menos 1,8 milhões de mortes, sendo que 90% afeta crianças com idade inferior a 5 anos, e nos países em desenvolvimento (UNICEF, 2008).

*Giardia* spp. é um protozoário flagelado pertencente ao Filo Sarcomastigophora, à classe Zoomastigophorea, à ordem Diplomonadida e à família Hexamitidae (LEVINE, 1980) e é considerado um dos mais antigos organismos eucarióticos existentes. Pode ser encontrado em animais domésticos, cães, gatos e em numerosos animais silvestres como mamíferos e pássaros. Porém sua patogenicidade só é reconhecida em humanos. No seu ciclo evolutivo, produz cistos que são resistentes às várias condições ambientais (temperatura, umidade, pH), facilitando a sua disseminação entre os animais, no ambiente e alimentos (LEVINE et al., 1990; THURMAN et al., 1998; HOQUE et al., 2002; LECLERC et al., 2002, CACCIÓ et al, 2005, THOMPSON et al, 2008, GIANGASPERO et al, 2009).

A contaminação de águas de consumo devido às descargas de esgoto tem contribuído para a maioria dos surtos de giardiose (JAKUBOWSKI AND CRAUN, 2002), e tem como origem, as atividades de agricultura e contaminação fecal de humanos e animais (HEITMAN et al. 2002, CACCIÓ et al, 2005. GIANGASPERO et al, 2009).

Em inquéritos parasitológicos realizados em Belo Horizonte e Salvador em 2008, a prevalência de crianças com *Giardia* sp foi de 9,5% e 13,5%, respectivamente (MENEZES et al, 2008; MATOS et al, 2008). No período de 2002 a 2003, em Botucatu, a prevalência de *Giardia* sp em crianças foi de 23,7% (2002) e 21,4% (2003) (MASCARINI et al, 2006).

Franco (1997) realizou um levantamento parasitológico e epidemiológico em 13 creches urbanas no município de Campinas. Os exames fecais revelaram 31 crianças (10,09%) com *G. duodenalis* (no total de 55 crianças com amostras fecais positivas para protozoários). Leal et al (2008) avaliaram a prevalência de protozooses intestinais em crianças que freqüentam uma creche urbana de Campinas. *Giardia duodenalis* foi o parasito mais identificado nos exames fecais com prevalência de 54,16%.

Outro protozoário patogênico que se destaca é o *Cryptosporidium* spp. que pertence ao Filo Apicomplexa, à classe Sporozoa (sub-classe Coccidiasina), à ordem Eucoocidiorida e à família Cryptosporidiidae (LEVINE, 1988).

Juntamente com *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. também tem causado inúmeros surtos de diarreia por veiculação hídrica devido a contaminação de águas de consumo, à resistência do oocisto às várias condições ambientais (temperatura, umidade, pH) e à cloração (FAYER et al, 2004).

Karanis et al (2007) registraram 325 surtos de veiculação hídrica causados por protozoários ao redor do mundo, nos últimos 25 anos. *Giardia* sp (40,6%) e *Cryptosporidium* sp (50,8%) foram responsáveis pela maioria destes surtos. O maior surto de criptosporidiose noticiado até o momento ocorreu em Milwaukee em 1993, atingindo 403.000 pessoas, devido à contaminação da água distribuída à população (MACKENZIE et al, 1994).

Em amostras clínicas, as pesquisas revelam prevalências de *Cryptosporidium* em crianças, de 15,5% a 3,7% de 2002 a 2003 em Botucatu (MASCARINI et al, 2006). As prevalências de *Cryptosporidium* em 2002 e 2006 foram 18,7% e 37% em Goiânia e Fortaleza, respectivamente (PEREIRA et al 2002; BUSHEN et al, 2007).

No levantamento parasitológico e epidemiológico realizado por Franco (1997) em 13 creches urbanas no município de Campinas, verificou-se que das 55 crianças parasitadas, 17 (5,53%) com *C. parvum* e 5 (1,62%) com outros protozoários intestinais, comensais ou patogênicos. Infecção concomitante envolvendo *G. duodenalis* e *C. parvum* foi observada em 2 crianças (0,65%). Oocistos de *Cryptosporidium* também foram identificados por Leal et al (2008) em 22,91% das amostras (9 por reação de imunofluorescência direta e 2 por Ziehl-Neelsen). A infecção concomitante por *Giardia duodenalis* e por espécies de *Cryptosporidium* foi verificada em 12,5% das amostras analisadas (n = 6 crianças).

Ambos os protozoários (*Giardia* e *Cryptosporidium*) apresentam em comum fatores epidemiológicos e biológicos que favorecem a disseminação destes agentes parasitários mediante o consumo de água: a ubiquidade de cistos e oocistos no ambiente aquático, a persistência no ambiente (seis meses em água a 20°C), a resistência aos desinfetantes comumente utilizados no tratamento de água para

abastecimento público e/ou para piscinas e baixa dose infectante que varia, dependendo da cepa, de 10 cistos ou menos e de nove a 1.042 oocistos (FAYER et al., 2000; ORTEGA e ADAM, 1997).

No Brasil, as pesquisas sobre a ocorrência dos protozoários *Giardia* e *Cryptosporidium* em águas superficiais começaram a ser desenvolvidas no final da década de 90; dados iniciais indicaram a presença de oocistos e cistos em águas superficiais, subterrâneas e em esgotos, especialmente em áreas metropolitanas e de alta concentração populacional (CANTUSIO NETO e FRANCO, 2004; HACHICH et al, 2004, FARIAS et al, 2002; FRANCO et al, 2001; GAMBA et al, 2000; MULLER, 2000; DIAS JÚNIOR, 1999; NEWMAN et al, 1993).

Cantusio Neto e Franco (2004) detectaram 32,8 cistos/L de *Giardia* spp. em 90% das amostras de água bruta do rio Atibaia enquanto que oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram encontrados por Franco et al (2001) com taxa de 54,1 oocistos/0,5L em amostras de água bruta do rio Atibaia.

A região metropolitana de Campinas faz parte da Unidade de gerenciamento de Recursos Hídricos 5 (UGRH 5), compreendendo mais de 11% da população do Estado e, de acordo com dados do Plano Estadual de Recursos Hídricos (2004-2007), 85% dos habitantes vivem em áreas urbanas (CETESB, 2008).

Nesta UGRH 5, são coletados 85% do total do esgoto produzido, enquanto o índice de tratamento é da ordem de 41% do esgoto gerado, segundo a CETESB, 2008. Esta região é destacada pelo parque industrial (telecomunicações, informática, petróleo, papel, celulose), usinas sucroalcooleiras, produtos têxtil e alimentício, além da agricultura (CETESB, 2008).

Os principais rios e reservatórios desta unidade são os rios Capivari, Capivari-Mirim, Jundiaí, Jundiaí-Mirim, Piraí, Atibaia, Corumbataí, Jaguari, Camanducaia e Piracicaba, reservatórios de Salto Grande (em Americana), Atibainha, Cachoeira e Jaguari (Fig. 1) (CETESB, 2008).

Segundo Cetesb (2009), a disponibilidade hídrica da UGRH 5 (que abriga a região metropolitana de Campinas), apresenta uma área de drenagem de 15.303 km<sup>2</sup>, com vazão média de 172 m<sup>3</sup>/s e vazão mínima de 43 m<sup>3</sup>/s. As sub-bacias dos rios Jaguari e Piracicaba apresentam as maiores disponibilidades hídricas, cada qual com

23% do total (vazões hídricas de 3.241 m<sup>3</sup>/s e 3.256 m<sup>3</sup>/s, respectivamente) (CBH- PCJ, 2008).

O reservatório de Salto Grande é formado pelo rio Atibaia e localiza-se na cidade de Americana-SP (Fig.2) (CBH-PCJ, 2008).

Segundo CETESB (2008), um dos trechos de cursos d'água considerado "ruim" ou "péssimo" quanto ao Índice de Qualidade de Água, está localizado na montante do reservatório de Salto Grande e jusante do município de Paulínia.

A construção deste reservatório ocorreu no período entre 1940 e 1949; sua função foi possibilitar o aproveitamento hidrelétrico pela Usina Hidroelétrica de Americana da Companhia Paulista de Força e Luz (CPFL). Além disso, contribui para a regularização da vazão do rio Piracicaba, além de ser importante para irrigação, piscicultura, recreação e abastecimento (DEBERDT, 1997; FONSECA, 2008). Nas décadas de 70 e 80 foi considerado um grande pólo turístico (ESPÍNDOLA et al, 2004a).

Na margem direita da represa de Salto Grande, há o predomínio da cultura de cana-de-açúcar e laranja, poucas áreas de remanescentes florestais como capoeira e mata ciliar. Na margem esquerda, estão as áreas urbanas da Praia Azul e Praia dos Namorados, casas de veraneio, late Clube, sítios, áreas de pastagem e agricultura (LEITE, 1998).

Segundo Rios (1999), o reservatório de Salto Grande funciona como um sistema de tratamento de efluentes retendo grande parte do material que chega do rio Atibaia melhorando a qualidade da água do Rio Piracicaba.

Em virtude da influência de processos de degradação da água (despejo de esgoto doméstico, industrial, agrícola) exercidos pelo homem, houve nos últimos anos, uma expressiva mudança da estrutura do ambiente físico, químico e biológico das bacias hidrográficas resultando em assoreamento, diminuição de diversidade de *habitats* e *micro-habitats* e eutrofização (GOULART e CALLISTO, 2003), como é o caso da represa de Salto Grande. A eutrofização das águas significa enriquecimento por nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, levando ao crescimento excessivo de plantas aquáticas (macrófitas e planctônicas), desequilíbrio e progressiva degradação da água em corpos lênticos (FIGUEIREDO et al, 2007). Este processo causa para o

ambiente aquático, a redução do oxigênio dissolvido, da biodiversidade aquática, morte de peixes e aumento da incidência de florações de cianobactérias (FUNASA, 2003).

As cianobactérias são microrganismos fotossintetizantes pertencentes ao domínio Bacteria. Por muito tempo foram consideradas como algas do domínio Eukaria por sintetizarem clorofila-a, sendo denominadas como cianofíceas ou algas verde-azuladas ("*blue green algae*"). Em 2001, foram incluídas no Filo Cyanobacteria do domínio Bacteria (BOONE et al, 2001).

As populações de cianobactérias quando em crescimento abundante no ambiente, podem ser detectadas por meio das mudanças de coloração da água com tons de verde azulado quando predominam "espumas" superficiais de *Microcystis* spp. (AGUJARO et al, 2008).

Estas florações ou "*blooms*" ocorrem devido as elevadas concentrações de nutrientes como nitrogênio e fósforo, temperaturas elevadas, luz adequada e condições estáveis da coluna d'água (AGUJARO et al, 2008).

Dependendo do gênero predominante numa floração de cianobactérias, a condição de serem potencialmente tóxicas deve ser considerada, pois algumas podem produzir toxinas, denominadas cianotoxinas. Estas são formadas por 3 grupos de substâncias químicas: os peptídeos cíclicos, alcalóides e lipopolissacarídeos (AGUJARO et al, 2008) e ainda podem ser divididas de acordo com o seu mecanismo tóxico nos vertebrados (CARMICHAEL et al, 2001): hepatotoxinas (microcistinas e nodularinas), neurotoxinas como alcalóides ou organofosforados (anatoxina-a, anatoxina-a(s) e saxitocinas), citoxinas (cilindrospermopsinas), dermatotoxinas (lyngbyatoxinas) e toxinas irritantes (lipopolissacarídeos).

Estudos no Brasil são crescentes e enfocam aspectos de qualidade da água e saúde pública por exposição ou ingestão destes organismos e suas toxinas (AGUJARO et al, 2008). No Brasil, o caso mais grave ocorreu em Caruarú, quando 60 pessoas submetidas à hemodiálise morreram por intoxicação hepática causada por toxina produzida por cianobactérias (JOCHIMSEN et al, 1998). Outro episódio relacionado às florações de cianobactérias no Brasil ocorreu na Bahia, na região de Paulo Afonso quando ocorreram 2.000 casos de gastroenterite resultando em 88 mortes (TEIXEIRA et al, 1993).

Devido ao potencial tóxico das cianotoxinas para os seres humanos, a Portaria nº 518/2004 ressalta a importância no controle e vigilância de cianobactérias em águas para consumo (AGUJARO et al, 2008).

TUCCI et al. (2004) realizaram uma síntese das dissertações e teses que abordaram a comunidade fitoplanctônica no reservatório Salto Grande, sendo que as cianobactérias compreenderam 61 táxons identificados com destaque para a elevada presença de espécies potencialmente tóxicas como *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis* spp., *Anabaena* spp. e *Cylindrospermopsis raciborski*.

Vários estudos foram realizados sobre a represa de Salto Grande envolvendo aspectos limnológicos, ecotoxicológicos e comunidades, tais como: Reservatório de Salto Grande: Uma Caracterização Geral do Sistema (ESPÍNDOLA, et al, 2004a); A Influência do Desenvolvimento Econômico e Industrial na Degradação da Qualidade da Água do Reservatório de Salto Grande (LOPES et al, 2004); Caracterização Limnológica do Reservatório de Salto Grande: Uma Análise Espacial e Temporal (ESPÍNDOLA et al, 2004b); Quantificação de Metais na Água do Reservatório de Salto Grande (LEITE et al, 2004). Entretanto, ainda não existem dados sobre a ocorrência dos protozoários patogênicos *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp em águas dessa represa.

Diante desse cenário, é interessante, do ponto de vista da Saúde Pública, investigar a ocorrência de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de águas deste reservatório, considerando que para a população da cidade de Americana, a represa serve de área de recreação para crianças, esportes náuticos e atividades de pesca e contribui para a regularização da vazão do rio Piracicaba.

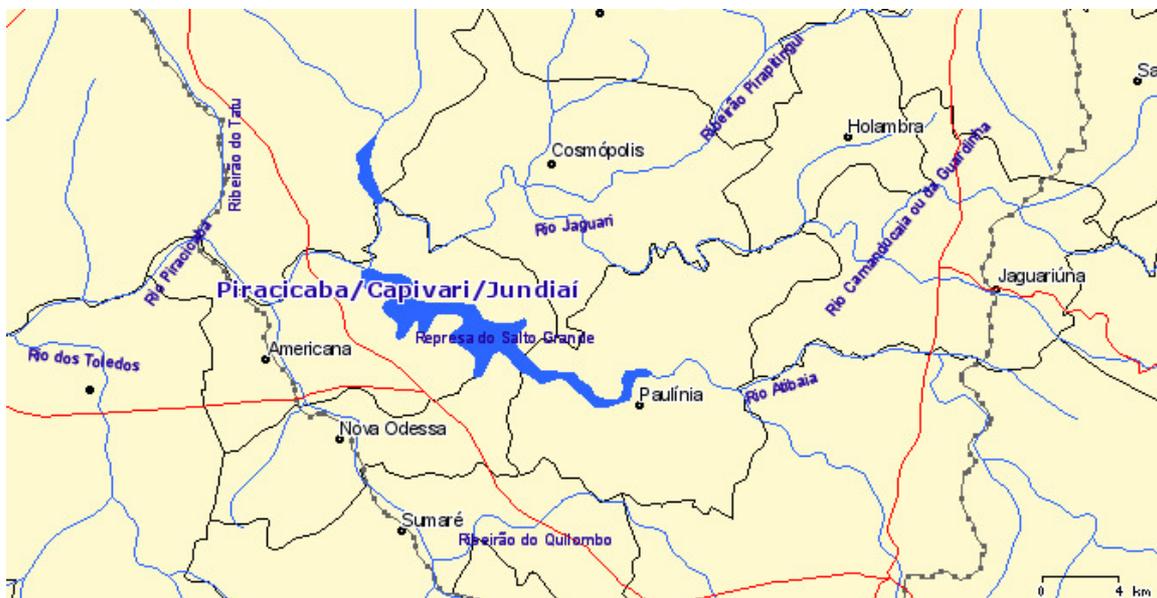
Além disso, há poucos dados no Brasil em relação à presença desses protozoários patogênicos em águas de reservatório, eutrofizadas e com constante presença de florações de cianobactérias, como ocorre na Represa de Salto Grande, objeto deste estudo. Rodgers et al (1995) verificaram reação cruzada de anticorpos monoclonais fluorescentes anti-*Crypto* e anti-*Giardia* com algas e cianobactérias o que pode gerar resultados falso-positivos para estes protozoários.

Esta investigação propõe verificar a ocorrência de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em diferentes pontos do reservatório de Salto Grande, utilizando a técnica de filtração em membranas de acordo com Franco et al. (2001).



Fonte: Departamento de Água e Esgoto de Americana (DAE)- Relatório de qualidade da água (2007).

Figura 1 - Mapa da Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos 5 (UGRH 5)- Piracicaba, Capivari, Jundiá.



Fonte: <http://www.rededasaguas.org.br>

Figura 2 - Mapa do Reservatório de Salto Grande da cidade de Americana-SP.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Doenças de veiculação hídrica**

As doenças de veiculação hídrica ocorrem em todo o mundo, não somente nos países em desenvolvimento, mas naqueles com elevado grau de saneamento básico e oferta de água tratada (KARANIS et al, 2007; KRAMER et al, 1996).

Desde 1984, ocorreram 325 surtos epidêmicos causados por protozoários patogênicos devido à contaminação da água. Alguns deles, mais expressivos, causaram grande prejuízo econômico devido ao custo das hospitalizações e medicação aos indivíduos infectados, como também proporcionaram inconfiabilidade na água de consumo e aos sistemas produtores de água (KARANIS et al, 2007).

Historicamente, os surtos de transmissão hídrica causados pelo protozoário *Cryptosporidium* spp., originadas da ingestão de água contaminada são mais reconhecidas do que àqueles originados pela ingestão acidental de águas de recreação (SMITH e NICHOLS, 2009).

Desde 1971, nos Estados Unidos, a Agência de Proteção Ambiental (United States Environmental Protection Agency-USEPA) e o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (Center for Diseases Control and Prevention-CDC) são órgãos que vigiam e relatam a ocorrência e origem das infecções de veiculação pela água contaminada (KRAMER et al, 1996).

Stein (2000) incluiu também como principal contaminante da água, as cianobactérias, devido à possibilidade de produção de cianotoxinas que podem ser prejudiciais ao sistema nervoso do homem, sendo que as anatoxinas-a, microcistina-LR e cilindrospermospina, estão entre os principais contaminantes químicos da água listados em Richardson (2009).

Desta forma, nos últimos 25 anos, as doenças de veiculação hídrica causadas pelos protozoários parasitas emergiram como um dos principais problemas de Saúde Pública, apesar de medidas de prevenção e avanços da tecnologia de tratamento de água, em países como Estados Unidos e Reino Unido (SMITH et al, 2006).

Ressalte-se que ocorreu uma efetiva redução nos patógenos entéricos bacterianos (SMITH et al, 2006) desde a introdução do processo de cloração como uma etapa obrigatória no tratamento de água.

Entre os protozoários, *Giardia* sp (40,6%) e *Cryptosporidium* sp (50,8%) foram responsáveis pela maioria destes surtos ao redor do mundo. *Entamoeba histolytica* e *Cyclospora cayetanensis* foram os agentes etiológicos incriminados em 9 (2,8%) e 6 (1,8%) surtos, e *Toxoplasma gondii* e *Cystoisospora belli* (= *I. belli*) ocasionaram 3 surtos cada (0,9%), enquanto 2 (0,6%) eventos foram devidos à veiculação hídrica de *Blastocystis hominis*. Outros agentes parasitários, como *Balantidium coli*, microsporídios, *Acanthamoeba* e *Naegleria fowleri* foram responsáveis por 1 surto, cada um deles contribuindo com 0,3% (KARANIS et al, 2007).

As principais fontes de contaminação por protozoários patogênicos em águas superficiais incluem: a descarga de esgotos não tratados e tratados (considerando que os processos de tratamento de esgotos não são capazes de alcançar 100% de remoção), a deposição de fezes animais em cursos d'água, o escoamento superficial do solo onde foram depositadas fezes de animais domésticos e silvestres (GRACZYK et al, 2000; SMITH E GRIMASON, 2003).

Para Xiao e Ryan (2006), a contaminação das águas de abastecimento pode ser resultado de inúmeras fontes como poluição industrial, chuvas, fezes de humanos e de animais, esgoto doméstico e rural e vazamento de sistemas sépticos.

Oocistos e cistos são frequentemente detectados em amostras de esgoto bruto ou tratado com concentrações variáveis: de  $10^2$  a  $10^4$  oocistos/L e  $10^3$  a  $10^5$  cistos/L e  $10^1$  a  $10^3$  oocistos/L e cistos/L, respectivamente (CARRARO et al, 2000). Santos et al (2004) detectaram altas concentrações de cistos de *Giardia* spp. ( $4,0 \times 10^4$  a  $1,2 \times 10^6$  cistos/L) e oocistos de *Cryptosporidium* spp. ( $4,4 \times 10^4$  a  $8,0 \times 10^4$ ) em amostras de lodo ativado de uma Estação de Tratamento de Esgoto de Campinas.

Estudos comparativos sobre os riscos de surtos epidêmicos de criptosporidiose por veiculação hídrica sugerem que o conhecimento da fonte de contaminação e ações promovendo alterações no tratamento, devam ser tomadas caso números maiores ou iguais à 3 a 30 oocistos ou cistos/ 100 litros de água tratada sejam encontrados, pois já indica risco de surto epidêmico (CARMENA et al, 2007).

Mesmo em países desenvolvidos onde o tratamento de esgoto é praticado com tecnologia sofisticada e é amplamente difundido, muitos surtos tiveram o esgoto doméstico como sendo a fonte poluidora dos recursos hídricos (GAJADHAR et al., 2004, MACPHERSON, 2005).

O protozoário *Cryptosporidium* spp. foi considerado como um relevante problema de saúde pública, atingindo indivíduos imunocompetentes, após o surto de Milwaukee (Wisconsin-EUA) em 1993. Neste episódio, 403 mil pessoas foram infectadas em uma cidade de 1,5 bilhões de habitantes, causando 100 mortes; no entanto, estes números podem ser subestimados porque somente pessoas com sintomas de diarreia aquosa foram consideradas no levantamento oficial (MACKENZIE et al, 1994). A água distribuída para a população, mesmo atendendo aos padrões estabelecidos pela legislação norte-americana, continha uma pequena quantidade de oocistos cuja origem foi a contaminação por esgoto doméstico no manancial de captação (Lago Michigan) (MACKENZIE et al, 1994).

Entre 2005 e 2006, ocorreram 20 surtos por água de consumo em 14 estados nos Estados Unidos atingindo 612 pessoas e 4 mortes, 12 (60%) foram causados por bactérias, 3 (15%) por vírus, 2 (10%) por parasitos e 1 (5%) por outro agente etiológico e 2 (10%) de origem desconhecida. *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. foram os parasitos causadores dos 2 surtos registrados (YODER, 2008a). Ainda neste período, 78 surtos por veiculação hídrica em 31 estados dos EUA, foram associados com águas de recreação atingindo 4.412 pessoas resultando em 116 hospitalizações e 5 mortes, sendo que em apenas 62 foram identificados os agentes patogênicos. Dentre os principais foram: 34 (43,6%) foram causados por parasitos; 22 (28,2%) por bactérias; 4 (5,1%) por vírus e 2 (2,6%) por agentes químicos (YODER, 2008b). Dos 48 casos de gastroenterite do total de surtos registrados, 33 foram originados por parasitos, incluindo 31 (93,9%) causados por *Cryptosporidium* spp., somente 1 caso (3%) por somente *Giardia* spp. e 1 (3%) incluindo ambos os parasitos (YODER, 2008b).

No período de 1986 e 1996, 710 surtos de veiculação hídrica foram oficialmente registrados na Europa. *Cryptosporidium* spp. foi o agente etiológico de 208 surtos, sendo 1 na Croácia, 13 na Inglaterra, 1 na Espanha e outro na Suécia (BARTRAM et al, 2002). Na Inglaterra e País de Gales, Nichols et al (2006) identificaram 149 surtos de

criptosporidiose no período entre 1983 e 2005, dos quais, 55 foram relacionados com o abastecimento de água municipal, 6 com água de abastecimento privada, 43 em piscinas e 16 com contato animal.

Surtos de criptosporidiose e giardiose por veiculação hídrica na França são menos freqüentes que àqueles dos Estados Unidos e Reino Unido (GUYONNET e CLAUDET, 2002; DALLE et al., 2003; KARANIS et al., 2007). Desde 2001, autoridades da França exigem o monitoramento de oocistos destes protozoários em águas de abastecimento e de consumo (AFNOR, 2001).

Na Europa, 7.960 casos esporádicos de criptosporidiose foram registrados em 16 países em 2005, sendo que a maioria ocorreu no Reino Unido (cerca de 5.561), sendo seguido da Alemanha (1.284), Irlanda (565), Bélgica (357) e Espanha (108), com uma maior incidência em pessoas jovens de 5 a 14 anos de idade. A maioria destes episódios foi registrada no outono, sendo que 59% ocorreu nos meses de agosto e novembro, embora nos países como a Irlanda e Espanha, a maior ocorrência foi no verão. O surgimento destes casos foi atribuído à contaminação da água de consumo assim como, o tratamento inadequado da água. Na Inglaterra, a regulamentação e a melhora do sistema de tratamento de água coincidiram com o declínio da incidência de criptosporidiose (SEMENZA e NICHOLS, 2007).

De julho a setembro de 1998, houve um grave incidente em relação à qualidade da água de abastecimento em Sidney (Austrália), quando altas concentrações (milhares) de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. foram repetidamente observadas em amostras de água colhidas do sistema de distribuição, embora nenhum aumento de casos de criptosporidiose de veiculação hídrica fosse detectado. Baseados no monitoramento destes protozoários na água, Clancy (2000) realizou uma auditoria independente no laboratório responsável pela análise, cujos dados foram fornecidos para Sydney Water Corporation. Foram constatadas diversas irregularidades tais como: erros de leitura das lâminas, onde oocistos foram encontrados em preparações registradas como negativas e ao serem novamente analisadas, concentrações de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. não foram confirmadas e quando presentes, em menores concentrações daquelas registradas. Florações de algas presentes nas amostras de água bruta, foram

consideradas como oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp., pois apresentavam o mesmo padrão de fluorescência dos protozoários, após incubação com anticorpos monoclonais fluorescentes, o que gerou resultados falso-positivos.

Rodgers et al (1995) constataram reação cruzada das algas e cianobactérias com anticorpos fluorescentes anti-*Giardia* e anti-*Cryptosporidium*, sendo que das 54 espécies de algas estudadas, 24 exibiram grau variado de fluorescência. Ressalte-se que *Navicula minima* (diatomácea) e *Synechococcus elongatus* (cianobactéria) apresentaram padrão de imunofluorescência verde-maçã semelhante aos dos protozoários *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. A presença de moléculas na superfície do fitoplâncton que se assemelham às proteínas antigênicas dos protozoários, permitiu a ligação dos anticorpos e portanto, a reação cruzada.

Surtos de veiculação hídrica por protozoários já foram registrados no Brasil. Entretanto, surtos ocasionados por oocistos de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp não foram documentados até o momento no país. Devido à vulnerabilidade dos mananciais quanto à contaminação com patógenos de origem fecal, é real a possibilidade de ocorrência de surtos ocasionados por estes parasitos. No período de 1999 a 2001, surtos epidêmicos de ciclosporoze (n=2) e de toxoplasmose (n=1) por veiculação hídrica também ocorreram no Brasil, nos Estados de São Paulo e Paraná (MOURA et al, 2002; DeMOURA et al, 2006) atingindo aproximadamente 1.075 pessoas (FRANCO, 2007).

## **2.2 Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em águas superficiais de rios.**

Smith (1998) discorreu sobre os diversos fatores que contribuíram para que os protozoários *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. tornarem-se significantes patógenos de transmissão hídrica: provocam infecções endógenas com baixa dose infectante, as densidades de contaminação ambiental com cistos e oocistos infectantes são suficientes para poluir o ambiente aquático e os oocistos são bastante pequenos para alcançar a água distribuída à população, após tratamento da água, além de serem resistentes aos desinfetantes comumente empregados no tratamento da água.

Nestes últimos anos, inúmeros trabalhos foram realizados na detecção dos protozoários *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em água bruta superficial de rios de regiões rurais e urbanas (HSU et al, 1999; TSUSHIMA et al, 2001; FRANCO et al, 2001; BERINO, 2004; MONTEMAYOR et al, 2005; DIAS et al, 2008; VERNILE et al, 2009, MONS et al, 2009; CASTRO-HERMIDA et al, 2009; NISHI et al, 2009) utilizando várias metodologias de concentração de oocistos e cistos, incluindo o Método 1623 (USEPA). Nestes estudos, também verificaram a origem destes patógenos e como contaminam o ambiente aquático.

HSU et al (1999) investigaram a presença dos protozoários *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em 13 amostras de água (15L a 80L) provenientes de sistemas de tratamento e de regiões de fazendas de criação de suínos localizadas na Bacia do Rio Kau-Ping, utilizando o Método de Filtração em Cartucho de Polipropileno e reação de imunofluorescência. Foram encontradas em 80% e 60% das amostras de água bruta superficial (próximas às regiões de criação de porcos) cistos de *Giardia* spp.(concentração média de 4.776/100L) e oocistos de *Cryptosporidium* spp. (concentração média de 1.956/100L), respectivamente. A positividade para estes protozoários também foi encontrada na água tratada, sendo que em 100% das amostras foram positivas para cistos de *Giardia* spp. (concentrações de 12 a 57cistos/100L) e 40% para oocistos de *Cryptosporidium* spp. (concentrações de 35 a 159 oocistos/100L), cujas concentrações podem indicar um risco potencial para a ocorrência de surtos.

No mesmo período, Tsushima et al (2001) analisaram a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 28 amostras de 300 L de água bruta superficial provenientes de 10 rios da região de Hokkaido, utilizando o Método de Filtração em Cartucho, purificação de oocistos pelo método de Sheather e coloração por Kinyoun e ensaio de imunofluorescência. Foram encontradas concentrações médias de 16,73 oocistos /100 litros em 14 amostras de água bruta superficial que são localizadas em regiões onde há criação de gado leiteiro, sugerindo a contaminação com fezes de bovinos no curso d'água.

No período de 2001 e 2003, 33 amostras de água superficial do rio Llobregat (Espanha) foram analisadas pelos Métodos de Filtração em Membrana de Acetato de Celulose e separação imunomagnética seguida de imunofluorescência. Todas as amostras foram positivas para oocistos de *Cryptosporidium* spp., nas concentrações de 0,43 a 1,36 oocistos/L de água superficial. Neste estudo, concluiu-se que houve correlação positiva destes parasitos com eventos de chuva (MONTEMAYOR et al, 2005).

Concentrações de oocistos de *Cryptosporidium* spp e cistos de *Giardia* ssp, também foram detectadas em águas superficiais do rio Foggia na Itália, em 2005 (VERNILE et al, 2009). Foram utilizados para a concentração: Método de Filtração em Membrana de Nitrato de Celulose, purificação em solução de sacarose para a análise destes parasitos, sendo encontrado somente *Giardia* spp. nas 4 das 7 amostras de 20L de água bruta superficial, enquanto não foram encontrados oocistos de *Cryptosporidium* spp., devido aos altos níveis de turbidez. Ainda neste estudo, verificou correlação positiva entre os cistos de *Giardia* spp. e coliformes fecais.

Entre 2005 e 2007, Mons et al (2009) analisaram 162 amostras 20 L de água superficial dos rios Sena e Marne da França, utilizando os métodos de filtração em cápsula Environcheck®(Pall Gelman, Saint Germain en Laye, France)., separação imunomagnética e ensaio de imunofluorescência, de acordo com AFNOR (2001). Foram registrados oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 45,7% das amostras e 93,8% para cistos de *Giardia* spp., cujas concentrações variaram de 30 a 245 oocistos/10L e 180 a 511 cistos/10L, respectivamente. Neste estudo, ainda foi observada maior frequência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em outono quando comparado com

primavera e verão e menor frequência de cistos de *Giardia* spp. no verão em relação às outras estações.

Na bacia do rio Tambre (Espanha), Castro-Ermida et al (2009) analisaram um total de 116 amostras de 50 L de água superficial utilizando Filita-Max, separação imunomagnética e imunofluorescência. Foram encontradas 62 amostras positivas para oocistos de *Cryptosporidium* spp. (2 oocistos/L a 1.200 oocistos/L) e 78 positivas para cistos de *Giardia* spp. (2 oocistos/L a 400 cistos/L). A positividade para estes parasitos pode ser devido à predominância de criação de bovinos na região onde foram coletadas as amostras de água superficial.

Já no Brasil, na região da Bacia do Rio Piracicaba, o rio Atibaia sofre constante impacto na qualidade da água, oriundo do despejo de esgotos domésticos, industrial e das atividades agrícolas, contribuindo para a presença de protozoários patogênicos. Franco et al (2001) registraram positividade de 57 a 60, 8 oocistos/L de *Cryptosporidium* spp. e 33 a 95 cistos/L de *Giardia* spp nas amostras de 1L de água superficial deste rio, utilizando o método de filtração em membrana e imunofluorescência. As amostras positivas para os protozoários apresentavam também alta turbidez.

BERINO (2004) verificou a ocorrência destes protozoários nas águas brutas de quatro afluentes do Lago Guaíba: Rios Taquari, Caí, dos Sinos e Gravataí. Amostras de 10 L de água superficial foram analisadas utilizando filtração em cápsula Environcheck® (Pall Gelman Sciences, Inc., MI, USA), separação imunomagnética e coloração por Safranina, Kinyoun e imunofluorescência. Obtiveram-se os seguintes resultados: para os Rios Taquari, Caí, dos Sinos e Gravataí, respectivamente: 75 %, 42 %, 33 % e 25 % das amostras foram positivas para *Cryptosporidium* spp. e 92 %, 83 %, 67 % e 50 % para *Giardia*. As concentrações médias de *Giardia* spp. foram superiores às de *Cryptosporidium* spp. em todos os quatro afluentes. Os valores médios observados foram: 80 oocistos e 176 cistos/100L no Taquari; 47 oocistos e 66 cistos/100L no Caí; 19 oocistos e 53 cistos/100L no Sinos; 16 oocistos e 92 cistos/100L no Gravataí. As densidades encontradas indicam que os protozoários estão disseminados nas águas superficiais dos formadores do Lago Guaíba.

Dias et al (2008) registraram concentrações médias geométricas de 3,62 oocistos/L de *Cryptosporidium* spp. e 3,93 cistos/L de *Giardia* spp. nas amostras de

10L de água superficial da bacia hidrográfica do Ribeirão São Bartolomeu (MG) entre 2003 e 2004, utilizando Floculação em Carbonato de Cálcio e imunofluorescência. Nas margens deste manancial, os bovinos utilizavam a água de córregos e ribeirões, sugerindo que estes animais podem ter contaminado os cursos d'água ao eliminarem fezes contendo estes parasitos.

No Brasil, Nishi et al (2009) analisaram 15 amostras de 1.000 L de água bruta do rio Pirapó (Paraná) utilizando Filtração em Membrana e imunofluorescência. Foram constatadas 26,6 % amostras positivas para *Cryptosporidium* spp. (0,15 oocistos/L) e 6,66% para *Giardia* spp (0,2 cistos/L). Amostras de água tratada também foram analisadas e não verificaram presença destes parasitos, confirmando a importância do tratamento de água para a remoção destes patógenos.

Não há um único método de concentração apropriado para detecção de protozoários em amostras de água superficial, pois não existe uma metodologia que atenda à todas as situações. Para a escolha do método deve-se considerar o propósito da análise, a qualidade da água, local de coleta e a estrutura e experiência do laboratório (FRICKER e CRABB, 1998).

As diferentes concentrações de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. encontradas nesses trabalhos, por diferentes metodologias e em volumes variáveis (1L a 100L) de amostras de água bruta superficial de rios dificultam a observação da densidade mínima que pode ser detectada no ambiente aquático. Cada metodologia de concentração de protozoários possui um limite de detecção e também a natureza da amostra pode interferir na eficiência de recuperação do método.

### **2.3 Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em efluentes de esgoto.**

Efluentes de esgoto podem ser uma grande fonte de contaminação para o ambiente, podendo ser considerado de grande significância pública se forem descartados em corpos d'água para abastecimento, recreação ou para irrigação (ROBERTSON et al, 2006).

Bukhari et al (1997) pesquisaram estes protozoários em 7 estações de tratamento de esgoto na Inglaterra. Oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram detectados em 0%-63,6% do esgoto bruto analisado, com densidades de 10-170 oocistos/L e em 15,4% a 46,6% dos efluentes, sendo assinaladas densidades de 10-60 oocistos/L. Para *Giardia* spp., em 70,0%- 90,9% dos esgotos brutos analisados foram encontradas densidades de 10-13.600 cistos/L e em 15,4%-91,7% dos efluentes, densidades de 10-720/L.

Farias et al (2002) detectaram oocistos de *Cryptosporidium* spp. (80-912 oocistos/L) em 24 amostras de 5 L de esgoto bruto coletadas da Estação de Coleta e Tratamento de Esgoto de Edu Chaves (SP), pelo método de Floculação em Carbonato de Cálcio proposto por Vesey et al (1993) e imunofluorescência. Os resultados indicaram um potencial risco de disseminação desse patógeno no ambiente aquático e também na comunidade, já que foram encontrados densidades de oocistos de *Cryptosporidium* spp. no rio Pirajussara que recebe influência deste esgoto.

Heller et al (2004) investigaram a presença de protozoários em 15 amostras nos esgotos sanitários do Ribeirão Arrudas (Belo Horizonte) pelo método de Floculação em Carbonato de Cálcio e imunofluorescência. Registraram-se densidades de  $10^2$  a  $10^4$  oocistos/L e de  $10^3$  a  $10^5$  cistos/L. Não se observou um padrão de variação diária e semanal dos oocistos e cistos nos esgotos sanitários, mas apenas ligeiro acréscimo nos poucos dias de chuva.

Santos et al (2004) analisaram amostras de esgoto bruto (afluentes) e tratados (efluentes) de uma Estação de Tratamento de Esgoto em Campinas pelos Métodos de Centrífugo-Concentração e Filtração para analisar amostras de esgotos e encontraram alta densidade de ambos protozoários (afluentes:  $1,2 \times 10^5$  cistos/L,  $6,0 \times 10^4$  oocistos/L; efluentes:  $1,5 \times 10^3$  cistos/L,  $1,6 \times 10^2$  oocistos/L).

França (2007) verificou a ocorrência natural de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em amostras de 5 mL de esgoto do Hospital de Clínicas de Campinas, utilizando o Método de centrífugo-concentração seguido de clarificação com éter e visualização por imunofluorescência direta, durante o período de um ano encontrando densidades médias de  $2,7 \times 10^3$  oocistos/L de *Cryptosporidium* spp. e 3,8

x 10<sup>5</sup> cistos/L de *Giardia* spp. (em 3, 7% e 58, 3% das amostras de esgoto, respectivamente).

#### **2.4 Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp e cistos de *Giardia* em águas superficiais de lagos e represas.**

No período de 2001 a 2002, 132 amostras de 10 litros de água superficial em diferentes locais do lago Baroon (Austrália) foram analisadas utilizando filtração em cápsula Envirocheck<sup>®</sup> HV filter (Pall Life Sciences, New South Wales, Austrália) separação imunomagnética e fluorescência. Concentrações máximas de oocistos (140 oocistos/10L) de *Cryptosporidium* spp. foram detectadas nas amostras de água em períodos de maior chuva enquanto que na ausência de precipitação houve decréscimo nas densidades de protozoários (45 oocistos/10L) (WOHLSEN et al, 2006).

Já em 2004 a 2005, Schets et al (2008) realizaram o monitoramento de patógenos em águas superficiais de 5 lagos de recreação de Amsterdam, filtrando 20 L de amostras de água superficial em cápsula Envirocheck<sup>®</sup> HV (Pall Gelman Laboratory, Ann Arbor, MI). Oocistos e cistos de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. (2-12 oocistos/10 L e 2-8 cistos/10L, respectivamente) foram detectados em baixo número nestes cursos d'água, apesar de atender aos parâmetros de qualidade de água de recreação da legislação europeia.

Entre 2005 a 2007, Kim et al (2008) analisaram sazonalmente oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em águas superficiais do lago Sangsa (Korea) utilizado para abastecimento e para atividade agrícolas. Foram detectados pelo Método 1623, densidades de 1,1 a 1,8 × 10 oocistos/L e 3,8 a 5,1 × 10 cistos/L no período do inverno. Já no verão, as densidades foram 0,0 a 0,3 × 10 oocistos/L e 0,9 a 2,9 × 10 cistos/L.

Ajeegah et al. (2007) avaliaram a biodinâmica dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em um lago artificial eutrófico construído no estreito de Mingoa na Bacia do Rio Mfoundi na República de Camarões (África Ocidental). Amostras de 10 L de água superficial do lago foram centrifugadas com solução de sulfato de zinco e o material resultante foi corado pelos métodos Ziehl-Neelsen e

coloração pelo lugol, para identificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. Foram detectados 56 oocistos/l e 24 cistos/l na amostra de água superficial do lago. Entretanto, os procedimentos álcool-ácido resistentes como a coloração de Ziehl-Neelsen não geram resultados confiáveis em relação à análise de protozoários em água, devido à presença de organismos interferentes como algas, pólenes, fungos, restos vegetais que também podem incorporar o corante fucsina (SAUCH et al, 1985).

No estudo de Keeley e Faulkner (2008), 193 amostras de 10L de água superficial do Lago Texoma no Texas foram analisadas pelo método 1623 (USEPA, 1999), utilizando a filtração em cápsula Environcheck® (Pall Gelman Sciences, Inc., MI, USA) e IMS, sendo encontrados oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 99% e cistos de *Giardia* spp. em 87% das amostras, cujas densidades foram de 2 a 1820 oocistos/10L e 1 a 155 cistos/L, respectivamente. Neste estudo, foi verificado que a presença de oocistos foi correlacionada significativamente com a ocorrência de chuvas neste período.

Em 2008, amostras de 50 litros de água superficial de um lago de recreação da Malásia foram concentradas pelo método de filtração em cápsula Environcheck® (Pall Gelman Sciences, Inc., MI, USA) e identificadas utilizando o método de separação imunomagnética e imunofluorescência. Nenhum oocisto de *Cryptosporidium* spp. foi detectado, mas 77,8% das amostras continham baixo número de cistos de *Giardia* spp. (0,17 a 1,1 cistos/L). Neste estudo ainda foi realizado o sequenciamento do gene SSU rRNA, indicando a presença de *Giardia duodenalis* pertencente a assembléia A, sugerindo um risco potencial à saúde pública (LIM et al, 2009).

No Brasil, no período de 2007 a 2008, Batista et al (2008) realizaram o monitoramento de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. nas águas superficiais da Represa de Vargem das Flores (MG). Foram detectadas densidades de 0 a 9 oocistos/10 L e de 0 a 132 cistos/10L através da filtração de amostras de 10 L de água superficial bruta da represa pelo método 1623. Embora a ocorrência dos protozoários tenha sido variável, as densidades de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. encontradas no manancial se mostraram muitas vezes suficientes para causar infecção caso seja ingerida sem tratamento. Como a Represa de Vargem

das Flores é também utilizada para recreação, a ingestão de água *in natura* é um potencial risco de contaminação (WHO, 2006).

A comparação entre as diferentes metodologias é prejudicada pela falta de padronização dos critérios para a condução destes experimentos como: informações sobre a característica da água amostrada, descrição de diversos procedimentos de inoculação em diferentes trabalhos existentes que dificultam a comparação entre os tipos de amostras inoculadas, grandes concentrações de cistos e oocistos inoculadas que acabam por resultar em maior eficiência de recuperação, método de enumeração e qualidade de suspensão de oocistos inoculados, usos de amostras comprovadamente negativas como controle e “ensaio cego” para diminuir o erro da leitura das lâminas (LINDQUIST et al, 1999).

Isaac-Renton et al (1996) relataram que na tentativa de comparar dados de diferentes estudos epidemiológicos, os resultados podem variar extensivamente devido à diversidade dos métodos de recuperação de parasitos. Foi observado também, que os diversos usos dos corpos d’água analisados (abastecimento, recreação, agricultura) e ocorrência de chuvas, facilitaram a contaminação fecal das águas através do esgoto doméstico, fezes de banhistas e escoamento superficial do solo (devido às chuvas) contendo fezes de animais, gerando um cenário propício para a transmissão zoonótica destes parasitos (FAYER et al, 2004; LI et al, 2005; ZIEGLER et al, 2007).

## **2.5 *Giardia* spp.**

O gênero *Giardia* é um protozoário flagelado e classificado como Classe Zoomastigophora na ordem Diplomonadida (THOMPSON, 2008). Comumente afeta o trato gastrointestinal de muitos vertebrados (THOMPSON E MONIS, 2004)

*Giardia* sp. possui uma simples organização intracelular e tem sido proposta como representante de uma antiga linhagem eucariótica que divergiu antes da aquisição de mitocôndria, sendo considerada como organismo fundamental na compreensão da evolução das células eucarióticas (THOMPSON E MONIS, 2004; SIMPSON et al, 2002). Este protozoário possui duas formas distintas que se alternam

no seu ciclo de vida: uma forma móvel, o trofozoíto e uma forma resistente, o cisto (MIDDLEJ E BENCHIMOL, 2009, THOMPSON et al, 1990).

O trofozoíto é móvel, bilateralmente simétrico, piriforme a elipsoidal, 12-15 $\mu$ m de comprimento e 6-8  $\mu$ m de largura, com uma superfície dorsal côncava e na superfície ventral, um disco ventral, adesivo ou “suctório”. É binucleado com 4 pares de flagelos e 1 par de corpos medianos (THOMPSON E MONIS, 2004). Apresenta também vesículas que produzem proteínas que auxiliam no encistamento.

Os cistos podem medir de 8 a 12  $\mu$ m (SMITH et al, 1995) e são circundados por uma parede externa espessa (0,3  $\mu$ m a 0,5  $\mu$ m), composta por filamentos de diferentes tamanhos (7 nm a 20 nm) constituídos de carboidratos na forma de N-acetilgalactomisina e por outra bicamada separada da membrana plasmática do parasito por um espaço peritrófico (CHAVES-MUNGUIA et al, 2004). No seu interior, há 2 a 4 núcleos visíveis, axonemas e fragmentos em formato crescente do disco ventral (PALM et al, 2005).

A parede filamentosa do cisto confere resistência às condições ambientais favorecendo a sua disseminação pelo ambiente (MIDDLEJ e BENCHIMOL, 2009).

O ciclo de vida é simples e compreende uma fase de multiplicação rápida (divisão binária) e não invasiva dos trofozoítos na superfície da mucosa do intestino delgado e o encistamento das formas móveis, com produção de cistos que são resistentes ao estresse ambiental e que são eliminados nas fezes podendo iniciar a infecção no hospedeiro por transmissão direta ou indireta (MONIS et al, 2009). A transmissão direta ocorre de um indivíduo a outro, como em creches ou ambientes cuja higiene está comprometida e a indireta ocorre por meio de ingestão de alimentos e água contaminados (TRAUB et al, 2005).

A exposição dos cistos de *Giardia* spp. ao suco gástrico do estômago e aos sais biliares no intestino, estimula a liberação dos trofozoítos os quais se aderem e colonizam a superfície da mucosa do intestino e iniciam a multiplicação por divisão binária. Na passagem do intestino delgado ao intestino grosso, os trofozoítos se encistam e são liberados junto com as fezes (MONIS e THOMPSON, 2003; THOMPSON, 2008).

Embora *Giardia* spp. não seja invasivo, a infecção pode ser clinicamente significativa em mamíferos e pássaros, embora os fatores responsáveis pelos sinais clínicos não são claramente compreendidos e variam entre as diferentes espécies hospedeiras (THOMPSON e MONIS, 2004). Entretanto, as conseqüências adversas da infecção de *Giardia* spp. e seu potencial patogênico são mais conhecidos em humanos (THOMPSON e MONIS, 2004).

A patogenia da giardiose é caracterizada por ser um processo multifatorial patofisiológico devido à ação do parasito no hospedeiro, cujo *status* imunológico e nutricional influenciam na severidade e variedade dos sintomas que são: diarreia aguda ou crônica, desidratação, dor abdominal, náuseas, vômitos, e perda de peso. (THOMPSON et al, 1993, ECKMANN,2003; THOMPSON, 2004). Estes sintomas podem ser resultantes da interação das proteinases dos parasitos que lesionam o epitélio intestinal, das respostas inflamatórias e imunológicas do hospedeiro (CHAI et al., 1999; SCOTT et al., 2000, 2004; GUK et al., 2003). Já para Chin et al (2002), as proteínas citopáticas de *Giardia* spp. e as células CD8+ do hospedeiro podem induzir a apoptose do enterócito, devido à ruptura do citoesqueleto e das proteínas de junção da célula intestinal.

Essas mudanças ocasionam a atrofia das vilosidades intestinais que podem provocar a perda funcional do epitélio e deficiência de dissacaridases, como também ocorre o aumento da permeabilidade intestinal influenciando na absorção de nutrientes e induzindo respostas inflamatórias (SCOTT et al, 2002; BURET, 2007). Evidências também mostraram que a infecção pode causar hipersecreção de íons cloreto (TROEGER et al, 2007).

O tratamento de escolha para a infecção com *Giardia* spp. inclui os nitroimidazóis (metronidazol e tinidazol) e albendazol. Doses diárias de metronidazol e tinidazol aumentam a eficiência do tratamento e o mau uso destes fármacos podem levar à resistência (SAVIOLI et al, 2006). A nitazoxanida tem sido proposta como alternativa de tratamento, mas ainda requer estudos para avaliação de sua eficácia (MONIS e THOMPSON, 2003; WRIGHT et al, 2003; SAVIOLI et al, 2006;; GONEN et al, 2007).

Entretanto, estudos demonstraram que a nitazoxanida foi tão eficiente quanto metronidazol, sendo que 85% dos pacientes apresentaram cura clínica e em 71-80% houve a erradicação do parasito (ORTIZ et al, 2001; ROSSIGNOL et al 2001).

### 2.5.1. Espécies de *Giardia* spp.

A aplicação de PCR em isolados de *Giardia* de amostras fecais e ambientais demonstrou que há um grande número de espécies e genótipos do protozoário devido à existência de especificidade de hospedeiro, podendo classificá-la em 7 genótipos: A, B, C, D, E, F e G (THOMPSON, 2008; MONIS et al, 2009).

As assembleias A e B tem sido detectadas em humanos e em uma grande variedade de mamíferos e ainda, são divididas nos subgrupos AI, BIII (zoonóticos) e AII, B IV (exclusivamente humanos). As assembleias C a G são hospedeiros-específicos, sendo que C e D são específicos para cães, E para bovinos, ovelhas e porcos, F para gatos e G para ratos (THOMPSON, 2004).

Tabela 1- Assembleias e espécies do gênero *Giardia* spp.

<i>Espécies</i>	Hospedeiro
<i>Giardia duodenalis</i> (= assembleia A)	Humanos e mamíferos domésticos e selvagens
<i>G. enterica</i> (=assembleia B)	Humanos, primatas, cães e algumas espécies de mamíferos selvagens
<i>G. agilis</i>	Anfíbios
<i>G. muris</i>	Roedores
<i>G. ardeae</i>	Pássaros
<i>G. psittaceae</i>	Pássaros
<i>G. microti</i>	Roedores
<i>G. canis</i> (=assembleia C/D)	Cães domésticos e outros canídeos
<i>G. cati</i> (=assembleia F)	Gatos domésticos
<i>G. bovis</i> (=assembleia E)	Bovinos e animais de criação rural
<i>G. simondi</i> (=assembleia G)	Ratos

Fonte: Adaptado de Monis et al (2009).

## 2.6 *Cryptosporidium* spp.

*Cryptosporidium* spp. pertence ao Phylum Apicomplexa que reúne organismos que apresentam complexo apical; Classe Sporozoasida que apresenta ciclo reprodutivo exibindo fases assexuada e sexuada com formação de oocistos; Subclasse Coccidia com ciclo de vida envolvendo merogonia, gametogonia e esporogonia; Ordem Eucoccidiida (= Eucoccidiorida) com presença de esquizogonia, Subordem Eimeriina (=Eimeriorina) com desenvolvimento independente de micro e macrogametas e Família Cryptosporidiidae (com oocisto apresentando 4 esporozoítos; sem esporocistos) (PLUTZER e KARANIS, 2009).

O oocisto é esférico ou ovóide e contém 4 esporozoítos circundados por uma parede e possui um corpo residual com um vacúolo de lipídios e grânulos de amilopectina que fornecem nutrição para os esporozoítos (HARRIS et al, 2004). A ultra-estrutura da parede do oocisto é composta por 4 camadas distintas: a externa com 5 nm, é uma cadeia de rede difusa com zonas interespassadas de densidades diferentes e composta por material filamentosso (glicoproteínas); espaço elétron-transparente de 5nm; a central, de 10 nm de espessura é fibrilar (lipídica) e a camada interna, mais espessa, com 20 nm e elétron-densa (PETRY, 2004). Para Sunnotel et al (2006), a parede do oocisto é formado por uma dupla camada consistindo de proteínas, lipídios e carboidratos.

Além disso, é caracterizada uma única sutura (que é uma zona de fraqueza da parede) em um pólo ocupando um terço da circunferência do oocisto. Durante a excitação, a sutura se dissolve e forma uma fenda por onde os esporozoítos são liberados (REDUKER et al, 1985, PETRY, 2004).

Há várias peculiaridades que o separa de outros coccídios como: a localização do oocisto de *Cryptosporidium* spp. na célula hospedeira (intracelular mas extra-citoplasmática), a fixação na célula por uma organela alimentar, onde há transporte de nutrientes, presença de dois tipos de oocistos (um de parede fina e outra espessa), pequeno tamanho do oocisto (2,9µm x 8,5µm), deficiência de estruturas morfológicas como esporocistos, micrópila, grânulos polares e a insensibilidade dos oocistos a quase todos anticoccídios testados (BARTA e THOMPSON, 2006; SMITH e NICHOLS, 2009).

O ciclo de vida é complexo com fases de reprodução sexuada e assexuada (SMITH et al, 2005; THOMPSON et al, 2005).

Após a ingestão dos oocistos pelo hospedeiro, os esporozoítos são liberados e infectam as células epiteliais do intestino (células do pulmão também podem ser infectadas) e se diferenciam em trofozoítos. Em seguida, sofrem esquizogonia e se tornam merontes tipo I (6 a 8 merozoítos) que liberarão os merozoítos podendo infectar outras células (reprodução assexuada) e se transformarem em trofozoítos formando merontes tipo I ou podem se diferenciar em merontes tipo II. Cada meronte tipo II formado contém 4 merozoítos que ao invadirem as células transformam-se em macrogamontes e microgamontes, produzindo macrogametas e microgametas, respectivamente. A fertilização do macrogameta pelo microgameta resultará na formação de dois tipos de oocistos: um de parede espessa e outra de parede fina. Os oocistos de parede espessa são liberados no ambiente e são as formas infectantes para o hospedeiro, os de parede fina são responsáveis pela autoinfecção (MONIS e THOMPSON, 2003; SMITH et al, 2005).

A transmissão ocorre de modo semelhante à *Giardia*: via fecal-oral, contato direto ou indireto, exposição à animais infectados, à ingestão de alimentos e água contaminados (FAYER et al., 2000). A dose infectante é baixa, sendo de 9-1052 oocistos (OKHUYSEN et al, 1999), dependendo da cepa do protozoário e da susceptibilidade do hospedeiro.

Os primeiros casos humanos de criptosporidiose foram relatados em 1976, em uma criança imunocompetente que apresentava enterecolite aguda autolimitada (NIME et al, 1976) e em um adulto imunossuprimido devido ao uso de corticóides (MEISEL et al, 1976).

No início dos anos 80, a criptosporidiose foi reconhecida como uma infecção oportunista e emergente, devido aos primeiros casos de diarreia aquosa em pacientes portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) (TZIPORI e WIDMER, 2008).

A maioria das infecções em humanos é ocasionada por *C.parvum* e *C.hominis* que ocorrem tanto em pacientes imunocompetentes e imunocomprometidos (CAMA, 2008).

Indivíduos de todas as idades são susceptíveis à infecção, mas crianças abaixo de 2 anos apresentam maior probabilidade de desenvolverem sinais clínicos mais severos por apresentarem o sistema imunológico imaturo (THOMPSON et al, 2005; CHALMER e DAVIES, 2009). Portanto, a severidade e a duração dos sinais clínicos podem variar com a idade e o *status* imunológico do hospedeiro (RAMIREZ et al, 2004; CHEN et al, 2002; FARTHING, 2000).

Em pacientes imunocompetentes, a criptosporidiose é uma gastroenterite aguda auto-limitante com uma duração média de 9 a 15 dias (RAMIREZ et al, 2004; CHALMERS e DAVIES, 2009).

Os sinais clínicos podem aparecer no período entre 2 e 14 dias após a ingestão dos oocistos. O primeiro sinal clínico é a diarreia que pode ou não estar associada às cólicas abdominais e a severidade da doença varia entre perda contínua, intermitente ou escassa de fezes. Entretanto, não é frequente observar sangue nas fezes. Outros sinais incluem mal estar, febre, fadiga, perda de apetite, náuseas e vômitos e conseqüentemente, desidratação e perda de peso (RAMIREZ et al, 2004).

Os sintomas podem variar de 10 a 14 dias, mas em indivíduos imunocomprometidos (HIV positivos, transplantados, diabéticos, mal-nutridos e pacientes terminais de câncer) podem persistir por meses ou anos (RAMIREZ et al, 2004).

A ocorrência de diarreia severa em pacientes imunocomprometidos se deve à contagem de células CD4+ abaixo de 150 a 200 células/ml (TZIPORI e WARD, 2002; CHEN et al, 2002; FARTHING, 2000).

Entretanto, com a introdução do tratamento anti-retroviral (HAART) reduziu drasticamente a prevalência e a severidade da criptosporidiose em pacientes com HIV/SIDA, devido à reconstituição do sistema imune do hospedeiro. Foi observado *in vitro* que os inibidores de protease foram capazes de reduzir a invasão de esporozoítos nas células hospedeiras (HOMMER et al, 2003).

Carey et al (2004) mencionaram que não há medicamento efetivo para criptosporidiose e inclui como tratamento: a reposição de fluidos e eletrólitos, fármacos anti-diarréicos, quimioterapia e imunoterapia (HAART). A ineficácia de muitos fármacos

se deve à resistência natural de *Cryptosporidium* spp. podendo ser explicada pelas seguintes hipóteses (MEAD, 2002):

1. A localização única do parasita na célula hospedeira o qual pode afetar a concentração do fármaco (transportado da célula hospedeira através do parasito).
2. Falta de alvos específicos ou diferenças nos alvos tanto em nível molecular e estrutural.
3. Diferentes rotas bioquímicas dos fármacos
4. Existência de proteínas de transporte ou “bombas” que transportam drogas fora do parasito ou para dentro da célula hospedeira.

A maioria dos fármacos foram somente testados no laboratório, e portanto, não há dados quanto à sua eficácia no tratamento em humanos. Entretanto, espiramicina, claritromicina, letrazuril são alguns que foram testados em um número limitado de pacientes com SIDA/ criptosporidiose e não foram eficientes na redução de diarreia e como anti-parasitários (ZARDI et al, 2005).

Atualmente, o medicamento aprovado pela Food and Drug Administration (Estados Unidos) é a nitazoxanida, indicada para o tratamento da criptosporidiose em indivíduos imunocompetentes e crianças. A nitazoxanida foi o único fármaco a ser submetido ao Programa de Criptosporidiose dos Estados Unidos, na investigação de um novo medicamento pela Food and Drug Administration (FDA). Este programa consistiu no tratamento com nitazoxanida em 196 pacientes com SIDA e 240 indivíduos imunocompetentes. Neste estudo, foi constatado que a nitazoxanida não foi eficiente em pacientes com células CD4+ abaixo de 50 células/mm<sup>3</sup>, entretanto, foi eficaz para os pacientes com células CD4+ acima de 50 células/mm<sup>3</sup> (ROSSIGNOL, 2009).

### 2.6.1. Espécies de *Cryptosporidium* spp.

As regras para aplicação de nomes científicos (desde família, gênero e espécie) para organismos animais, incluindo *Cryptosporidium* spp., são publicados no Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN) (FAYER, 2009).

Entretanto, alguns autores propuseram critérios para a caracterização de uma nova espécie *Cryptosporidium* spp.

Egyed et al (2003) relataram que as espécies aceitáveis de *Cryptosporidium* spp. são aquelas que foram inteiramente caracterizadas quanto à morfologia do oocistos, biologia e informação genética. Já para Xiao et al (2004), os requisitos mínimos para uma nova espécie inclui dados morfométricos, caracterização genética, conhecimento de hospedeiros naturais e infectados experimentalmente e por último, enquadramento às regras de ICZN.

No entanto, há poucos caracteres morfológicos dos oocistos que possam contribuir para a diferenciação das espécies de *Cryptosporidium* spp. Assim, no passado, os pesquisadores se basearam na ocorrência do protozoário no hospedeiro, mas, as espécies de *Cryptosporidium* spp. possuem especificidade de hospedeiro e potencial zoonótico o que resultou confusão taxonômica (O'DONOUGHUE, 1995; THOMPSON, 2002).

A aplicação de técnicas moleculares tem contribuído para a detecção e diferenciação das espécies e genótipos de *Cryptosporidium* spp, como também, a caracterização da transmissão dos oocistos entre animais e humanos (XIAO, 2009).

Isto permitiu a caracterização de *Cryptosporidium* spp. como assembléia fenotípica e genotipicamente heterogênea de espécies morfologicamente idênticas (MORGAN et al, 1999; THOMPSON 2003<sup>A</sup>; MONIS E THOMPSON, 2003).

Em 1997, Peng et al relataram duas rotas de transmissão da criptosporidiose em humano, sugerindo a existência de duas populações de *C.parvum*, inicialmente descritos como dois genótipos distintos. O genótipo 1 que infecta somente humanos foi posteriormente denominado como *C.hominis*, constituindo uma espécie distinta (MORGAN-RYAN et al, 2002), e o genótipo 2 que é zoonótico (*C.parvum*), podendo infectar principalmente bovinos e humanos, além de outros animais.

Ainda hoje é controverso o número de espécies do gênero *Cryptosporidium* e muitas têm sido aceitas ou excluídas. De acordo com Fayer (2009), as espécies aceitas são: *C. andersoni*, *C. bovis*, *C. parvum*, *C. ryanae* (ruminantes e bovinos); *C. baileyi*, *C. galli*, *C. meleagridis* (aves e galináceos); *C. canis* (cães domésticos); *C. felis* (gatos domésticos); *C. fayeri*, *C. macropodum* (canguru); *C. hominis*, *C. parvum* (humanos); *C. muris* (camundongo); *C. serpentis* (répteis); *C. suis* (suínos); *C. varanii*, *C. wrairi* (porquinho da Índia). Ainda em 2009, FAYER e SANTIN identificaram outra espécie de oocisto, *Cryptosporidium xiaoi* que foi previamente denominada como *C. bovis*-like que infecta ovelhas. A espécie que produz oocistos de menor tamanho (3.16 µm x 3.73 µm) é *C. ryanae* (FAYER et al, 2008).

Não foram consideradas como espécies *C. molnari*, *C. scophthalmi* (peixes) e *C. fragile* (sapo), por não apresentarem dados taxonômicos suficientes, denominando-as de “*nomen nudum*”, ou melhor, nome inválido (FAYER, 2009). Também não foram aceitos, *C. anserinum* e *C. tizzery*, pois seus oocistos não foram descritos adequadamente (LINDSAY e BLAGBURN, 1990). *C. nasorum* foi considerado como “*nomen nudum*” por não ter descrição suficiente (RYAN et al., 2004; XIAO et al., 2004). Também não foi considerada como nova espécie, *C. blagburni*, pois dados moleculares indicaram que é a mesma espécie de *C. galli* (RYAN et al, 2003).

Tabela 2. Espécies do gênero *Cryptosporidium* spp. (Fayer, 2009; Fayer e Santin 2009).

Espécie	Autor	Hospedeiro	Comentários
<i>Cryptosporidium molnari</i>	Alvarez-Pellitero and Sitjà-Bobadilla (2002)	Peixe	
<i>Cryptosporidium scophthalmi</i>	Alvarez-Pellitero et al. (2004)	Peixe	
<i>Cryptosporidium serpentis</i>	Levine (1980)	Serpente	
<i>Cryptosporidium varanii</i>	Pavlásek et al. (1995)	Lagarto	Sinônimo de <i>S.saurophilum</i> de Koudela e Modry (1998).
<i>Cryptosporidium fragile</i>	Jirku et al. (2008)	Sapo	
<i>Cryptosporidium meleagridis</i>	Slavin (1955)	Peru	
<i>Cryptosporidium baileyi</i>	Current et al. (1986)	Galinha	
<i>Cryptosporidium galli</i>	Pavlásek (1999)	Galinha	<i>C.galli</i> = <i>C.blagburni</i> , mesmo SSUrRNA, HSP70 e actina.
<i>Cryptosporidium muris</i>	Tyzzler (1907)	Camundongo	
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Tyzzler (1912)	Camundongo	
<i>Cryptosporidium wrairi</i>	Vetterling et al. (1971)	Porquinho da Índia	
<i>Cryptosporidium felis</i>	Iseki (1979)	Gato	
<i>Cryptosporidium andersoni</i>	Lindsay et al. (2000)	Boi	
<i>Cryptosporidium canis</i>	Fayer et al. (2001)	Cães	
<i>Cryptosporidium hominis</i>	Morgan-Ryan et al. (2002)	Homem	
<i>Cryptosporidium suis</i>	Ryan et al. (2004a)	Porco	
<i>Cryptosporidium bovis</i>	Fayer et al. (2005)	Boi	
<i>Cryptosporidium fayeri</i>	Ryan et al. (2008)	Canguru	
<i>Cryptosporidium ryanae</i>	Fayer et al. (2008)	Boi	
<i>Cryptosporidium macropodum</i>	Power and Ryan (2008)	Canguru	
<i>Cryptosporidium xiaoi</i>	Fayer e Santin (2009)	Carneiro	Variante de <i>C.bovis</i>

## **2.7 Aspectos epidemiológicos de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp.**

Ambos os protozoários apresentam em comum fatores epidemiológicos e biológicos (Tabela 3) que favorecem a disseminação destes agentes parasitários mediante o consumo de água e alimentos contaminados (ORTEGA e ADAM, 1997; FAYER et al., 2000; SMITH e GRIMASON, 2003; CACCIÒ et al, 2005):

- 1) Cistos e oocistos são imediatamente infectantes quando eliminados nas fezes;
- 2) A transmissão pode ocorrer por contato direto e indireto;
- 3) Baixa dose infectante;
- 4) Ubiquidade de cistos e oocistos no ambiente aquático;
- 5) Persistência de cistos e oocistos no ambiente;
- 6) Resistência aos desinfetantes comumente utilizados no tratamento de água para abastecimento público e/ou para recreação.

Tabela 3 - Características de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. que favorecem a transmissão por veiculação hídrica e alimentar.

Características	<i>Giardia</i> spp.	<i>Cryptosporidium</i> spp.
Grande número de cistos e oocistos eliminados nas fezes de infectantes hospedeiros infectados	- Taxa de eliminação nas fezes é variável. - Humanos infectados podem eliminar até $10^7$ cistos por grama de fezes (FAYER et al, 2004).	- Humanos e bovinos infectados podem eliminar $10^9$ a $10^{10}$ oocistos em uma semana (Fayer et al, 2004).
Múltiplos hospedeiros aumentam o potencial de transmissão e contaminação ambiental	Assembléias A e B de <i>Giardia duodenalis</i> já foram detectados em humanos e em uma grande variedade de outros hospedeiros mamíferos.	7 a 8 espécies infectam humanos: <i>C. hominis</i> , <i>C. parvum</i> , <i>C. meleagridis</i> , <i>C. felis</i> , <i>C. canis</i> , <i>C. suis</i> , <i>C. muris</i> , <i>C. andersoni</i> * (?).
Natureza robusta de cistos e oocistos favorece a sobrevivência por longos períodos de tempo no ambiente	Cistos sobrevivem por 1 a 2 meses em água.	Pequena proporção de oocistos sobrevivem por seis meses em água, ainda infectantes.
Pequeno tamanho de oocistos e cistos auxilia na passagem através do filtro de areia	8-12 $\mu$ m x 7-10 $\mu$ m (SMITH et al, 1995).	2,9 $\mu$ m- 8,5 $\mu$ m (SMITH e NICHOLS et al, 2009).
Baixa dose infectante	25-100 cistos (10 cistos podem iniciar infecção) (SMITH et al, 2003).	9-1042 oocistos (dependendo da cepa) (OKHUYSEN et al, 1999).
Eliminação de oocistos no ambiente aquático favorece a transmissão, bioconcentração por mariscos de água doce e salgada.	Cistos de <i>Giardia</i> spp. podem ser filtrados por bivalves (Gomez-Couso et al, 2005).	Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. podem ser filtrados por bivalves (FAYER et al, 1997).

Fonte: Adaptado de Smith et al, 1995.

\**C.andersoni* em humanos (Buret et al, 2003).

## 2.8 Fatores que controlam a presença e sobrevivência de patógenos em lagos e represas.

A presença dos patógenos em lagos e represas depende da sobrevivência e transporte destes organismos. O represamento das águas pode atuar como barreira ao transporte de microrganismos patogênicos (BROOKES et al, 2004), sendo que a detenção de água por um período de 6 meses, pode remover cerca de 1,5 a 2,5 log de cistos de *Giardia* spp. e de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (AUSTRALIAN DRINKING WATER GUIDELINES, 2004).

Bertolucci et al (1998) realizaram um estudo no qual se constatou a redução da densidade inicial de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. do rio Turin na Itália, devido ao represamento destas águas. As concentrações médias iniciais destes protozoários obtidas da filtração de 500 L de amostras de água superficial do rio eram de 137 cistos/100L de *Giardia* spp. e 70 oocistos/100L de *Cryptosporidium* spp, e com a detenção da água, estas densidades reduziram para 46 cistos/100L de *Giardia* spp. e 7 oocistos/100L de *Cryptosporidium* spp., resultando numa taxa de remoção de 55,8 % e 78,1 %, respectivamente.

O decaimento destes microrganismos patogênicos ainda depende de vários fatores: temperatura, radiação solar (principalmente ultravioleta), sedimentação, parâmetros químicos (pH e amônia) e biológicos (predação por organismos de vida-livre) (BROOKES et al, 2004).

Vários estudos avaliaram os efeitos do frio, calor, radiação ultravioleta na sobrevivência de oocistos, como descritos abaixo. Ressalte-se que a parede espessa do oocisto pode protegê-lo do frio, especialmente em climas onde a temperatura da água de rios e lagos permanece abaixo da temperatura de congelamento (FAYER, 2004).

Neumayerova´ e Koudela (2008) verificaram a infectividade de oocistos de *Cryptosporidium muris* submetidos à várias temperaturas, em camundongos machos ICR de 6 a 8 semanas. O tratamento consistiu na suspensão de oocistos de *C.muris* em amostras de 200 ml de água destilada, sendo em seguida, submetidas à temperatura de 4°C ou congeladas à -5°C por 1 a 10 dias e à -20°C por 1 a 8 horas. Outras suspensões de água destilada contendo oocistos de *C.muris* foram aquecidas em um

termo-ciclador de PCR, em temperaturas de 40°C a 70°C por 1 min. Durante 12 semanas consecutivas à infecção dos camundongos, as fezes dos animais infectados foram analisadas diariamente pelo método de Sheather, para pesquisa de oocistos. Nas fezes de camundongos que foram inoculados com oocistos armazenados à 4°C por 1 semana, foram encontrados oocistos após 13 dia pós-inoculação. Também foram encontrados oocistos em fezes de camundongos tratados com oocistos submetidos ao congelamento (-5 °C por 1 dia). Entretanto, nenhum oocisto foi encontrado nas fezes, quando foram submetidos à -5°C por 3 a 10 dias e, à -20°C por 1 a 8 horas. Já em temperaturas mais altas, todos os camundongos que receberam oocistos expostos à temperatura de 40°C e 45°C por 1 min., começaram a eliminar oocistos nas fezes entre 13 e 16 dia pós-inoculação. Quando expostos à 50°C por 1 min., somente 1 dos 4 camundongos infectados eliminaram oocistos.

Em temperaturas mais altas, 55°C, 60°C, 65°C e 70°C por 1 min., não foram encontrados oocistos nas fezes. Portanto, altas temperaturas são um dos pontos críticos que atuam na inativação dos oocistos (KING e MONIS, 2007).

Olson et al (1999) verificaram a infectividade de cistos de *Giardia* spp. após serem suspensos em água destilada e submetidos à temperaturas de -4°C, 4°C e 25 °C por até 12 semanas, em camundongos Swiss-Webster de 4 semanas. Os camundongos foram mortos após 5 dias de inoculação, sendo retirada uma parte do duodeno cujo material da parede intestinal foi escarificado, homogenizado com solução tampão-fosfato e examinado no microscópio óptico, para pesquisa de trofozoítos de *Giardia* spp. Não foram encontrados trofozoítos em camundongos que foram inoculados com cistos de *Giardia* spp. submetidos à -4°C (após 1 semana) e 25°C (após duas semanas).

O decaimento dos protozoários *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. sob baixas temperaturas é relevante em represas cuja localização geográfica (latitude e longitude) favorece a manutenção das camadas de gelo que contribuem para a estratificação do lago. Portanto, protozoários presentes nas camadas superficiais ficam sujeitos ao congelamento. (BROOKES et al, 2004).

A radiação ultravioleta (UV) também é um dos fatores que influenciam na persistência de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. no ambiente

aquático (BROOKES et al, 2004). Quando o DNA ou RNA é exposto à luz UV, elétrons penetram e quebram as bases nucleotídicas causando danos à estruturas dos ácidos nucleotídicos, prejudicando a replicação e a transcrição, e portanto, a multiplicação do organismo (LINDEN et al, 2001; ZIMMER et al, 2003, HIJNEN et al, 2006<sup>a</sup>).

No verão, a intensidade média de radiação solar é de 1000 W.m<sup>-2</sup> por 1 hora, que corresponde aproximadamente a 30 W.m<sup>-2</sup> de luz ultravioleta. Isto produz uma dose acumulativa de 360.000 mJ.cm<sup>-2</sup> por 1 hora, extremamente alta em relação às dosagens aplicadas no tratamento de água (20-120 mJ.cm<sup>-2</sup>) (CRAIK et al, 2001). Brookes et al (2004) relataram que é altamente provável que a luz UV em lagos e represas, possuem o potencial de inativar cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium*, durante o verão.

Já em relação à amônia, Jenkins et al (1998) relataram que concentrações acima de 0,007M (119 mg.L<sup>-1</sup>) de amônia livre (NH<sub>3</sub>) são capazes de inativar oocistos de *Cryptosporidium* spp. As concentrações de amônia são pH-dependentes, sendo que em pH 8.0, em solução aquosa, a concentração de amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) é de 1.780 mg.L<sup>-1</sup>; e em meios mais alcalinos, aumenta a permeabilidade da parede dos oocistos de *Cryptosporidium* spp., permitindo a penetração de amônia e portanto, a inativação. O aumento dos níveis de íons amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) é frequentemente observado em regiões mais profundas dos lagos, pois baixas concentrações de oxigênio dissolvido no sedimento resultam na liberação de amônio.

Entre os parâmetros biológicos que estão envolvidos no decaimento de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. no ambiente aquático (BROOKES et al, 2004), destaca-se a predação de patógenos realizada por invertebrados aquáticos.

Este fenômeno pode causar mudanças no transporte de patógenos pela represa, principalmente na facilitação da sedimentação, ao serem eliminados junto com o “pellet” fecal do predador (protozoários de vida-livre ou zooplâncton) (BROOKES et al, 2004). Fayer et al (2000) analisaram rotíferos alimentados experimentalmente com suspensões de oocistos de *Cryptosporidium* spp. corados com anticorpos monoclonais fluorescentes. Foram visualizados pela microscopia de epifluorescência, oocistos nos estômagos dos rotíferos ou em “boluses” (massa fecal gelatinosa) contendo até 8 oocistos unidos. Ainda nos rotíferos, também foram encontrados grânulos fluorescentes

(possivelmente, fragmentos da parede do oocisto ou fluoresceína), entretanto, não se pode afirmar se houve a digestão do oocisto pelo rotífero (FAYER et al, 2000).

Trout et al (2002) realizaram estudo similar, porém, utilizando cistos de *Giardia* spp para alimentação dos rotíferos. Foram visualizados sob microscopia de epifluorescência, cistos no interior do corpo dos rotíferos. Uma luz verde difusa foi também observada no interior destes organismos, sugerindo que os anticorpos com FITC (Isotiocianato de Fluoresceína) foram dissociados da parede dos cistos de *Giardia* spp. Entretanto, não se pode afirmar se os cistos foram digeridos ou simplesmente foi a ruptura da interação dos anticorpos e parasito. O fato dos rotíferos reterem no seu interior, os cistos de *Giardia* spp., tem importante implicação ecológica, pois limita a dispersão ambiental do parasito no ambiente aquático (TROUT et al, 2002). De acordo com ARMENGOL et al (2001), os rotíferos são organismos “selecionadores” quanto à sua alimentação, não propensos a ingerir partículas maiores que 9 µm.

Em relação às bactérias indicadoras (coliformes totais, termotolerantes e *E.coli*) de contaminação fecal, estas são utilizadas para avaliação da qualidade microbiológica da água; entretanto, não são bons indicadores da ocorrência de protozoários patogênicos, pois os coliformes são menos resistentes ao tratamento químico utilizado na desinfecção da água em relação à *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. (ASHBOLT et al, 2001; THURMAN et al, 1998, CRAUN et al, 1997). Por apresentar uma similar ou maior resistência à desinfecção e ao estresse ambiental para alguns pesquisadores, os esporos de *Clostridium perfringens* podem ser uma alternativa de indicadores de protozoários parasitas (LEEMING et al, 1998; MEDEMA et al, 1997, FERGUSON et al, 1996; DAVIES et al, 1995; PAYMENT e FRANCO, 1993). Entretanto, Chauret et al (1995) verificaram que não houve correlação entre cistos de *Giardia* spp., oocistos de *Cryptosporidium* spp. e *Clostridium perfringens* presentes no rios Otawa e Rideau (Canadá). Em outro estudo, Rimhanen-Finne et al (2004) também verificaram nenhuma correlação entre os protozoários e *Clostridium perfringens* em lodo de esgoto. Portanto, necessita-se de mais estudos para verificar o potencial indicador de *Clostridium perfringens* para protozoários patogênicos. Neste estudo, não foi estudado *Enterococcus*, pois *E.coli* é melhor indicador de contaminação fecal em águas doces (WADE et al, 2003). Entretanto, *E.coli* não é bom indicador para represas, devido aos

fenômenos de sedimentação e predação (BROOKES et al, 2004; BROOKES et al, 2005).

A vulnerabilidade das represas à contaminação está estreitamente relacionada ao uso do solo da bacia hidrográfica, como agricultura e criação de bovinos, ausência de vegetação natural, além da presença de animais selvagens (ZIEGLER et al, 2007; OLSON et al, 2004; KISTEMANN et al, 2002). O escoamento superficial do solo (influenciado pelas chuvas) pode transportar microrganismos patogênicos à represa e material particulado que contribui para o aumento da turbidez da água (KISTEMANN et al, 2002; ATHERHOLT et al, 1998).

O transporte dos microrganismos patogênicos no sistema aquático pode ser significativamente afetado devido à associação dos patógenos e partículas do solo, (CIZEK et al, 2008). Portanto, o monitoramento de protozoários patogênicos em lagos e represas deve ser complementado com informações sobre os fatores que controlam a sobrevivência dos microrganismos, além do conhecimento dos processos hidrodinâmicos envolvidos no transporte e distribuição dos patógenos no ambiente aquático (BROOKES et al, 2004).

## **2.9 Fatores que controlam o transporte e distribuição de patógenos em lagos e represas.**

Os reservatórios são formados a partir do barramento de um rio o que representa diminuição do fluxo e modificação de um sistema lótico para lêntico (ARMENGOL et al, 1999; ZANATA, 2000). Segundo CONAMA (2005), o ambiente lêntico se refere à água parada com movimento lento ou estagnado e o ambiente lótico é relativo às águas continentais moventes. A organização espacial da represa inclui 3 regiões principais: a lótica, a de transição e a lêntica, as quais se distinguem pelas características físicas e químicas da água, pelo sedimento e pela organização das comunidades biológicas, principalmente as planctônicas e bentônicas que respondem mais rapidamente às condições de maior ou menor fluxo de água, bem como à composição química e física da água e do sedimento (ESPINDOLA et al, 2004b).

Os principais processos hidrodinâmicos que determinam a distribuição de patógenos em lagos e represas são: fenômenos de dispersão, diluição horizontal, transporte vertical de partículas e sedimentação (Figura 3) (BROOKES et al, 2004).

A dispersão descreve tanto a dispersão turbulenta como o cisalhamento das partículas (gerado pelas velocidades horizontal e vertical da água). Estes processos são importantes na distribuição do material particulado, deslocando as partículas para várias direções (BROOKES et al, 2004). O transporte horizontal é predominantemente regido pelas correntes de ventos e influenciam somente na camada superficial da água, gerando ondas superficiais. Entretanto, as ondas internas (intrusões de rio) podem agir em diferentes direções e profundidades, sendo responsáveis pelo movimento vertical de patógenos, resultando em variações periódicas de qualidade de água (DEEN et al, 2000).

A velocidade de sedimentação é dependente do tamanho e densidade das partículas e sua agregação (BROOKES et al, 2004).

A adesão dos parasitos às partículas é influenciada pela idade, carga superficial em oocistos de *Cryptosporidium* e hidrofobicidade para cistos de *Giardia* spp (DAI et al, 2004). Ressalte-se que oocistos de *Cryptosporidium* spp. sob condições ambientais apresentam carga superficial negativa (CONSIDINE et al, 2002).

Dai e Boll (2003) verificaram a não agregação de cistos de *Giardia*, oocistos de *Cryptosporidium* spp. às partículas de solo em pH neutro (7.1), por apresentarem carga superficial negativa. Em outro estudo, Ongerth e Pecoraro (1996) verificaram a mobilidade eletroforética de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e constataram que a carga superficial do parasito é negativa em pH neutro podendo não se aderir às partículas de argila no ambiente. Entretanto, um aumento no pH reduz esta mobilidade produzindo uma maior afinidade com as partículas suspensas e conseqüentemente, aumento na sedimentação dos organismos.

Para Dai e Boll (2006), as velocidades de sedimentação de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em uma coluna d'água sem movimento são  $0,84 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  e  $0,36 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ , respectivamente. A baixa velocidade e o fato destes patógenos se deslocarem livremente no corpo d'água, podem percorrer longas distâncias até serem agregadas com alguma partícula que promoverá sua sedimentação mais rápida.

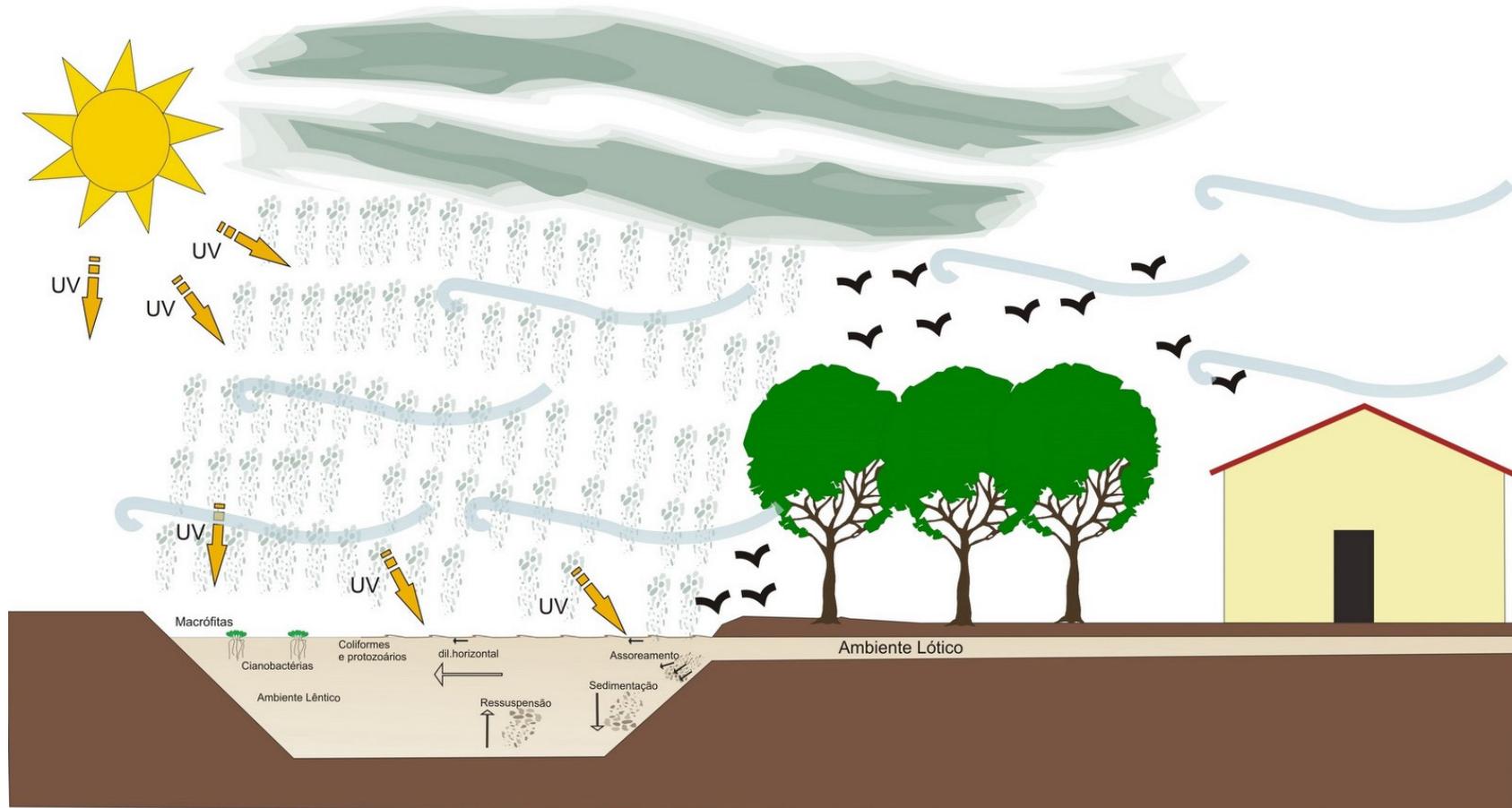
Os sedimentos no fundo de rios, lagos e estuários podem funcionar como reservatórios de bactérias indicadoras e patógenos entéricos, devido à presença de nutrientes, como matéria orgânica (WU et al, 2009; DAVIES et al, 1995). Em regiões mais profundas da represa, oocistos de *Cryptosporidium* spp sobrevivem por mais tempo devido ao frio e ausência de luz solar (BROOKES et al, 2004). Alguns estudos mostraram que organismos indicadores tendem a sobreviver por mais tempo nos sedimentos do que na água, devido à presença de matéria orgânica (BURTON et al., 1987; DAVIES et al., 1995).

A sedimentação também contribui para o processo de eutrofização, uma vez que o material orgânico transportado para dentro do lago ou reservatório é decomposto e, durante esse processo o oxigênio disponível é utilizado e os nutrientes são liberados no sedimento (p.ex: nitrogênio e fósforo), acelerando a atividade biológica e a super produção de plantas e animais, que ao morrerem se acumulam no fundo do reservatório, aumentando a parcela de sedimentos de origem autóctone (BONDURANT e LIVESEY, 1973). O nitrogênio sempre presente nos ecossistemas aquáticos e abundante como gás (inerte), normalmente é utilizado no crescimento de cianobactérias pelo processo de fixação. Pode existir, nas formas combinadas como amônio ( $\text{NH}_4^+$ ), nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), uréia e compostos orgânicos dissolvidos (GOLDMAN e HORNE, 1983). Em relação ao fósforo, os despejos industriais, domésticos e de agricultura são as principais fontes de fosfato solúvel e, frequentemente contribuem para eutrofizar o lago. Os detergentes contendo fosfato, geralmente contribuem com metade do fósforo do esgoto doméstico (GOLDMAN e HORNE, 1983). Segundo THORNTON (1990), o sedimento é grande transportador e catalisador de defensivos agrícolas, resíduos orgânicos, nutrientes e organismos patogênicos provenientes das atividades desenvolvidas na bacia hidrográfica. Além disso, os efluentes industriais podem lançar ao sistema metais em quantidade potencialmente tóxicas à biota (DORNFELD et al, 2004).

No período de chuvas, pode ocorrer a ressuspensão do sedimento promovendo a liberação de nutrientes, microrganismos (bactérias indicadoras, protozoários) na coluna d'água (LEMCKERT e IMBERGER, 1998; MUIRHEAD et al, 2004; JAMIESON et al, 2005) e ainda, contribui para o aumento do valor da turbidez (ALTHERHOLT et al,

1998). Keeley e Faulkner (2008) verificaram correlação positiva entre a ocorrência de chuvas e presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas amostras de água superficial do lago Texoma (Texas).

No reservatório de Salto Grande, o processo de sedimentação parece estar intimamente ligado à vazão de seu principal tributário, o rio Atibaia, o qual introduz grande quantidade de material alóctone em suspensão durante o período chuvoso e diminui o fornecimento desse material no período seco. Assim, a taxa de sedimentação do material particulado em reservatórios (ambiente lêntico) é maior que em ambientes lóticos (rios), em razão da redução da vazão, o que ocasiona maior tempo de retenção da água no corpo da represa e favorece a deposição de particulados, que podem conter metais e outros elementos adsorvidos em sua superfície (DORNFELD et al, 2006).



**Figura 3 - Modelo esquemático dos processos hidrodinâmicos que influenciam na sobrevivência e transporte de patógenos em uma represa.**

## **2.10 Métodos para avaliação de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp em água.**

Os métodos de recuperação e detecção de protozoários na água envolvem 3 passos: filtração da amostra de água com a finalidade de recuperar ou capturar os parasitos (cistos e oocistos); eluição e concentração e, visualização por microscopia de imunofluorescência (JAKUBOWSKI et al, 1996).

Em 1995, o método recomendado pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) para análise de protozoários em água de consumo foi o ICR- Information Collection Rule - *Protozoan Method for detecting Giardia cysts and Cryptosporidium oocysts in water by fluorescent antibody procedure* (USEPA 1995) que consistia na filtração de grandes volumes de água utilizando a filtração com filtros de porosidade nominal de 1µm, purificação de protozoários pela técnica de flutuação em Percoll-sacarose e ensaio de imunofluorescência direta (GRACZIK e FRIED, 2007). Entretanto, o ICR apresentava muitas desvantagens como: complexidade técnica, baixas taxas de recuperação, resultados falso-negativos e falso-positivos (MCCUIN e CLANCY, 2003).

Os Métodos 1622 e 1623 foram criados em 1997 e 1998 com o objetivo de obter maior recuperação de cistos de *Giardia* spp. e oocistos *Cryptosporidium* spp. em água, tendo como etapas: 1) filtração de amostras de 10L de água em filtros com porosidade nominal de 1µm; 2) purificação pela separação imunomagnética; 3) ensaio de imunofluorescência direta; 4) coloração com DAPI (4', 6- diamidino 2- fenilindol) 5) visualização por microscopia de epifluorescência e contraste de fase (DIC) (SMITH e NICHOLS, 2009; KIM et al, 2006; MCCUIN e CLANCY, 2003). Similarmente aos outros existentes, os Métodos 1622/1623 não fornecem informações sobre espécies de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp como também a infectividade destes protozoários (USEPA, 2005).

Cabe ressaltar que o único método validado pela USEPA é o 1623 (USEPA, 2005) que visa contemplar tanto amostras de águas brutas quanto tratadas (CLANCY et al., 2003). No entanto, procedimentos alternativos para a concentração inicial dos

organismos são permitidos desde que sejam atestados os níveis similares de recuperação de organismos (CLANCY et al., 2003).

O método de filtração em cartuchos de polipropileno foi o primeiro utilizado para pesquisa de protozoários em água, contendo filtros com porosidade nominal de 1µm onde grandes volumes de água (100-1000L) eram filtrados com fluxo de 1-5 L/min (MUSIAL et al, 1987). O material retido era eluído mediante lavagem do filtro com surfactante e o líquido resultante submetido à centrifugação. A eficiência de recuperação teve um alcance de 9 % a 29 % para oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água que foram inoculadas com 100-1000 oocistos/378L (MUSIAL et al, 1987).

Ongerth e Stibbs (1987) propuseram a técnica de filtração em membranas de 142 mm ou 293 mm de diâmetro com porosidade nominal de 2 µm, mediante extração mecânica da membrana e uso de surfactante; por este método, era possível a filtração de 10L a 20L de água com baixa turbidez. A eficiência de recuperação de oocistos variou de 5,0 % a 22,0 %. Esta técnica ainda foi aplicada em muitos estudos, porém, apresentando diferentes eficiências de recuperação devido às diferenças das membranas utilizadas (FRICKER e CRABB,1998).

Aldom e Chagla (1995) empregaram a filtração em membranas de acetato de celulose (293 mm de diâmetro e porosidade nominal de 1,2 µm), sendo seguida pela eluição por dissolução em acetona e lavagens sucessivas com etanol e eluição; o líquido resultante era centrifugado diversas vezes e o “pellet” final submetido à imunofluorescência. A eficiência de recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. foi de 70,5 %, entretanto, partículas sólidas não dissolvidas pela acetona poderiam interferir na detecção de oocistos.

Nieminski et al (1995) avaliaram o desempenho da filtração em cartucho de polipropileno e em membrana de policarbonato, obtendo as seguintes eficiências de recuperação: a eficiência de recuperação da técnica de filtração em membranas foi maior (49 % a 86 % para cistos de *Giardia* spp. e 9,0 % a 78,0 % para oocistos de *Cryptosporidium* spp.), já para a filtração em cartucho as recuperações foram de 12 % a 76,0 % de cistos de *Giardia* spp. e 8,0 % a 56,0 % de oocistos de *Cryptosporidium* spp.

Shepherd e Wyn-Jones (1996) avaliaram a eficiência de recuperação de 3 métodos: filtração em cartucho (porosidade nominal de 1,5µm), floculação em carbonato de cálcio e filtração em membrana (142 mm de diâmetro e porosidades de 0,8 µm a 3,0 µm). As recuperações de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. das seguintes técnicas foram: para filtração em cartucho (16,3 % e 9,4 %); para floculação em carbonato de cálcio (72,5 % e 71,3 %) enquanto para a filtração em membrana, as membranas de acetato de celulose (porosidade de 1,2 µm) proporcionaram melhores taxas de recuperações (50,1 % de cistos de *Giardia* spp. e 38,1 % de oocistos de *Cryptosporidium* spp), por facilitarem a extração mecânica dos cistos e oocistos, sem risco de rompimento da membrana e perda de organismos, além de não soltar fibras durante a eluição.

Franco et al (2001) utilizaram a filtração em membranas de ésteres mistos de celulose (47 mm de diâmetro, porosidade nominal de 3µm) para análise de amostras de água do rio Atibaia, obtendo recuperações de 33 a 95 cistos/L de *Giardia* spp. e 57,0 a 60,8 oocistos/L de *Cryptosporidium* spp., somente pela eluição com raspagem de membrana com 0,1% de Tween 80. A eluição por dissolução em acetona apresentou menor desempenho, com recuperações de 7,0 a 7,5 cistos/L de *Giardia* spp. e 0 a 5,0 oocistos/L de *Cryptosporidium* spp.

Os métodos de filtração são técnicas de concentração baseadas no tamanho de partículas, portanto, resultam não somente no acúmulo de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., como também, partículas de tamanhos similares aos oocistos e cistos que medem de 2,9µm a 8,3µm e 8 µm a 12 µm, respectivamente. Filtros com porosidade de 1µm (filtros de cartucho) podem acumular grandes volumes de sujidades. Estes interferentes podem estar presentes nas concentrações de 10<sup>7</sup>/L de água bruta (SMITH et al, 1995) e a probabilidade destes detritos em amostras que apresentem a proporção de 10<sup>8</sup> partículas:1 oocistos em 10L de água bruta, interferirem na visualização durante a etapa final do método de detecção de oocistos é alta (SMITH e NICHOLS, 2009).

A adição de surfactantes permitiu a redução das interações do parasito com as partículas, devido à neutralização da carga superficial, podendo melhorar a recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* spp (SMITH et al, 1995). Entretanto, deve ser desenvolvido um método robusto, confiável e capaz de detectar baixas

concentrações de cistos e oocistos em matrizes de água bruta (SMITH e NICHOLS, 2009).

A presença de partículas de solo, ácidos húmicos, fúlvicos, pólen, organismos de vida-livre (bactérias, protozoários e algas) e insetos podem não somente obstruir filtros, mas podem interferir nas técnicas moleculares como a PCR (ZARLENGA e TROUT, 2004; FENG et al, 2003).

Assim, amostras de água bruta e efluentes de esgoto que apresentam grande concentração de material particulado, devem ser amostradas em pequenos volumes (1L a 2 L), pois há grande probabilidade de sujidades “mascararem” a visualização dos protozoários (SMITH et al., 1995; SMITH e GRIMASON, 2003). Com baixa turbidez, é possível a filtração de grandes volumes (10 a 20L).

Outro método de concentração de oocistos de *Cryptosporidium* spp, foi desenvolvido por Vesey et al (1993). O método de floculação consiste na adição de floculantes (cloreto de cálcio e bicarbonato de sódio) em 10L de água, a seguir, o pH corrigido para 10.0 (com hidróxido de sódio). A agitação é necessária para promover a agregação das partículas, sendo depois deixado em repouso por um período de no mínimo 4 horas ou *overnight* em temperatura ambiente. O sobrenadante é descartado e o precipitado é dissolvido em solução ácida (ácido sulfâmico), o líquido resultante (contendo os parasitos) é suspenso em água e centrifugado, obtendo-se o “pellet” final que será submetido à imunofluorescência (ZARLENGA e TROUT, 2004).

Farias et al (2002) compararam o método de filtração em membrana e floculação na recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água superficial do rio Pirajussara (São Paulo), constatando médias de recuperação de 465 oocistos/L e 270,6/L, respectivamente.

Cantusio (2008) comparou as metodologias de filtração em membrana e floculação (incluindo a separação imunomagnética) em amostras de água superficiais do rio Atibaia. Neste estudo, ambas as metodologias se mostraram eficientes na recuperação dos protozoários *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. Entretanto, os tempos de execução variaram com o método, sendo que na filtração em membrana o tempo decorrido desde o recebimento da amostra e análise de resultados foi de 5 horas

enquanto para floculação, 16 horas. Portanto, verificou-se que a filtração em membrana é indicada pela praticidade, tempo e resultados.

O ensaio de imunofluorescência (IFA) para detectar oocistos de *Cryptosporidium* spp. no ambiente foi desenvolvido em 1985 por Sauch, a partir de uma modificação do método utilizado para detecção de cistos de *Giardia* (ROSE, 1997) em amostras de água.

A imunofluorescência direta utiliza anticorpos monoclonais específicos Anti-*Giardia* e Anti-*Cryptosporidium* conjugados com o fluorocromo Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) que reconhece os epítomos de superfície de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp, respectivamente (JEX et al, 2008).

Este método pode melhorar significativamente a detecção destes protozoários e a diferenciação dos detritos da amostra ambiental quando visualizados na microscopia de epifluorescência com filtro de excitação 450-490nm e filtro de barreira de 520nm para o FITC (ZARLENGA e TROUT, 2004; USEPA, 2005). Por outro lado, organismos que autofluorescem ou demonstram imunofluorescência não-específica, como algas ou leveduras, quando examinadas pela microscopia de epifluorescência, podem interferir na detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp., contribuindo para falsos positivos pelo ensaio de imunofluorescência. (RODGERS et al, 1995; VESEY et al., 1997).

Os anticorpos monoclonais específicos aplicados rotineiramente na detecção e enumeração destes protozoários em ambiente aquático e comercialmente disponíveis, são do tipo IgM para oocistos de *Cryptosporidium* spp. e, subtipos IgG para cistos de *Giardia* spp. (SMITH, 2008, SMITH E GRIMASON, 2003, RODGERS et al, 1995).

Assim, os ensaios imunológicos podem se diferenciar quanto à especificidade e sensibilidade do diagnóstico devido à vários fatores como: a “pureza” dos antígenos do parasito utilizado na produção de anticorpos específicos, a avidéz e a classe e/ou subclasse do anticorpo, o conjugado anticorpo-fluoresceína (GRACZYK et al., 1996; QUÍLEZ et al., 1996; SMITH, 1996; GARCIA e SHIMIZU, 1997; JOHNSTON et al., 2003).

Anticorpos IgM exibem maior coloração não específica comparativamente à IgG, em decorrência da conformação estrutural destes anticorpos: enquanto IgM apresenta

estrutura pentamérica, as imunoglobulinas do tipo IgG são monoméricas e apresentam maior especificidade de ligação (FERRARI et al, 2000).

Outro aspecto que deve ser considerado, é a inclusão do DAPI (4',6-diamidino 2 fenilindol) no método 1623 (USEPA, 2005). Esta etapa pode facilitar a identificação positiva de oocistos de *Cryptosporidium* spp devido à incorporação do corante nos núcleos dos esporozoítos, proporcionando coloração azul (SMITH et al, 2002; GRIMASON et al, 1994). A visualização dos parasitos com DAPI deve ser feita com microscopia de epifluorescência, luz ultravioleta com filtro de excitação de 355 nm e um filtro de barreira de 450 nm (SMITH et al, 2002). A coloração por DAPI (pelo menos 1 núcleo do esporozoíto) e a fluorescência da parede do oocisto, aumentou a porcentagem de identificação dos oocistos para 56%. A microscopia de contraste de fase não é útil na identificação de oocistos em situações nas quais há muitos detritos na amostra, nesses casos, o DAPI é uma ferramenta auxiliar para a confirmação (SMITH et al, 2002).

O método 1623 ainda prevê o uso de separação imunomagnética para promover a separação dos cistos e oocistos das partículas não-alvos, utilizando para isto, partículas magneticamente cobertas com anticorpos específicos, direcionados contra a parede dos oocistos e cistos (USEPA, 2005). Estes anticorpos são denominados de “anticorpos de captura”, pois promovem a captura seletiva dos oocistos e cistos mesmo quando estão presentes em baixas concentrações nas amostras ambientais, separando-os de detritos presentes nestas amostras (JEX et al, 2008; ZARLENGA e TROUT, 2004, CONNELL et al, 2000).

Entretanto, há diferentes taxas de recuperação entre 12 % e 93 % em função das diferentes marcas de kits comerciais de separadores imunomagnéticos, da inclusão e tempo da etapa de dissociação ácida (separação dos protozoários e esferas magnéticas), capacidade de tamponamento dos tampões dos kits, pH da amostra examinada, limitação do volume do sedimento (não superior a 500µL), (KUHN et al, 2002; QUINTERO-BETANCOURT et al, 2002; BUKHARI et al, 1998; ROCHELLE et al, 1999).

Estudos revelaram que um dos fatores críticos para a eficiência do processo de separação imunomagnética é o volume do sedimento, sendo que o seu aumento implica

na diminuição do valor da captura (QUINTERO-BETANCOURT et al., 2003; USEPA, 2005), em águas com material particulado, a eficiência de recuperação diminui à medida que aumenta a turbidez (SAFARIKOVA E SAFARIK, 2001). Os fabricantes recomendam que não seja ultrapassada a proporção de 500 µL do sedimento: 100 µL de esferas ou “beads”. Conseqüentemente, quanto maior o sedimento resultante no final da eluição, maior o custo e tempo de análise, pois há a necessidade de alíquotar o sedimento, e processar individualmente cada uma delas. No entanto, oocistos de *Cryptosporidium* spp. aderem às partículas e exibem baixa hidrofobicidade; quanto maior a turbidez, maior a adesão a elas, prejudicando a eficiência de captura destes organismos. Ressalte-se que *Giardia* spp. tem um “comportamento” hidrofóbico o que pode permitir uma maior recuperação dos cistos (DAI et al, 2004; HSU e HUANG, 2002). Para *Giardia*, Kim et al (2006) recomendam o uso de Tween 20, em substituição ao Tween 80, para a eluição das amostras nas quais o objetivo é recuperar cistos de *Giardia*, por ter um maior balanço hidrofílico-lipofílico que o Tween 80.

Yakub e Stadterman-Knauer (2000) sugerem que a presença de ferro na água teria um efeito inibitório na recuperação destes protozoários, por interferir na etapa de formação dos complexos microesferas-anticorpos e epítomos dos cistos/oocistos durante o procedimento e separação imunomagnética, devido à interação entre o ferro dissolvido e a superfície de cistos e oocistos.

Outro fator que influencia na eficiência da captura de oocistos e cistos é o pH. No procedimento de separação imunomagnética, o pH 7,0 deve ser mantido durante todo o processo. Porém, a estabilidade dos tampões dos kits de IMS varia de acordo com a marca comercial. Desta forma, é imprescindível que a cada etapa, seja feita a mensuração do pH e caso necessário, correções (KUHN et al., 2002). Tempo de rotação, velocidade de rotação, compostos químicos presentes na amostra de água, cátions divalentes, são outros interferentes no processo de IMS (SMITH e NICHOLS, 2009; HU et al, 2004).

Existem outros métodos sofisticados de concentração e visualização de parasitos como centrifugação de fluxo contínuo, citometria de fluxo, hibridização fluorescente *in situ* (FISH), técnicas de PCR-RFLP (“*fragment length polymorphism*”), *fingerprinting*, para amostras ambientais (JEX et al, 2008; ZARLENGA e TROUT, 2004). Entretanto,

apresentam um alto custo que podem limitar seu uso em larga escala para monitoramento ambiental de modo que a imunofluorescência permanece como um dos métodos de referência para pesquisas de protozoários patogênicos na água (JAKUBOWSKI et al, 1996), bem como o método 1623. No caso específico do PCR, o maior obstáculo é a presença de inibidores da reação, que são co-extraídos com o DNA do parasito e inibem a reação de amplificação (XIAO et al, 2001), além do fato de que oocistos e cistos estão usualmente presentes em pequena quantidade nas amostras ambientais o que limita o número de amostras que podem ser amplificadas com sucesso (GASSER e O'DONOUGHUE, 1999).

Enfim, a escolha do método a ser utilizado para a detecção de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. deve ser fundamentada em: qual o propósito da amostragem, a qualidade da água a ser analisada, a infra-estrutura do laboratório onde a análise será conduzida, o tempo consumido e a complexidade do protocolo a ser executado além da sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade (FRICKER e CRABB, 1998). Por este motivo, um fator fundamental a ser levado em consideração na avaliação da performance dos diferentes métodos é a realização de experimentos controles com a inoculação de quantidades conhecidas de cistos e oocistos em alíquotas de água livre de interferências que devem ser submetidas ao mesmo tratamento da amostra ambiental a ser analisada (LINDQUIST et al, 1999). Os resultados de recuperação de protozoários obtidos nesses ensaios devem ser comparados aos critérios de performance estabelecidos nos procedimentos de Controle de Qualidade do Método 1623 (BELLAMY, 2004).

As metodologias existentes atualmente não correspondem a um padrão ótimo de desempenho tanto para a detecção como para avaliação da capacidade infectante de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. Não há um método único que apresente resultados consistentes e satisfatórios frente à ampla variação das condições ambientais como o tipo de amostra, a idade dos cistos e oocistos presentes na água, as características físico-químicas e biológicas do meio (DI GIORGIO et al, 2002).

### 3. OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram:

- 3.1. Verificar a ocorrência dos protozoários *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em amostras de água superficial em diferentes pontos da represa de Salto Grande que abastece a cidade de Americana.
- 3.2. Avaliar a qualidade da água dos pontos amostrados mediante análise dos seguintes parâmetros: - microbiológicos: coliformes totais, termotolerantes e/ou *Escherichia coli*; - parâmetros físico-químicos: turbidez, cor, pH, temperatura.
- 3.3. Comparar a eventual ocorrência destes protozoários nos diferentes pontos de coleta (denominados pontos 1, 2, 3 e 4) e verificar a possível correlação entre a presença de cistos e oocistos com os dados microbiológicos e físico-químicos da água.
- 3.4. Verificar a aplicabilidade do método de filtração em membrana para detecção de *Giardia* e *Cryptosporidium* em amostras de água de um manancial eutrofizado com constante floração de cianobactérias, mediante a determinação da eficiência de recuperação de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. pelo método de filtração em membranas.
- 3.5. Comparar de forma qualitativa, a aplicabilidade de dois kits comerciais (Merifluor<sup>®</sup> Meridian Bioscience Diagnostics, Cincinnati, Ohio e Crypto/Giardia-Cel I.F.Test<sup>®</sup>, CELLABS PTY, LTD, Austrália) de anticorpos monoclonais utilizados para a detecção destes protozoários patogênicos em amostras de água bruta em ambiente eutrofizado com presença de florações de cianobactérias.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Protozoologia do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (análises parasitológicas) e no laboratório de Microbiologia da Sanasa onde foram realizados os ensaios microbiológicos: - coliformes totais, termotolerantes e *Escherichia coli*; - físico-químicos: turbidez, pH, cor; - rastreamento e contagem de cianobactérias.

### 4.1 Caracterização do local de coleta.

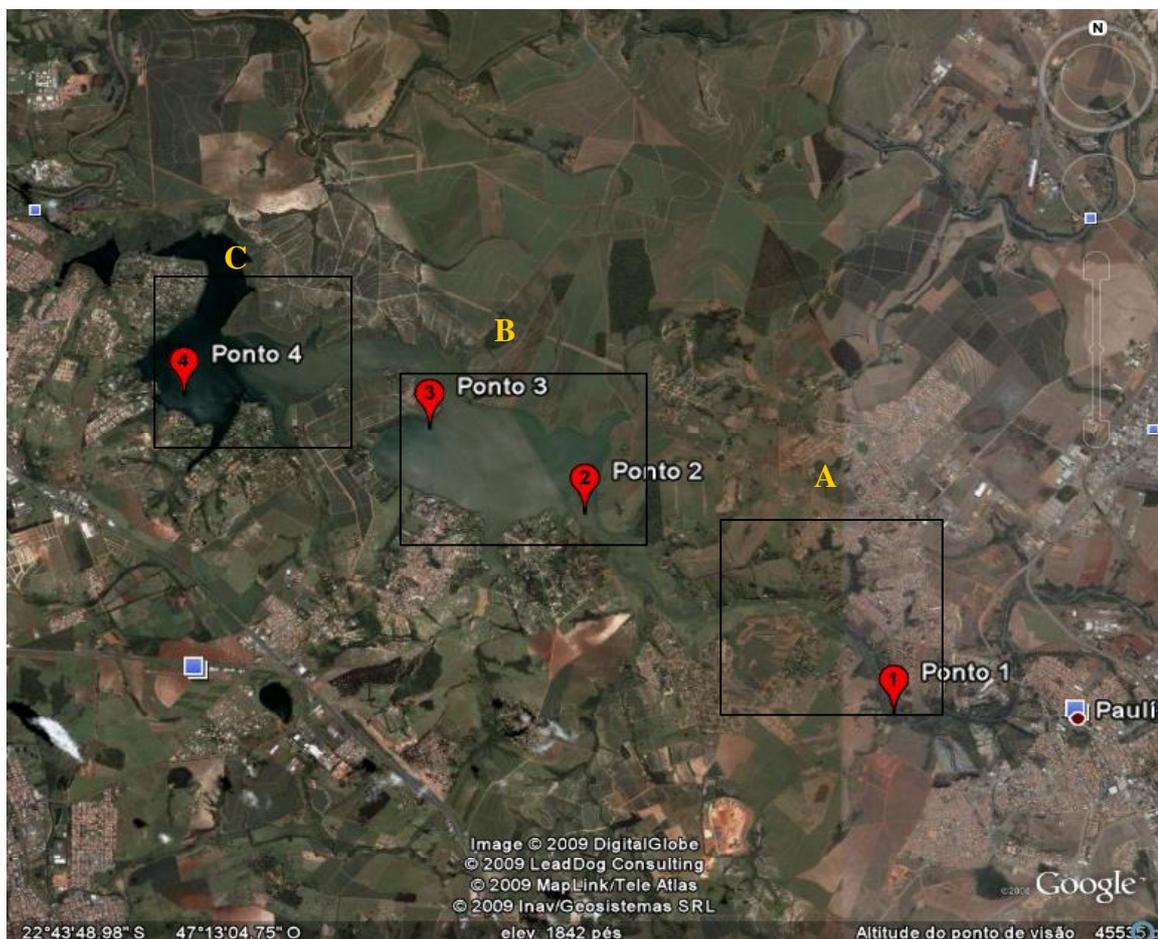
A colheita das amostras de água foi realizada em diferentes pontos da represa de Salto Grande no município de Americana-SP, nos principais compartimentos do reservatório (Fig. 4).

O critério para a escolha dos pontos foi baseado em Coelho (1993) segundo o qual, o reservatório é dividido em três compartimentos distintos formados em função da topografia de fundo, profundidade máxima e distribuição de sedimentos (Fig.4), como segue:

- O primeiro compartimento é denominado “Mini Pantanal” e localiza-se na porção superior do reservatório entre os municípios de Paulínia, Nova Odessa e Americana, considerada como “proteção permanente” (Pegoraro, 2003). No caso deste estudo, o ponto 1 está incluído nesta região (Fig.5).
- O segundo compartimento localiza-se entre Saltinho e Salto do Foguete caracterizado pelo assoreamento. Neste estudo, os pontos 2 e 3 se localizam neste compartimento (Fig.6 e 7).
- O terceiro compartimento entre o Salto do Foguete e a barragem apresentando menores espessuras de assoreamento em razão da distância da principal fonte de sedimentos (rio Atibaia). Neste estudo, o ponto 4 se localiza neste compartimento (Fig.8).

Desta forma, os quatro pontos de coleta foram (Fig. 4):

- Ponto 1: Mini-Pantanal (georeferenciamento: S22<sup>0</sup>45'6";W 47<sup>0</sup>10'6");
- Ponto 2: Saltinho (georeferenciamento: S 22<sup>0</sup>44'6"; W 047<sup>0</sup>13'0");
- Ponto 3: Praia Azul (georeferenciamento: S22<sup>0</sup>43'4"; W 047<sup>0</sup>14'2");
- Ponto 4: late Clube (georeferenciamento: S22<sup>0</sup>43'1"; W 047<sup>0</sup>16'1").



**Figura 4 - Localização dos pontos de coleta nos compartimentos do reservatório de Salto Grande, Americana-SP.**

Fonte: Google Earth

Legenda:

Ponto 1- Mini-Pantanal (Fig.5)

Ponto 2- Garganta da represa (Fig.6)

Ponto 3- Praia Azul (Fig.7)

Ponto 4- late Clube (Fig.8)

A-Primeiro Compartimento

B-Segundo Compartimento

C-Terceiro Compartimento



**Figura 5 - Ponto 1: Mini Pantanal (maio/2008)**



**Figura 6 - Ponto 2: Saltinho (maio/2008)**



**Figura 7- Ponto 3: Praia Azul (maio/2008)**



**Figura 8 - Ponto 4: late Clube (maio/2008)**



**Figura 9 - Floração de cianobactérias nos pontos 3 e 4 (nov/2006).**

## **4.2 Análise das amostras de água**

### **4.2.1 Coleta das amostras.**

Foram colhidos volumes de 5L de água bruta superficial de cada ponto de coleta incluído no estudo, em galões de polipropileno previamente enxaguados com solução de eluição contendo Tween a 0,1% com a finalidade de diminuir a aderência de oocistos e cistos nas paredes do recipiente, em aproximadamente 20 cm de profundidade, uma vez por mês e no período de 12 meses (janeiro a dezembro de 2008).

### **4.2.2 Análise Microbiológica e Físico-Química das amostras de água.**

Para as análises microbiológicas, foram feitas coletas de água superficial em frascos de polipropileno de 250 ml, previamente lavados com detergente não tóxico, enxaguados com água de torneira e água destilada (último enxague), esterilizados em autoclave durante 15 minutos, à 121°C.

Para neutralização de eventuais resíduos de cloro e metais pesados foram adicionados, antes da esterilização, 0,1ml de solução de tiosulfato de sódio a 1,8% e 0,3 ml de EDTA (etileno-diamino-tetra acetato de sódio) a 5%, para cada 100 ml de amostra colhida; foram empregadas as técnicas de tubos múltiplos de acordo com os procedimentos do “Standard Methods” (APHA, 2005), visando determinar a ocorrência de coliformes totais, termotolerantes e/ou *Escherichia coli* nas diversas amostras.

Para as análises físico-químicas, as coletas foram feitas em frascos de vidro âmbar de 1 L, previamente lavados, sem preservantes; as amostras foram analisadas no laboratório de Físico-Química da Sanasa com os seguintes aparelhos: turbidímetro (HACH) para turbidez, DR 2500 (HACH) para cor e pHmetro (DIGIMED) para pH, de acordo com os procedimentos do “Standard Methods” (APHA, 2005). A temperatura foi medida com termômetro de mercúrio Incoterm<sup>®</sup>, logo em seguida à coleta da amostra de água, no campo.

### 4.2.3 Análise de cianobactérias.

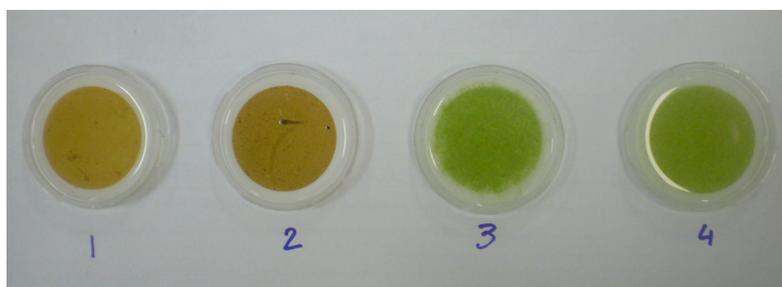
Para a análise de cianobactérias, foram coletadas amostras de água superficial em vidro âmbar de 1L, previamente lavados, sem preservantes. O método de contagem de células de cianobactérias foi feito por sedimentação em câmara de Utermöhl, empregando microscópio invertido e retículo de Whipple (CETESB, Normalização técnica-NT-06.L5.303, 2005 (realizada pelo laboratório de Microbiologia da Sanasa).

### 4.2.4 Análise Parasitológica

#### 4.2.4.1 Método de Filtração em Membrana.

As amostras de água foram examinadas pela técnica de filtração em membranas de ésteres mistos de celulose (47 mm de diâmetro, porosidade nominal de 3µm, Millipore) de acordo com Franco et al, 2001. O sistema de filtração utilizado foi uma bomba de vácuo ajustada a um fluxo de 4 L/min e porta-filtro Gelman<sup>®</sup>.

A eluição dos parasitos foi realizada mediante extração mecânica e lavagem, alternadamente durante 20 minutos, empregando-se solução de eluição contendo Tween 80 a 0, 1%. O material eluído foi submetido à centrifugação (1050 x *g*) por duas vezes. Os sedimentos obtidos após descarte do sobrenadante, foram analisados mediante a técnica de imunofluorescência direta, empregando anticorpos monoclonais específicos.



**Figura 10 - Filtração em membranas das amostras de água superficial dos pontos 1, 2, 3 e 4.**

#### 4.2.4.2 Detecção dos parasitos.

Alíquotas de 10µL do sedimento final obtido das diversas amostras, foram colocadas nos poços da lâmina de imunofluorescência. Após secagem por 30 minutos em temperatura ambiente, o material biológico foi fixado com 10µL de metanol, previamente à realização de Reação de Imunofluorescência Direta (RID).

Com a finalidade de comparação qualitativa, dois kits comerciais foram utilizados: - Merifluor<sup>®</sup> (Meridian Bioscience Diagnostics, Cincinnati, Ohio) e Crypto/Giardia-Cel I.F.Test<sup>®</sup> (CELLABS PTY, LTD, Austrália), empregados de acordo com as instruções dos fabricantes. Ao utilizar-se o kit Crypto/Giardia-Cel I.F. Test<sup>®</sup>, a secagem do material biológico na lâmina e a incubação com os anticorpos monoclonais foram realizadas em estufa a 37°C. O tempo de incubação dos anticorpos foi de 30 minutos, para ambos os kits.

Após a incubação com anticorpos monoclonais, outra etapa foi realizada para complementar a identificação dos cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp.; foram adicionados 20 µL do corante vital DAPI (4', 6'- diamidino-2-fenilindol) Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, na concentração de 1:5.000, por 10 minutos, o qual é incorporado no núcleo dos esporozoítos do oocisto ou núcleos dos cistos, cujas paredes apresentam permeabilidade ao corante. Esta etapa está incluída no método 1623 de USEPA (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos) (USEPA, 2005).

As lâminas foram visualizadas com aumento de 400x a 600x no microscópio de epifluorescência (Nikon50i) com filtro de excitação 450-490nm e um filtro de barreira de 520nm (para FITC- Isotiocianato de Fluoresceína); para DAPI, utiliza-se luz ultravioleta com filtro de excitação de 355 nm e um filtro de barreira de 450 nm.

Os critérios de positividade para cistos e oocistos foram baseados naqueles estabelecidos pela USEPA (2006), como segue:

- fluorescência maçã-verde brilhante, predominante na parede dos cistos e oocistos (aparência de “anel”).
- tamanho de cistos (8 a15 µm) e para oocistos (3,0 a 8,5 µm)
- formato de ovóide a esférico.

- presença de axonema em *Giardia* e presença eventual de sutura em *Cryptosporidium*.
- Microscopia de contraste de fase: presença de até 4 esporozoítos nos oocistos. Para cistos de *Giardia* são considerados os núcleos (até 4), presença de axonemas e dos corpos em crescente (VIANA, 2008).

#### **4.2.4.2.1 Purificação dos protozoários mediante separação imunomagnética.**

As amostras em que a presença de cianobactérias foi registrada, foram submetidas ao processo de separação imunomagnética, previamente à reação de imunofluorescência direta. A etapa de separação imunomagnética foi adicionada ao protocolo de filtração em membranas como um procedimento de purificação dos organismos-alvo, considerando que a maioria das algas e algumas cianobactérias exibem fluorescência semelhante àquela dos cistos e oocistos após reação de imunofluorescência com anticorpos monoclonais marcados com fluoresceína, indicando que epítopos das cianobactérias reagem com estes anticorpos (RODGERS et al, 1995).

Assim, a presença de organismos semelhantes que apresentam fluorescência similar aos cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. aumenta a probabilidade de resultados falso-positivos.

Esta etapa ainda foi empregada nos ensaios-controle, visando avaliar se este procedimento acarreta melhores taxas de recuperação dos organismos. Após o processo de filtração em membrana e raspagem, o sedimento final foi alíquotado e examinado com e sem IMS.

A purificação por separação imunomagnética compreende três etapas: (1) a captura de cistos e oocistos eventualmente presentes nas amostras, pelo anticorpo de captura que reveste as microesferas paramagnéticas (Fig. 11); (2) o arraste dos complexos protozoários-anticorpos-microesferas, durante a agitação empregando imã. Nesta fase, as sujidades são separadas dos organismos-alvo; (3) dissociação ácida para romper os complexos formados, promovendo a concentração dos protozoários na alíquota que será transferida para a lâmina e examinada mediante RID. De acordo com as instruções do fabricante, os anticorpos com micro-esferas (magnetizadas) anti-

*Giardia* e anti-*Cryptosporidium* (Dynabeads GC-Combo<sup>®</sup>) foram incubadas com o concentrado da amostra (até 500 µL de sedimento) para que os anticorpos se ligassem aos cistos e oocistos da amostra formando um complexo.

Este foi separado usando um Concentrador Magnético de Partículas (MPC<sup>®</sup>) e posteriormente, separado por dissociação ácida (solução de 0,1 N HCl) e neutralizado por NaOH 1N.

Ao final do procedimento de separação imunomagnética, as alíquotas resultantes (50 µL) foram submetidas à reação de imunofluorescência direta empregando o kit Merifluor<sup>®</sup> (Meridian Bioscience Diagnostics, Cincinnati, Ohio).



Fonte: <http://www.invitrogen.com.br>

**Figura 11- Foto da microesfera paramagnética.**

#### 4.2.4.3 Estimativa do número de cistos e oocistos presentes em um litro da amostra (FRANCO et al, 2001)

Para se estimar o número de organismos em um litro da amostra, foi utilizada a seguinte equação:

$$F = \frac{A}{C} \times \frac{B}{D} \quad (1), \text{ onde:}$$

F= número de (oo)cistos por litro

A= nº de (oo)cistos encontrados na amostra

B= volume do sedimento, após centrifugação ( $\mu\text{L}$ )

C= volume alíquota semeada na lâmina de imunofluorescência ( $\mu\text{L}$ )

D= volume total filtrado da amostra (L)

#### 4.2.4.4 Determinação da sensibilidade da Técnica de Filtração em Membranas.

Para se avaliar a sensibilidade da metodologia empregada neste estudo, foram realizados ensaios-controles negativos e positivos, como segue:

##### 4.2.4.4.1 Ensaios-controle negativos:

Com a finalidade de atestar a eficácia dos procedimentos de descontaminação empregados no laboratório, após a filtração de cada amostra de água da represa, efetuou-se a filtração de 1 litro de água reagente (Milli Q<sup>®</sup>, Millipore). Estas amostras foram submetidas ao mesmo procedimento de eluição empregado para análise parasitológica da água superficial da represa (eluição por extração mecânica e reação de imunofluorescência direta).

#### **4.2.4.4.2 Ensaios-controle positivos:**

Nos ensaios-controle positivos, foram inoculados um número conhecido de cistos e oocistos em 1 litro de amostra (água bruta superficial). Para determinar o número de cistos e oocistos, previamente à contaminação artificial da amostra, foi realizada uma contagem dos protozoários presentes em 3 alíquotas de 10µl da suspensão “controle positivo” do kit Merifluor. Estas alíquotas foram examinadas por reação de imunofluorescência e foi considerada a média do número de formas parasitárias para cálculo da dose empregada para contaminação das amostras-controle.

Inicialmente, foram realizados 4 ensaios-controle positivos, empregando-se como amostra, água superficial da represa, colhida no ponto 2, sendo correspondente cada ensaio, à uma estação do ano (verão, outono, inverno, primavera).

A escolha deste ponto para a realização dos ensaios-controle positivos justifica-se pelo fato de que é justamente neste ponto que se inicia o represamento das águas e que dos pontos localizados em ambientes lóticos é o que sofre a menor influência do rio Atibaia. Também, pretendeu-se constatar um eventual efeito da sazonalidade na qualidade da água da represa.

Posteriormente, foram efetuados ensaios-controle considerados os 4 pontos de coleta (n=1).

Neste estudo, não foi utilizada a suspensão comercial ColorSeed<sup>®</sup> devido ao seu alto custo.

#### 4.2.4.4.3 Determinação da sensibilidade da técnica (eficiência de recuperação).

Para estimar a eficiência de recuperação (E.R%) dos organismos-alvo considerando-se a técnica de filtração em membranas empregada neste estudo, foi utilizada a seguinte equação:

$$E.R(\%) = \frac{X - Y}{W} \quad (2), \text{ onde:}$$

X= número de (oo)cistos por litro do ensaio controle positivo

Y= número de (oo)cistos por litro na amostra bruta

W= número de (oo)cistos inoculados por litro na amostra

### 4.3 Análise Estatística

Para verificar se houve diferença significativa entre as médias dos valores dos parâmetros físico-químicos e biológicos nos pontos de coleta (P1, P2, P3 e P4) e estações do ano, foi realizada a Análise de Variância (ANOVA) de dois fatores com nível de significância de 95%. Os meses foram agrupados em estações: janeiro, fevereiro, março (verão), abril, maio e junho (outono), julho, agosto e setembro (inverno), outubro, novembro e dezembro (primavera). Os pontos 1 e 2 foram agrupados em ambiente lótico, pontos 3 e 4 em ambiente lêntico.

Nos testes significativos foi feito o Teste de Comparação Múltipla de Médias (Teste de Duncan); para testar as diferenças entre as médias, um teste paramétrico, localizando-as por meio de diferentes agrupamentos (letras A ou B), sendo adotado o nível de significância de 95%

A escolha deste teste fundamentou-se na comparação múltipla de médias dos parâmetros analisados de cada ponto de coleta, testando a homogeneidade do grupo (Ponto 1, Ponto 2, Ponto 3 e Ponto 4), cuja diferença entre os pontos pode ser significativa ou não.

Entretanto, os valores de pH por serem medianas, aplicou-se o gráfico Box-plot para verificar a distribuição dos valores e a tendência para a acidez ou alcalinidade. Para isso, foi utilizado o programa BioEstat 2.0.

O teste Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) foi aplicado para verificar qual tipo de relação (dependência ou independência) entre as variáveis estudadas (parâmetros físico-químicos e biológicos) dos 4 pontos de coleta (P1, P2, P3 e P4), sendo adotado nível de significância de 95%.

Também foi utilizada a análise de Correlação de Pearson ou Coeficiente  $r$  de Pearson para verificar a existência de correlação (positiva ou negativa e probabilidade menor que 5%) entre os parâmetros físico-químicos e biológicos analisados referentes a cada ponto de coleta (P1, P2, P3 e P4).

O programa SAS Inc. 2009 for Microsoft Windows Professional. Versão 9.1. Cary, NC, 1028p foi utilizado para ANOVA, Teste de Duncan, Qui-quadrado e Correlação de Pearson.

#### **4.4 Comparação qualitativa dos kits comerciais de anticorpos monoclonais.**

Para a comparação qualitativa dos dois kits comerciais de anticorpos utilizados: Merifluor<sup>®</sup> (Meridian Bioscience Diagnostics, Cincinnati, Ohio) e Crypto/Giardia-Cel I.F.Test<sup>®</sup> (CELLABS PTY, LTD, Austrália), foram considerados os seguintes parâmetros: cor e intensidade de fluorescência, ausência de difusão da fluorescência, predominância de fluorescência na parede de cistos e oocistos, para os quais estabeleceu-se um *score* de pontuação (++++= muito bom, +++= bom, += fraco), como descrito na tabela 27. A comparação tomou-se por base amostras naturais e controle-positivas.

## 5. RESULTADOS

Os resultados são apresentados separadamente por ponto de coleta (P1, P2, P3, P4) para os parâmetros físico-químicos (cor, turbidez, pH e temperatura) e microbiológicos (coliformes totais, termotolerantes e *Escherichia coli*), assim como para a ocorrência de células de cianobactérias, objetivando-se a caracterização de cada ponto.

Os resultados parasitológicos referentes à ocorrência e concentração de cistos de *Giardia* spp. e de oocistos de *Cryptosporidium* spp. são apresentados considerando-se todos os pontos de coleta simultaneamente, tendo por finalidade a análise comparativa entre eles.

Em relação à ocorrência de células de cianobactérias, a contagem foi realizada somente nos pontos 3 e 4, que correspondem à região do represamento.

Quanto à análise estatística, foram consideradas as Análises de variância, Teste de Duncan e Qui-quadrado, e Correlação de Pearson, entre os parâmetros físico-químicos e biológicos, considerados os quatro pontos de coleta, as diferentes estações do ano e ambientes lótico (P1 e P2) e lêntico (P3 e P4).

É importante ressaltar que o monitoramento dos protozoários foi realizado com periodicidade mensal durante um ano (de janeiro a dezembro de 2008) o que gerou um número pequeno de dados e conseqüentemente influenciando na análise estatística.

## **5.1 Caracterização dos pontos 1, 2, 3 e 4.**

### **5.1.1 Ponto 1: Mini-Pantanal.**

Em conjunto, foram observados maiores valores médios de turbidez, cor e de indicadores microbiológicos (Tabela 4) em comparação às médias para estes parâmetros nos outros pontos.

As amostras de água superficial deste ponto apresentaram altos valores de cor e turbidez, devido à ocorrência de chuvas nos dias que antecederam as coletas nos meses de janeiro, março, abril, maio, junho e outubro de 2008.

Em relação à cor, os maiores valores foram nos meses de janeiro, fevereiro, abril, maio, junho, agosto e dezembro, exercendo influência na média gerando um desvio padrão de 315,09. No ponto 1, o parâmetro cor apresentou média superior (368,1 mgPt/L) aos demais pontos (ponto 2: 349,7 mgPt/L; ponto 3: 285,9 mgPt/L; ponto 4: 148,6 mgPt/L) (Tabela 4).

Os maiores valores de turbidez foram registrados nos meses de janeiro, fevereiro e maio o que exerceu influência na média gerando desvio-padrão alto (52,92) (Tabela 4).

A turbidez apresentou média superior (53,21 NTU) comparativamente aos valores médios dos demais pontos de coleta (ponto2: 43,16 NTU; ponto 3: 46,91 NTU; ponto 4: 30,34 NTU) (Tabela 4).

Quanto à temperatura da água superficial, temperaturas mais elevadas foram observadas nos meses de janeiro, fevereiro, março, abril, julho, outubro, novembro e dezembro, coincidindo com os meses mais quentes do ano; como por exemplo, o mês de janeiro (29°C) temperaturas mais amenas ocorreram apenas nos meses de maio, junho e setembro, como por exemplo no mês de agosto (19 °C).

Na análise dos valores de pH, verificou-se que em 10 meses, os valores de pH situaram-se ao redor da neutralidade (6.93 a 7.5) (Tabela 4).

O monitoramento dos indicadores microbiológicos durante o período do estudo comprovou a expressiva contribuição de esgotos domésticos (coliformes termotolerantes entre  $10^4$  e  $10^5$  NMP/100 ml) promovendo alteração na qualidade da água superficial

neste ponto. As concentrações médias de coliformes (totais, termotolerantes) e/ou *E.coli*, foram mais altas comparativamente aos demais pontos. Considerando o parâmetro microbiológico *E.coli*, em 83,3 % das amostras analisadas, a concentração desta bactéria foi maior que  $10^2$  NMP/100ml.

O rastreamento de cianobactérias foi realizado no ponto 1, porém devido à ausência de florações (neste ponto) não foi realizada a contagem de cianobactérias.

Tabela 4 - Valores mensais e médias aritméticas dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos referentes às amostras de água bruta superficial do ponto 1, da Represa de Salto Grande, Americana-SP.

Meses	Cor Aparente (mg Pt/L)	Turbidez (NTU)	pH	Temperatura (°C)	Coliformes (NMP/100mL)			Densidade de cianobactérias
					Totais	Termotolerantes	<i>E.coli</i>	
Janeiro	993	165	7,05	29	2,7x10 <sup>4</sup>	9,0x10 <sup>3</sup>	7,0x10 <sup>3</sup>	NA
Fevereiro	705	95	7,07	28	1,3x10 <sup>5</sup>	2,2x10 <sup>4</sup>	1,1x10 <sup>4</sup>	NA
Março	196	23,7	7,11	30	1,7x10 <sup>5</sup>	2,1x10 <sup>4</sup>	2,2x10 <sup>3</sup>	NA
Abril	234	32,4	7,12	24	5,0x10 <sup>4</sup>	1,4x10 <sup>4</sup>	1,4x10 <sup>4</sup>	NA
Maiο	906	145	7,27	20	1,1x10 <sup>5</sup>	1,3x10 <sup>4</sup>	1,2x10 <sup>3</sup>	NA
Junho	222	27,8	7,42	20	7,0x10 <sup>6</sup>	1,3x10 <sup>5</sup>	3,0x10 <sup>4</sup>	NA
Julho	107	14	7,15	22	1,1x10 <sup>4</sup>	1,7x10 <sup>3</sup>	9,0x10 <sup>2</sup>	NA
Agosto	241	32,1	7,18	19	2,7x10 <sup>4</sup>	1,4x10 <sup>4</sup>	9,0x10 <sup>3</sup>	NA
Setembro	106	8,6	7,47	20	2,6x10 <sup>4</sup>	1,1x10 <sup>4</sup>	1,4x10 <sup>3</sup>	NA
Outubro	161	17,7	6,95	24	1,7x10 <sup>4</sup>	9,0x10 <sup>2</sup>	9,0x10 <sup>2</sup>	NA
Novembro	184	22,2	7,5	22	8,0x10 <sup>3</sup>	5,0x10 <sup>3</sup>	5,0x10 <sup>3</sup>	NA
Dezembro	362	55	6,93	25	3,0x10 <sup>4</sup>	1,4x10 <sup>3</sup>	1,4x10 <sup>3</sup>	NA
Média aritmética*	368,1	53,21	7,13	23,58	6,3x10 <sup>5</sup>	2,0x10 <sup>4</sup>	7,0x10 <sup>3</sup>	
Desvio padrão	315,09	52,92	0,19	3,77	20,0x10 <sup>5</sup>	3,5x10 <sup>4</sup>	8,5x10 <sup>3</sup>	
Valor mínimo	106	8,6	6,93	19	8,0x10 <sup>3</sup>	9,0x10 <sup>2</sup>	9,0x10 <sup>2</sup>	
Valor máximo	993	165	7,5	30	7,0x10 <sup>6</sup>	1,3x10 <sup>5</sup>	3,0x10 <sup>4</sup>	

NA: não analisado

\*ou mediana para pH

### 5.1.2 Ponto 2: Saltinho

De forma similar ao observado no ponto 1, ocorreram no ponto 2 valores médios altos de cor e indicadores microbiológicos (Tabela 5).

A cor apresentou média superior (349,7 mgPt/L) comparativamente aos pontos 3: 285,9 mgPt/L e ponto 4: 148,6 mgPt/L.

Os maiores valores de turbidez foram registrados nos meses de janeiro, fevereiro, março e maio; enquanto os dois menores valores foram observados em setembro e outubro (12,1 e 12,8 NTU) (Tabela 5). A turbidez apresentou média inferior (43,16 NTU) comparativamente aos valores médios dos demais pontos de coleta (ponto 1: 53,21 NTU; ponto 3: 46,91 NTU), porém foi superior ao ponto 4 (30,34 NTU) (Tabela 5).

Quanto à temperatura da água superficial, temperaturas mais elevadas (>20°C) foram observadas nos meses de janeiro, fevereiro, março, abril, julho, setembro, outubro, novembro e dezembro, coincidindo com os meses mais quentes do ano; temperaturas mais amenas ocorreram apenas nos meses de maio, junho e agosto.

Na análise dos valores de pH, verificou-se que nos 10 meses, os valores de pH situaram-se ao redor da neutralidade (6.90 a 7.35) (Tabela 5).

Os valores dos indicadores microbiológicos permaneceram altos (coliformes totais:  $7,3 \times 10^4$  NMP; coliformes termotolerantes:  $1,2 \times 10^4$  NMP, *E.coli*:  $4,9 \times 10^3$  NMP), comparativamente aos pontos 3 e 4 e em condição similar ao ponto 1. Estas altas concentrações são devido à influência do rio Atibaia neste ponto e à presença de animais domésticos na região.

O rastreamento de cianobactérias foi realizado no ponto 2, porém devido à ausência de florações neste ponto, não foi realizada a contagem de cianobactérias.

Tabela 5 - Valores mensais e médias aritméticas dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos referentes às amostras de água bruta superficial do ponto 2, da Represa de Salto Grande, Americana-SP.

Meses	Cor Aparente (mg Pt/L)	Turbidez (NTU)	pH	Temperatura (°C)	Coliformes (NMP/100mL)			Densidade de cianobactérias
					Totais	Termotolerantes	<i>E.coli</i>	
Janeiro	858	96,6	7,01	29	9,0x10 <sup>4</sup>	3,0x10 <sup>4</sup>	5,0x10 <sup>3</sup>	N.A
Fevereiro	720	93	7,03	28	8,0x10 <sup>4</sup>	3,0x10 <sup>4</sup>	1,3x10 <sup>4</sup>	N.A
Março	451	64,7	7,14	30	6,0x10 <sup>4</sup>	5,0x10 <sup>4</sup>	8,0x10 <sup>3</sup>	N.A
Abril	287	41	7,01	24	9,0x10 <sup>4</sup>	6,0x10 <sup>3</sup>	2,0x10 <sup>2</sup>	N.A
Maiο	516	70	7,22	20	5,0x10 <sup>4</sup>	2,6x10 <sup>3</sup>	6,0x10 <sup>2</sup>	N.A
Junho	179	20,7	7,29	20	1,7x10 <sup>4</sup>	3,3x10 <sup>3</sup>	2,6x10 <sup>3</sup>	N.A
Julho	191	27,7	7,14	22	1,7x10 <sup>5</sup>	7,0x10 <sup>3</sup>	1,4x10 <sup>2</sup>	N.A
Agosto	233	23,6	7,17	19,5	3,0x10 <sup>5</sup>	2,2x10 <sup>4</sup>	2,6x10 <sup>4</sup>	N.A
Setembro	145	12,1	7,35	21	5,0x10 <sup>3</sup>	1,3x10 <sup>3</sup>	1,3x10 <sup>3</sup>	N.A
Outubro	156	12,8	7,04	25	8,0x10 <sup>3</sup>	1,4x10 <sup>3</sup>	1,4x10 <sup>3</sup>	N.A
Novembro	243	25,9	7,16	23	5,0x10 <sup>3</sup>	4,0x10 <sup>2</sup>	2,0x10 <sup>2</sup>	N.A
Dezembro	217	29,8	6,9	26	5,0x10 <sup>3</sup>	8,0x10 <sup>2</sup>	4,0x10 <sup>2</sup>	N.A
Média aritmética*	349,7	43,16	7,14	23,95	7,3x10 <sup>4</sup>	1,2x10 <sup>4</sup>	4,9x10 <sup>3</sup>	
Desvio padrão	236,20	30,17	0,12	3,67	8,7 x10 <sup>6</sup>	1,6 x10 <sup>4</sup>	7,7 x10 <sup>5</sup>	
Valor mínimo	145	12,1	6,9	19,5	5,0x10 <sup>3</sup>	4,0x10 <sup>2</sup>	1,4x10 <sup>2</sup>	
Valor máximo	858	96,6	7,35	30	9,0x10 <sup>4</sup>	5,0x10 <sup>4</sup>	2,6x10 <sup>4</sup>	

NA: não analisado

\*ou mediana para pH

### 5.1.3 Ponto 3: Praia Azul

Neste ponto, no mês de janeiro apresentou valor de cor (1570 mgPt/L) maior que os registrados para os outros pontos, porém, o valor médio (285,9 mgPt/L) foi menor comparativamente aos pontos 1 e 2 .

Em relação à turbidez, o valor médio (46,91 NTU) foi maior que aqueles referentes aos pontos 2 e 4 (Tabelas 5, 6 e 7).

Quanto à temperatura da água superficial, temperaturas mais elevadas (>20°C) foram observadas em 10 meses do ano, e as mais amenas ocorreram apenas nos meses de agosto e setembro (Tabela 6).

Na análise de pH, em 5 meses de coleta, a água deste ponto apresentou tendência à alcalinidade (pH: 8.90-9.67) sendo que em apenas 2 meses o pH aproximou-se do neutro (7.0 e 7.07). Estes foram os maiores valores de pH registrados neste estudo, conjuntamente com a amostra coletada no mês de dezembro, no ponto 4 (Tabelas 6 e 7). Para estes parâmetros, ocorreram maiores valores médios comparativamente aos pontos 1 e 2 (Tabelas 4, 5,6 e 7), porém menores que o ponto 4.

Os valores médios dos coliformes totais ( $3,2 \times 10^3$  NMP/100 ml), coliformes termotolerantes ( $5,31 \times 10^2$  NMP/100 ml); *E.coli* ( $2,9 \times 10^1$  NMP/100 ml) foram menores comparativamente aos pontos 1 e 2, porém, maiores que os valores do ponto 4 (Tabelas 6 e 7)

Nos meses de julho, agosto, outubro e novembro, foram registrados valores anômalos para os indicadores microbiológicos em consequência à abundância de macrófitas e ao processo de sedimentação neste ponto. No mês de agosto/2008, não foi possível a realização da análise destes indicadores, devido à problemas técnicos do laboratório.

Ainda neste ponto, ocorreu floração de cianobactérias (702.706 células/ml), sendo que o valor máximo foi de 2.313.718 células/ml.

Tabela 6 - Valores mensais e médias aritméticas dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos referentes às amostras de água bruta superficial do ponto 3, da Represa de Salto Grande, Americana-SP.

Meses	Cor Aparente (mg Pt/L)	Turbidez (NTU)	pH	Temperatura (°C)	Coliformes (NMP/100mL)			Densidade de cianobactérias
					Totais	Termotolerantes	<i>E.coli</i>	
Janeiro	1570	232	9,67	28	2,4x10 <sup>4</sup>	5,0x10 <sup>3</sup>	1,3x10 <sup>2</sup>	2.313.718
Fevereiro	306	45,5	7,33	29	2,4x10 <sup>3</sup>	7,0x10 <sup>1</sup>	4,0x10 <sup>1</sup>	38.539
Março	198	29,2	7,18	29	5,0x10 <sup>3</sup>	1,1x10 <sup>3</sup>	2,0x10 <sup>1</sup>	N.A
Abril	146	29	8,9	26	8,0x10 <sup>1</sup>	2,0x10 <sup>1</sup>	<2	286.896
Maiο	144	20,7	7,11	22	3,0x10 <sup>3</sup>	9,0x10 <sup>1</sup>	7,0x10 <sup>1</sup>	170.114
Junho	170	37,6	7,27	22	3,0x10 <sup>2</sup>	2,0x10 <sup>1</sup>	2,0x10 <sup>1</sup>	900.012
Julho	253	57,1	8,97	22	1,3x10 <sup>3</sup>	<2,0	<2	1.328.230
Agosto	82	32,1	7,1	20,5	-	-	-	N.A
Setembro	177	17,4	8,96	20	2,0x10 <sup>1</sup>	2,0x10 <sup>1</sup>	2,0x10 <sup>1</sup>	28.823
Outubro	70	6,2	7,07	25	5,0x10 <sup>3</sup>	<2,0	<2	N.A
Novembro	223	40,2	9,22	25	2,2x10 <sup>2</sup>	4,0x10 <sup>1</sup>	4,0x10 <sup>1</sup>	1.253.648
Dezembro	92	15,9	7,0	26	2,2x10 <sup>2</sup>	<2	<2	N.A
Média aritmética*	285,9	46,91	7,3	24,54	3,2x10 <sup>3</sup>	5,3x10 <sup>2</sup>	2,9x10 <sup>1</sup>	527.029
Desvio padrão	410,41	59,94	1,04	3,20	6,7 x10 <sup>6</sup>	14,4 x10 <sup>2</sup>	38,2	756.138,1549
Valor mínimo	70	6,2	7,0	20	2	2	2	28.823
Valor máximo	1570	232	9,67	29	2,4x10 <sup>4</sup>	5,0x10 <sup>3</sup>	1,3x10 <sup>2</sup>	2.313.718

N.A: não analisado

\*ou mediana para pH

#### 5.1.4 Ponto 4: Iate Clube

O valor médio do parâmetro cor (148,6 mgPt/l) foi menor comparativamente aos outros pontos (1,2 e 3), sendo registrado um valor alto somente no mês de janeiro (445 mgPt/l) similarmente ao ponto 3 (Tabelas 6 e 7).

Quanto à turbidez, o valor médio foi menor (30,34 NTU) que aqueles registrados nos pontos 1,2 e 3 (Tabela 7).

Em relação à temperatura da água superficial, temperaturas mais elevadas (>20°C) predominaram em todos os meses de coleta, exceto no mês de agosto (Tabela 7).

Em relação ao pH, em 10 meses, os valores tenderam à alcalinidade (pH: 7.12 – 9.87) e 2 meses o pH foi neutro (6.92 e 7.09). Estes valores foram mais elevados comparativamente aos valores dos pontos 1 e ponto 2, porém semelhantes àqueles registrados no ponto 3 (Tabela 7).

Já os indicadores microbiológicos, as concentrações de coliformes totais ( $2,8 \times 10^2$  NMP/100 ml), coliformes termotolerantes ( $1,61 \times 10^1$  NMP/100 ml) e *E.coli* (6,33 NMP/100 ml) foram menores que os valores dos pontos 1, 2, 3 e 4 (Tabelas 4, 5, 6 e 7).

Valores anômalos para os coliformes registrados nos meses de fevereiro, março, abril, junho, julho, agosto, outubro, novembro e dezembro, devido à abundância de macrófitas e ao processo de sedimentação neste ponto. Ressalte-se que no mês de agosto/2008, não foi possível a realização da análise destes indicadores, devido à problemas técnicos.

O rastreamento e contagem de cianobactérias constataram uma alta densidade comprovando a floração destes organismos (690.547 células/ml), similar ao ocorrido no ponto 3 (Tabela 7).

Tabela 7 - Valores mensais e médias aritméticas dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos referentes às amostras de água bruta superficial do ponto 4, da Represa de Salto Grande, Americana-SP.

Meses	Cor Aparente (mg Pt/L)	Turbidez (NTU)	pH	Temperatura (°C)	Coliformes (NMP/100mL)			Densidade de cianobactérias
					Totais	Termotolerantes	<i>E.coli</i>	
Janeiro	445	78,7	8,97	28	8,0x10 <sup>2</sup>	7,0x10 <sup>1</sup>	4,0x10 <sup>1</sup>	1.296.386
Fevereiro	142	24,7	7,97	29	1,4x10 <sup>2</sup>	<2,0	<2	205.198
Março	173	21,8	7,09	28	1,3x10 <sup>3</sup>	4,0x10 <sup>1</sup>	<2	N.A
Abril	105	16,3	7,45	26	1,1x10 <sup>2</sup>	<2,0	<2	N.A
Maiο	85	11,6	7,12	23	2,7x10 <sup>2</sup>	7,0x10 <sup>1</sup>	2,0x10 <sup>1</sup>	185.198
Junho	72	11,4	7,27	21	4,0x10 <sup>1</sup>	<2,0	<2	100.592
Julho	94	26,6	8,51	22	2,3x10 <sup>2</sup>	<2,0	<2	695.540
Agosto	40	5,43	6,92	20	-	-	-	N.A
Setembro	76	20,6	8,78	21	-	-	-	N.A
Outubro	40	12,6	7,12	26	2,0x10 <sup>1</sup>	<2,0	<2	N.A
Novembro	181	39,6	9,31	26	3,3x10 <sup>2</sup>	<2,0	<2	1.082.696
Dezembro	330	94,8	9,87	28	1,7x10 <sup>2</sup>	<2,0	<2	1.952.310
Média aritmética*	148,6	30,34	7,71	24,66	2,8x10 <sup>2</sup>	1,6 x10	6,3	460.365
Desvio padrão	122,88	28,01	1,01	3,24	3,8x10 <sup>2</sup>	27,45	11,87	653.478,387
Valor mínimo	40	5,43	6,92	20	2	2	2	
Valor máximo	445	94,8	9,87	29	1,3x10 <sup>3</sup>	7,0x10 <sup>1</sup>	4,0x10 <sup>1</sup>	1.296.386

N.A: não analisado

\*ou mediana para pH

## 5.2 Ocorrência de protozoários patogênicos dos pontos de coleta (1, 2, 3 e 4) de água superficial da represa de Salto Grande.

Neste estudo, a presença de ambos os protozoários patogênicos de veiculação hídrica, *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp., foi registrada em amostras de água superficial da Represa de Salto Grande, embora oocistos de *Cryptosporidium* tenham sido detectados apenas no mês de maio (Fig.13), no ponto 2 (Saltinho) (Tabela 8).

A ocorrência de cistos de *Giardia* spp., foi observada nos pontos 1 (Mini-Pantanal) e 2 (Saltinho) (Fig.12). Nos pontos 3 e 4 não se registrou positividade em nenhuma das amostras de água superficial. Nos meses de fevereiro, abril e julho ocorreu uma grande densidade de cianobactérias (Fig.14); estas dificultaram a diferenciação de cistos e oocistos devido à reação cruzada com os anticorpos monoclonais fluorescentes; estas amostras foram submetidas ao processo de separação imunomagnética, não sendo constatada presença de protozoários.

A detecção de protozoários nas amostras positivas foi coincidente com a ocorrência de chuvas que antecederam às coletas (janeiro, março, maio, junho e agosto de 2008).

Considerando o total de 48 amostras analisadas durante 12 meses (janeiro a dezembro de 2008), a positividade para os protozoários patogênicos foi de 16,6% (n=8).

Para cistos de *Giardia* spp., no ponto 1, das 12 amostras analisadas, somente 2 (16,6%) foram positivas; no mês de junho, foram detectados 102 cistos/L de água superficial da represa e, em agosto, 224 cistos por litro de água superficial, resultando em uma concentração média de 27,1 cistos/L.

Já no ponto 2, a prevalência de cistos de *Giardia* spp. na água superficial foi de 41,6% (n=5); a concentração média de cistos/L foi de 65,4 sendo registrada uma variação entre 122 e 203 cistos/L (Tabela 8).

Para *Cryptosporidium*, a prevalência de oocistos na água superficial neste ponto foi de 8,3% (n=1). A concentração de oocistos por litro foi de 170 organismos.

Tabela 8 - Concentração de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. por litro de amostra de água bruta do reservatório de Salto Grande nos diferentes pontos de coleta, no período de janeiro a dezembro de 2008 (Merifluor®).

	P1		P2		P3		P4	
	C	G	C	G	C	G	C	G
<b>JANEIRO</b>	ND	ND	ND	<b>151</b>	ND	ND	ND	ND
<b>FEVEREIRO*</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>MARÇO</b>	ND	ND	ND	<b>122</b>	ND	ND	ND	ND
<b>ABRIL*</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>MAIO</b>	ND	ND	<b>170</b>	ND	ND	ND	ND	ND
<b>JUNHO*</b>	ND	<b>102</b>	ND	<b>147</b>	ND	ND	ND	ND
<b>JULHO</b>	ND	ND	ND	<b>203</b>	ND	ND	ND	ND
<b>AGOSTO</b>	ND	<b>224</b>	ND	<b>162</b>	ND	ND	ND	ND
<b>SETEMBRO</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>OUTUBRO</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>NOVEMBRO</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>DEZEMBRO</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND= NÃO DETECTADO

C= oocistos de *Cryptosporidium* sp

G= cistos de *Giardia* sp

\* amostras de água onde ocorreu floração de cianobactérias

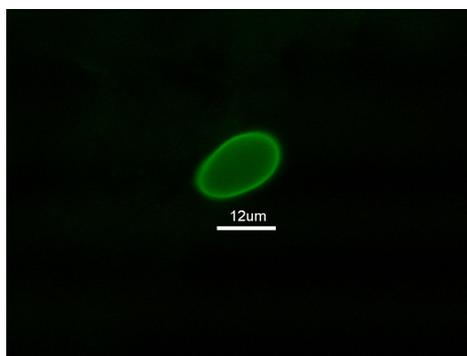


Figura 12 - Cisto de *Giardia* sp. na amostra de água superficial do ponto 2 da represa de Salto Grande, Americana-SP no mês de março (aumento de 600x)



Figura 13 - Oocisto de *Cryptosporidium* sp. na amostra de água superficial do ponto 2 da represa de Salto Grande, Americana-SP no mês de maio (aumento de 600x).

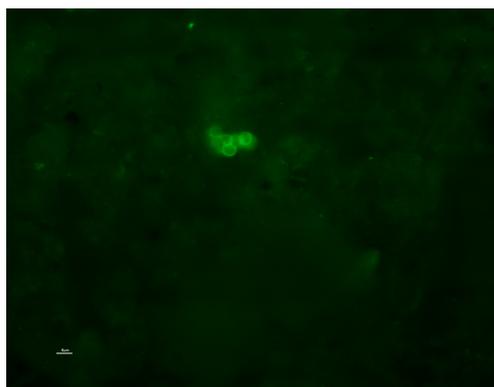


Figura 14 - Cianobactérias na amostra de água superficial do ponto 3 da represa de Salto Grande, Americana-SP no mês de fevereiro, quando da ocorrência de floração (aumento de 600x).

### **5.2.1 Estimativa da eficiência de recuperação de oocistos e cistos dos ensaios-controle positivos das amostras de água superficial do ponto de coleta 2 da represa de Salto Grande.**

A eficiência de recuperação da metodologia de filtração em membranas empregada neste estudo foi variável, dependendo da turbidez da amostra (Tabela 9).

Para *Giardia* spp. a sensibilidade variou de 0,87% no mês de fevereiro e turbidez de 93 NTU à 76,40% em agosto, quando registrou-se turbidez de 26,6 NTU (Tabela 9).

Para *Cryptosporidium* spp., a eficiência de recuperação de oocistos variou de 1,77% (fevereiro) a 8,30% (novembro) (Tabela 9).

A repetição de ensaios-controle positivos no ponto 2, nos meses de fevereiro, maio, agosto e novembro objetivou verificar a influência das estações do ano, considerando-se o regime de chuvas e turbidez, nas taxas de recuperação de cistos e oocistos (Anexo B).

A eficiência de recuperação da metodologia de filtração em membranas foi variável quando comparados os diversos pontos de coleta (Tabela 10). Para *Cryptosporidium* spp, a menor recuperação de organismos ocorreu no ponto 1 (Mini-Pantanal) e a maior no ponto 3, onde se inicia a represa propriamente dita. Para cistos de *Giardia*, a menor eficiência de recuperação foi obtida quando analisada a amostra de água do ponto 1 e a maior, quando processada amostra do ponto 4 (Tabela 10).

Tabela 9 - Eficiência de recuperação de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. nos ensaios-controle da amostra de água do ponto 2 do reservatório de Salto Grande, utilizando a técnica de filtração em membrana e visualização dos protozoários com anticorpos monoclonais (Merifluor®).

Número do ensaio-controle	Número de organismos inoculados em 1 litro de amostra de água bruta		Eficiência de recuperação (%)		Turbidez (NTU)
	<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>Giardia</i> spp.	<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>Giardia</i> spp.	
I(fev)	2,82x10 <sup>3</sup>	5,74 x10 <sup>3</sup>	1,77	0,87	93
II(maio)	5,48x10 <sup>3</sup>	1,39 x10 <sup>3</sup>	5,47	21,58	70
III(ag)	7,45x10 <sup>3</sup>	3,75 x10 <sup>3</sup>	6,00	74,60	23,6
IV(nov)	8,40x10 <sup>3</sup>	1,17 x10 <sup>3</sup>	8,30	34,78	25,9

Tabela 10 - Eficiência de recuperação de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. nos ensaios-controle positivos de amostra de água superficial dos pontos 1, 3 e 4 (n=1) da represa de Salto Grande, utilizando a técnica de filtração em membrana e visualização com anticorpos monoclonais (Merifluor<sup>®</sup>).

Ensaio-controle dos pontos	Número de organismos inoculados em 1 litro de amostra de água bruta		Eficiência de recuperação (%)		Turbidez (NTU)
	<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>Giardia</i> spp.	<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>Giardia</i> spp.	
P1 (nov)	8,48x10 <sup>3</sup>	1,21 x10 <sup>3</sup>	5,30	8,22	22,2
P3 (out)	2,40x10 <sup>3</sup>	2,58 x10 <sup>3</sup>	87,50	42,63	6,2
P4 (out)	5,31x10 <sup>3</sup>	2,03 x10 <sup>3</sup>	31,97	88,66	12,6

### **5.2.2 Sensibilidade da metodologia de filtração em membrana com separação imunomagnética (IMS).**

As amostras de água superficial nas quais ocorreram florações de cianobactérias foram submetidas ao processo de separação imunomagnética como etapa de purificação, por este motivo realizou-se a comparação da eficiência de recuperação acrescida ou não de IMS (Tab.11)

Os ensaios-controle (sem IMS) realizados nas amostras de água do ambiente lótico (pontos 1 e 2) apresentaram médias de recuperação de 6,8% para oocistos e de 21,20% para cistos, enquanto para os ensaios com IMS, as recuperações foram de 3,75% para oocistos e 69,48% para cistos. Já para os ensaios-controle (sem IMS) realizados nas amostras do ambiente lêntico (P3 e P4), as recuperações médias de oocistos e cistos foram de 59,73% e 65,64%, respectivamente. Nos ensaios com IMS, as recuperações foram de 46,27% para oocistos e acima de 100% para cistos.

Tabela 11 - Eficiência de recuperação de oocistos e cistos nos ensaios-controle positivos de amostra de água superficial dos pontos 1, 2, 3 e 4 (n=1) da represa de Salto Grande, utilizando a filtração em membrana, emprego da etapa de separação imunomagnética (IMS) e visualização com anticorpos monoclonais (Merifluor®).

Ensaio- controle dos pontos	Número de organismos inoculados em 1 L de amostra		Eficiência de recuperação (%) <i>Cryptosporidium</i> spp.		Eficiência de recuperação (%) <i>Giardia</i> spp.		Turbidez (NTU)
	<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>Giardia</i> spp.	Com IMS	Sem IMS	Com IMS	Sem IMS	
Ponto 1 (lótico)	8,48x10 <sup>3</sup>	1,21 x10 <sup>3</sup>	4,9	5,3	72,36	8,22	22,2
Ponto 2 (lótico)	8,40x10 <sup>3</sup>	1,17x10 <sup>3</sup>	2,61	8,3	66,6	34,18	25,9
<b>Média</b>			<b>3,75</b>	<b>6,80</b>	<b>69,48</b>	<b>21,20</b>	
Ponto 3 (lêntico)	2,40x10 <sup>3</sup>	2,58 x10 <sup>3</sup>	65,83	87,5	>100	42,63	6,2
Ponto 4 (lêntico)	5,31x10 <sup>3</sup>	2,03 x10 <sup>3</sup>	26,71	31,97	>100	88,66	12,6
<b>Média</b>			<b>46,27</b>	<b>59,73</b>		<b>65,64</b>	

### 5.3 Análise Estatística dos pontos de coleta (1, 2, 3 e 4) das amostras de água superficial da represa de Salto Grande.

#### 5.3.1 Análise de Variância (ANOVA)

De um total de 48 amostras, 8 foram positivas para os protozoários pesquisados. Como a positividade foi pequena e os valores muito díspares, eles foram transformados em logaritmos ( $x \log_{10}(n+1)$ ) visando a evidenciação das diferenças entre os pontos de coleta. Os valores de coliformes termotolerantes, totais e *E.coli* também foram transformados em logaritmos ( $x \log_{10}(n+1)$ ). As variáveis dependentes são: parâmetros físico-químicos (temperatura, cor e turbidez) e biológicos (cistos, oocistos, coliformes totais, termotolerantes e *E.coli*) enquanto as independentes são o mês de coleta, coleta (pontos de coleta) e interação mês e coleta.

Para os parâmetros físico-químicos cor e turbidez, não houve diferença significativa entre os pontos de coleta, somente para estação do ano foram observadas relações significativas ( $p=0,0015$ ;  $F=6,48$  ;  $p=0,0084$ ,  $F= 4,64$ ). Para temperatura, também houve relação significativa com a estação do ano ( $p= 0,001$ ,  $F=61,05$ ) (Tabela 12).

Em relação às concentrações de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp., não houve diferença significativa entre os pontos de coleta (1, 2, 3 e 4) e diferentes estações do ano. Entretanto, houve relação significativa entre ponto de coleta e abundância de cistos de *Giardia* spp. ( $p= 0,0288$ ;  $F=3,42$ ), mas não para oocistos de *Cryptosporidium* spp. ( $p= 0,4055$ ;  $F= 1,00$ ). Já para os coliformes termotolerantes, houve relação significativa entre ponto de coleta e estação do ano ( $p= 0,0001$ ,  $F= 121,21$ ;  $p=0,001$ ,  $F= 19,93$ ) enquanto para coliformes totais, houve relação significativa entre pontos de coleta e estação do ano ( $p= 0,0001$ ,  $F= 38,80$ ;  $p=0,0047$ ,  $F= 5,24$ ). Concentrações de *Escherichia coli* também apresentaram relações significativas entre pontos de coleta e estação do ano ( $p= 0,0001$ ;  $F= 82,17$ ;  $p= 0,0109$ ,  $F= 4,37$ ). A concentração de cianobactérias apresentou relação significativa somente com ponto de coleta ( $p=0,0001$ ;  $F= 14,28$ ) (Tabela 13).

Houve diferença significativa quanto à concentração de cistos de *Giardia* spp. entre os ambientes lótipo (P1 e P2) e lêntico (P3 e P4) e entre os meses do ano, enquanto para oocistos de *Cryptosporidium* spp., não foram observadas diferenças significativas para ambos os fatores independentes (ambientes lótipo e lêntico, meses do ano) (Tabela 14).

Tabela 12 - Valores de ANOVA (teste *F*) e probabilidade (*P*) entre os pontos de coleta (P1, P2, P3, P4) e estações do ano em relação aos parâmetros físico-químicos (cor, turbidez, temperatura) das amostras de água superficial da represa de Salto Grande, Americana-SP.

Variável Dependente	Fatores independentes	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	<i>F</i>	<i>p</i>
Cor	Pontos de Coleta	3,32	355.889,39	118.629, 80	1,80	0,1678
	Estação do ano	3,32	1.284.085,73	428.028,57	<b>6,48</b>	<b>0,0015</b>
	Pontos de coleta · estação do ano	9,32	326.990,35	36.332,26	0,55	0,8266
Turbidez	Pontos de Coleta	3,32	3.348,30	1116, 10	0,65	0,5979
	Estação do ano	3,32	23.848,77	7949, 59	<b>4,64</b>	<b>0,0084</b>
	Pontos de coleta · estação do ano	9,32	10.320,57	1146, 73	0,67	0,7300
Temperatura	Pontos de Coleta	3,32	9,27	3,09	1,26	0,3056
	Estação do ano	3,32	450,22	150,07	<b>61,05</b>	<b>0,001</b>
	Pontos de coleta · estação do ano	9,32	15,64	1,73	0,71	0,6979

Tabela 13 - Valores de ANOVA (teste *F*) e probabilidade (*P*) entre os pontos de coleta (P1, P2, P3, P4) e estações do ano em relação aos parâmetros biológicos (cistos, oocistos, coliformes totais, coliformes termotolerantes, *E.coli* e cianobactérias) das amostras de água superficial da represa de Salto Grande, Americana-SP.

Variável Dependente	Fatores independentes	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	<i>F</i>	<i>p</i>
Número de cistos (x log <sub>10</sub> (n+1))	Pontos de Coleta	3,32	26,82	8,94	3,42	<b>0,0288</b>
	Estação do ano	3,32	10,71	3,57	1,37	0,2705
	Pontos de coleta · estação do ano	9,32	31,30	3,47	1,33	0,2604
Número de oocistos (x log <sub>10</sub> (n+1))	Pontos de Coleta	3,32	1,65	0,55	1,0	0,4055
	Estação do ano	3,32	1,65	0,55	1,0	0,4055
	Pontos de coleta · estação do ano	9,32	4,95	0,55	1,0	0,4599
Concentração de col.termotolerantes (x log <sub>10</sub> (n+1))	Pontos de Coleta	3,32	475,29	158,43	121,21	<b>0,0001</b>
	Estação do ano	3,32	78,15	26,05	19,93	<b>0,0001</b>
	Pontos de coleta · estação do ano	9,32	24,73	2,74	2,10	0,0592
Concentração de col.totais (x log <sub>10</sub> (n+1))	Pontos de Coleta	3,32	385,33	128,44	38,80	<b>0,0001</b>
	Estação do ano	3,32	52,07	17,35	5,24	<b>0,0047</b>
	Pontos de coleta · estação do ano	9,32	42,31	4,70	1,42	0,2209
Concentração de <i>E.coli</i> (x log <sub>10</sub> (n+1))	Pontos de Coleta	3,32	423,80	141,26	82,17	<b>0,0001</b>
	Estação do ano	3,32	22,53	7,51	4,37	<b>0,0109</b>
	Pontos de coleta · estação do ano	9,32	11,36	1,26	0,73	0,6747
Concentração de cianobactérias (x log <sub>10</sub> (n+1))	Pontos de Coleta	3,32	936,02	312,01	14,28	<b>0,0001</b>
	Estação do ano	3,32	16,74	5,58	0,26	0,8568
	Pontos de coleta · estação do ano	9,32	103,16	11,46	0,52	0,8457

Tabela 14 - Valores de ANOVA (teste F) e probabilidade (*P*) entre os ambientes lótico (P1 e P2) e lêntico (P3 e P4), meses do ano e densidade de cistos e oocistos das amostras de água superficial da represa de Salto Grande, Americana-SP.

<b>Variável Dependente</b>	<b>Fatores independentes</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Quadrado médio</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Número de cistos (x log <sub>10</sub> (n+1))	Lêntico/lótico	1,24	25,95	25,95	16,20	<b>0,0005</b>
	Meses do ano	11,24	44,02	4,00	2,50	<b>0,0295</b>
	lêntico/lótico · meses do ano	11,24	44,02	4,00	2,50	<b>0,0295</b>
Número de oocistos (x log <sub>10</sub> (n+1))	Lêntico/lótico	1,24	0,55	0,55	1,00	0,3273
	Meses do ano	11,24	6,05	0,55	1,00	0,4744
	lêntico/lótico · meses do ano	11,24	6,05	0,55	1,00	0,4744

### **5.3.2 Comparação múltipla de médias dos parâmetros físico-químicos e gráfico Box-plot para valores de pH.**

Em relação à cor, não foram observadas diferenças significativas entre os quatro pontos de coleta. De forma similar para os valores de turbidez e temperatura (Tabela 15).

Em comparação às estações do ano, os valores dos parâmetros cor e turbidez no verão, foram significativamente maiores daqueles registrados no outono, inverno e primavera, sendo que estes não foram significativamente diferentes nestas 3 estações do ano (Tabela 16).

Quando considerada a temperatura, estas foram significativamente diferentes entre si nas 4 estações do ano, verão e outono registraram maiores temperaturas (Tabela 16).

Para visualizar a tendência para acidez ou alcalinidade dos valores de pH dos pontos 1, 2, 3 e 4, foi realizado o gráfico Box-plot. Nos pontos 1, 3 e 4, a distribuição dos valores de pH tendem à alcalinidade, enquanto para o ponto 2, os valores tendem à acidez (Figura 15).

Tabela 15 - Comparação múltipla de médias (Teste de Duncan) entre os parâmetros físico-químicos (cor, turbidez e temperatura) comparados entre os pontos de coleta (P1, P2, P3 e P4) de água superficial da represa de Salto Grande, Americana-SP.

Parâmetros	Média <sup>Δ</sup> ±DP	N	Pontos de Coleta	Agrupamento de Duncan*	P
Cor (MgPt/L)	368,10 ± 315,09	12	P1	A	0,1678
	349,70 ± 236,20	12	P2	A	
	285,90 ± 410,41	12	P3	A	
	148,60 ± 122,88	12	P4	A	
Turbidez (NTU)	53,21 ± 52,92	12	P1	A	0,5879
	46,91 ± 59,94	12	P3	A	
	43,16 ± 30,17	12	P2	A	
	30,34 ± 28,01	12	P4	A	
Temperatura (°C)	24,66 ± 3,24	12	P4	A	0,3056
	24,54 ± 3,20	12	P3	A	
	23,95 ± 3,67	12	P2	A	
	23,58 ± 3,77	12	P1	A	

Δ Ordenamento das médias foi feito de forma decrescente.

DP= Desvio-padrão.

\*Letras iguais não apresentam diferenças significativas de acordo com o teste de comparação múltipla de Duncan.

P= Probabilidade.

Tabela 16 - Comparação múltipla de médias (Teste de Duncan) para os parâmetros físico-químicos comparados entre as estações do ano (primavera, verão, outono e inverno), das amostras de água superficial da represa de Salto Grande, Americana-SP.

Parâmetros	Média <sup>Δ</sup> ±DP	N	Estações	Agrupamento de Duncan*	P
Cor (MgPt/L)	563,08 ± 428,58	12	Verão	A	0,0015 <sup>a</sup>
	255,50 ± 236,75	12	Outono	B	
	188,25 ± 96,48	12	Primavera	B	
	145,41 ± 72,03	12	Inverno	B	
Turbidez (NTU)	80,83 ± 63,68	12	Verão	A	0,0084 <sup>a</sup>
	38,63 ± 37,13	12	Outono	B	
	31,06 ± 24,49	12	Primavera	B	
	23,11 ± 13,87	12	Inverno	B	
Temperatura (°C)	28,75 ± 0,75	12	Verão	A	0,001 <sup>a</sup>
	25,08 ± 1,56	12	Primavera	B	
	22,33 ± 2,26	12	Outono	C	
	20,75 ± 1,07	12	Inverno	D	

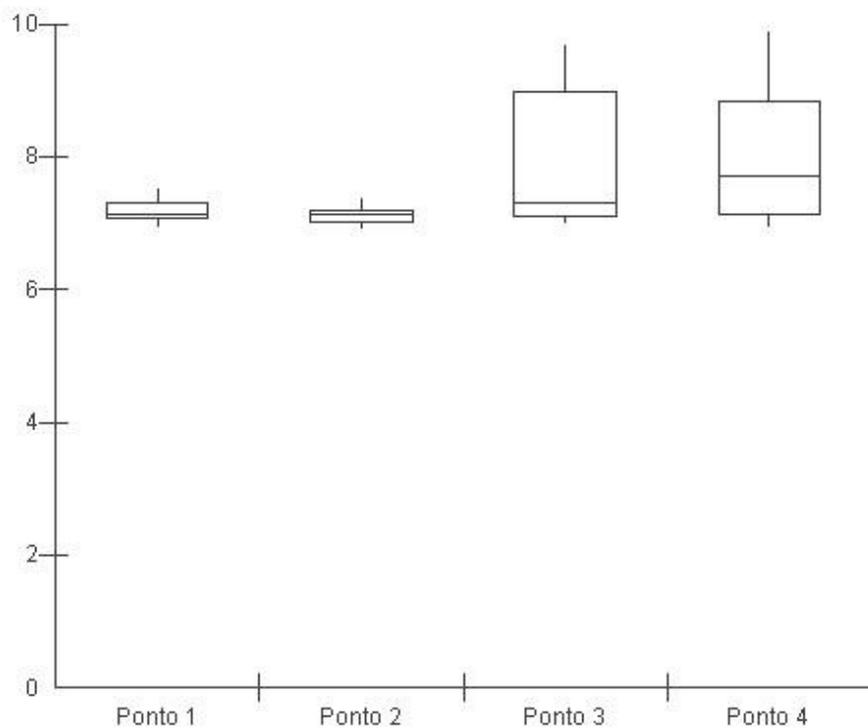
Δ Ordenamento das médias foi feito de forma decrescente.

DP= Desvio-padrão.

\*Letras iguais não apresentam diferenças significativas de acordo com o teste de comparação múltipla de Duncan.

P= Probabilidade.

Figura 15 – Gráfico Box-Plot da distribuição dos valores de mediana de pH das amostras de água superficial dos pontos de coleta (1, 2, 3 e 4) da represa Salto Grande, Americana-SP.



### 5.3.3 Comparação múltipla de médias dos parâmetros biológicos.

Quando considerados os indicadores biológicos, para coliformes termotolerantes, não existem diferenças entre os pontos P1 (Mini-Pantanal) e P2 (Saltinho); entretanto, o ponto 1 (Mini-Pantanal) foi significativamente maior que P3 (Praia Azul) e P4 (Iate Clube). Entre si, o ponto 3 foi significativamente maior que o ponto 4 (Tabela 17).

Em relação aos coliformes totais, não foram observadas diferenças significativas entre os pontos 1 e 2 (Mini-Pantanal e Saltinho). Já o ponto 3 (Praia Azul) apresentou valores significativamente superiores aos do ponto 4 (Iate Clube) (Tabela 17).

Para o parâmetro *E.coli*, os pontos 1 e 2 (Mini-Pantanal e Saltinho) foram similares e ambos significativamente maiores que P3 (Praia Azul) e P4 (Iate Clube), sendo que P3 é significativamente maior que P4 (Tabela 17).

Em relação às cianobactérias, os pontos 3 e 4 são semelhantes entre si, significativamente maiores que os pontos 1 e 2 os quais ambos são similares (Tabela 17).

Os valores de coliformes termotolerantes foram significativamente diferentes entre as estações do ano, sendo que o maior valor médio foi verificado no verão ( $\bar{x} = 7,44$ ) (Tabela 18). No outono, o valor médio ( $\bar{x} = 6,04$ ) destes coliformes foi menor que no verão, porém superior aos valores de inverno ( $\bar{x} = 4,79$ ) e primavera ( $\bar{x} = 4,30$ ) que entre si foram semelhantes (Tabela 18).

Quanto aos coliformes totais, os valores médios obtidos no verão ( $\bar{x} = 9,21$ ) e outono ( $\bar{x} = 8,52$ ) foram similares e superiores aos observados no inverno ( $\bar{x} = 6,54$ ). No entanto, outono foi semelhante à primavera ( $\bar{x} = 7,36$ ) que foi similar ao inverno. Verão foi significativamente maior que primavera e inverno (Tabela 18).

Já *E.coli*, os valores médios foram similares no verão ( $\bar{x} = 5,86$ ) e outono ( $\bar{x} = 5,01$ ). Entretanto, o valor médio de verão foi significativamente maior que inverno ( $\bar{x} = 4,22$ ) e primavera ( $\bar{x} = 4,19$ ) que foram semelhantes entre si. Outono, inverno e primavera foram também semelhantes (Tabela 18).

A concentração de cistos de *Giardia* quando comparados com ambiente lótico (P1 e P2) e lêntico (P3 e P4), são significativamente diferentes, no ambiente lótico foi maior que no lêntico, enquanto para oocistos, não há diferença significativa entre os ambientes

(Tabela 19). Em relação aos meses do ano, a concentração média de cistos foi semelhante nos meses de agosto ( $\bar{x} = 2,62$ ) e junho ( $\bar{x} = 2,40$ ). Entretanto, estes meses foram significativamente maiores que os meses de janeiro ( $\bar{x} = 1,25$ ), março ( $\bar{x} = 1,20$ ), julho ( $\bar{x} = 1,32$ ), fevereiro, abril, maio, julho, setembro e outubro que foram semelhantes entre si (Tabela 20).

Quanto para os oocistos, não houve diferença significativa das médias de oocistos entre os meses do ano (Tabela 20).

Tabela 17 - Comparação múltipla de médias dos parâmetros biológicos (cistos, oocistos, coliformes termotolerantes, totais, *E.coli* e cianobactérias) e os pontos de coleta (P1, P2, P3 e P4) da represa de Salto Grande.

Parâmetros	Média <sup>Δ</sup>	N	Pontos de Coleta	Agrupamento de Duncan*	P
Cistos	1,6606	12	P2	A	0,0288 <sup>a</sup>
	1,2807	12	P1	A , B	
	0,000	12	P3	B	
	0,000	12	P4	B	
Oocistos	0,4285	12	P2	A	0,4055
	0	12	P1	A	
	0	12	P3	A	
	0	12	P4	A	
Coliformes termotolerantes	9,05	12	P1	A	0,0001 <sup>a</sup>
	8,50	12	P2	A	
	3,36	12	P3	B	
	1,82	12	P4	C	
Coliformes totais	10,91	12	P1	A	0,0001 <sup>a</sup>
	10,40	12	P2	A	
	5,97	12	P3	B	
	4,28	12	P4	C	
<i>Escherichia coli</i>	8,21	12	P1	A	0,0001 <sup>a</sup>
	7,28	12	P2	A	
	2,50	12	P3	B	
	1,29	12	P4	C	
Cianobactérias	9,24	12	P3	A	0,0001 <sup>a</sup>
	8,38	12	P4	A	
	0	12	P1	B	
	0	12	P2	B	

Δ Ordenamento das médias foi feito de forma decrescente.

\*Letras iguais não apresentam diferenças significativas de acordo com o teste de comparação múltipla de Duncan.

P= Probabilidade.

a = P<0,05

Tabela 18 - Comparação múltipla de médias para os parâmetros biológicos comparados entre as estações do ano (primavera, verão, outono e inverno), das amostras de água superficial dos pontos de coleta P1, P2, P3 e P4 da represa Salto Grande.

Parâmetros	Média $\Delta$	N	Estações	Agrupamento de Duncan*	P
Coliformes termotolerantes	7,44	12	Verão	A	0,0001 <sup>a</sup>
	6,04	12	Outono	B	
	4,79	12	Inverno	C	
	4,30	12	Primavera	C	
Coliformes totais	9,21	12	Verão	A	0,0047 <sup>a</sup>
	8,52	12	Outono	A , B	
	7,36	12	Primavera	C , B	
	6,54	12	Inverno	C	
<i>Escherichia coli</i>	5,86	12	Verão	A	0,0109 <sup>a</sup>
	5,01	12	Outono	A B	
	4,22	12	Inverno	B	
	4,19	12	Primavera	B	
Cianobactérias	5,164	12	Outono	A	0,8568
	4,293	12	Verão	A	
	3,535	12	Primavera	A	
	4,629	12	Inverno	A	

$\Delta$  Ordenamento das médias foi feito de forma decrescente.

\*Letras iguais não apresentam diferenças significativas de acordo com o teste de comparação múltipla de Duncan.

P= Probabilidade.

a =  $P < 0,05$

Tabela 19 - Comparação múltipla de médias das densidades de cistos e oocistos comparados entre os ambientes lótico (P1 e P2) e lêntico (P3 e P4), das amostras de água superficial da represa Salto Grande.

Parâmetros	Média	N	Ambientes	Agrupamento de Duncan*	P
Cistos	1,4707	24	Lótico	A	0,0005 <sup>a</sup>
	0,0000	24	Lêntico	B	
Oocistos	0,2142	24	Lótico	A	0,3273
	0,0000	24	Lêntico	A	

Δ Ordenamento das médias foi feito de forma decrescente

\*Letras iguais não apresentam diferenças significativas de acordo com o teste de comparação múltipla de Duncan.

P= Probabilidade

a =  $P < 0,05$

Tabela 20 - Comparação múltipla de médias das densidades de cistos e oocistos comparados entre os meses do ano das amostras de água superficial da represa Salto Grande.

Parâmetros	Média $\Delta$	N	Meses	Agrupamento de Duncan*	P
Cistos	2,62	4	Agosto	A	0,0295 <sup>a</sup>
	2,40	4	Junho	A	
	1,32	4	Julho	A , B	
	1,25	4	Janeiro	A , B	
	1,20	4	Março	A , B	
	0	4	Fevereiro	B	
	0	4	Dezembro	B	
	0	4	Maio	B	
	0	4	Abril	B	
	0	4	Novembro	B	
	0	4	Outubro	B	
Oocistos**	1,28	4	Maio	A	0,4744**
	0	4	Abril	B	
	0	4	Dezembro	B	
	0	4	Agosto	B	
	0	4	Janeiro	B	
	0	4	Julho	B	
	0	4	Junho	B	
	0	4	Fevereiro	B	
	0	4	Março	B	
	0	4	Novembro	B	
	0	4	Outubro	B	
0	4	Setembro	B		

$\Delta$  Ordenamento das médias foi feito de forma decrescente

\*Letras iguais não apresentam diferenças significativas de acordo com o teste de comparação múltipla de Duncan.

P= Probabilidade

a =  $P < 0,05$

\*\* probabilidade > 5% (desvio padrão igual a 0, muitos valores igual a 0)

### 5.3.4 Teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) das freqüências de cistos, oocistos, cianobactérias, entre os pontos de coleta (P1, P2, P3 e P4) e estações do ano.

As freqüências de cistos nas amostras de água superficial dependeram do ponto de coleta (1 e 2) e das estações do ano ( $p= 0,0032$  e  $p<0,05$ ), portanto, as variáveis não são independentes, existindo uma associação entre elas, nos pontos 3 e 4 a freqüência para *Giardia* foi zero (Tabela 21). Entretanto, para a freqüência de oocistos de *Cryptosporidium*, não foi possível o cálculo do Qui-quadrado, já que só houve positividade em um ponto de coleta (Ponto 2).

Em relação às freqüências de cianobactérias, há uma relação de dependência dos pontos de coleta (3 e 4) e as estações do ano, existindo uma associação estatisticamente significativa entre estas variáveis (Tabela 22).

Tabela 21 - Freqüências observadas de cistos de *Giardia* spp. dos pontos de coleta (1 e 2) nas estações do ano, em amostras de água superficial da represa de Salto Grande, Americana-SP.

Pontos de coleta	Inverno	Outono	Verão	Total	$(\chi^2)_2^*$	P
P1	10,734	4,6347	0	15,369	11,4623	0,0032 <sup>a</sup>
P2	5,0938	4,9972	9,8361	19,927		
Total	15,828	9,63194	9,8361	35,296		

\* grau de liberdade

Tabela 22 - Freqüências observadas de cianobactérias dos pontos de coleta (3 e 4) nas estações do ano, em amostras de água superficial da represa de Salto Grande, Americana-SP.

Pontos de coleta	Inverno	Outono	Primavera	Verão	Total	$(\chi^2)_{3^{**}}$	P
P3	33,323	38,321	14,042	25,52	113,21	9,8512	0,0199
P4	22,226	23,648	28,379	26,307	100,56		
Total	55,5489	61,9693	42,4211	53,8265	213,766		

\*\*grau de liberdade

### 5.3.5 Teste de Correlação de Pearson dos parâmetros físico-químicos e biológicos de cada ponto de coleta (1, 2, 3 e 4) de água superficial da represa Salto Grande.

No ponto 1, houve uma forte correlação entre cor e turbidez ( $r = 0,99510$ ). Os valores de pH aumentaram de forma inversamente proporcional aos valores da temperatura ( $r = - 0,60097$ ) (Tabela 23). Já para os coliformes termotolerantes, houve uma forte correlação com coliformes totais e moderada para *E.coli* (Tabela 23).

Em relação ao ponto 2, também houve forte correlação entre cor aparente e turbidez ( $r = 0,97978$ ); verificou-se correlação moderada entre cor e temperatura ( $r = 0,60311$ ) turbidez e temperatura ( $r = 0,61595$ ). Já para os valores de coliformes termotolerantes, houve uma forte correlação com coliformes totais ( $r = 0,82530$ ) e correlação moderada com *E.coli* e cistos de *Giardia* ( $r = 0,68925$  e  $r = 0,60142$ , respectivamente) (Tabela 24).

No ponto 3, de forma similar aos pontos 1 e 2, a correlação entre cor e turbidez foi forte ( $r = 0,98893$ ) (Tabela 25). Fortes correlações também foram registradas entre cor e coliformes termotolerantes ( $r = 0,70153$ ) e entre coliformes termotolerantes e *E.coli* ( $r = 0,83364$ ). As demais correlações entre turbidez e coliformes termotolerantes ( $r = 0,64337$ ); pH e cianobactérias ( $r = 0,62957$ ); temperatura e coliformes termotolerantes ( $r = 0,59057$ ); coliformes termotolerantes e totais ( $r = 0,61480$ ) foram moderadas (Tabela 25).

Já no ponto 4, observou-se fortes correlações entre cor e turbidez ( $r = 0,92293$ ) pH e turbidez ( $r = 0,82447$ ), pH e cianobactérias ( $r = 0,70196$ ), coliformes termotolerantes e coliformes totais ( $r = 0,72647$ ), coliformes termotolerantes e *E.coli* ( $r = 0,82492$ ). As correlações entre cor e pH, cor e temperatura, cor e *E.coli*, apresentaram-se moderadas ( $r = 0,66263$ ;  $r = 0,63624$ ;  $r = 0,58848$ , respectivamente). Quanto às correlações de temperatura e coliformes totais ( $r = 0,62484$ ), *E.coli* e coliformes totais ( $r = 0,66224$ ) também foram moderadas (Tabela 26).

Tabela 23 - Matriz da Correlação linear de Pearson (*r*) dos parâmetros físico-químicos e biológicos das amostras de água superficial do ponto de coleta 1 (Mini-Pantanal) da represa Salto Grande, Americana-SP.

	Cor	Turbidez	pH	Temp*	Termo**	Totais	<i>E.coli</i>	Cistos	Oocistos	Ciano ***
Cor	1									
Turbidez	<b>0,99510</b>	1								
pH	-0,24455	-0,24698	1							
Temp*	0,33920	0,32275	<b>-0,60097</b>	1						
Termo**	0,17225	0,13991	0,48132	-0,07109	1					
Totais	0,10219	0,07398	0,20679	-0,3351	<b>0,80520</b>	1				
<i>E.coli</i>	0,12399	0,09533	0,22736	0,02435	<b>0,47670</b>	0,55095	1			
Cistos	-0,34187	-0,32562	0,17842	-0,51630	0,18699	0,22004	0,22978	1		
Oocistos	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
Ciano***	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1

Resultados com significância ( $P < 0,05$ ) em negrito

\*temperatura

\*\* termotolerantes

\*\*\*cianobactérias

Tabela 24 - Matriz da Correlação linear de Pearson ( $r$ ) dos parâmetros físico-químicos e biológicos das amostras de água superficial do ponto de coleta 2 (Saltinho) da represa Salto Grande, Americana-SP.

	Cor	Turbidez	pH	Temp*	Termo**	Totais	<i>E.coli</i>	Cistos	Oocistos	Ciano***
Cor	1									
Turbidez	<b>0,97978</b>	1								
pH	-0,32271	-0,33989	1							
Temp*	<b>0,60311</b>	<b>0,61595</b>	<b>-0,64841</b>	1						
Termo**	<b>0,62113</b>	<b>0,64471</b>	-0,12967	0,44381	1					
Totais	0,42004	0,45953	-0,09402	0,03826	<b>0,82530</b>	1				
<i>E.coli</i>	0,42613	0,37056	0,08386	0,25168	<b>0,68925</b>	0,36700	1			
Cistos	0,25008	0,19680	0,17618	0,12023	<b>0,60142</b>	0,39688	<b>0,67887</b>	1		
Oocistos	0,22177	0,28010	0,23959	-0,33958	-0,12687	0,08836	-0,15894		1	
Ciano***	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1

Resultados com significância ( $P < 0,05$ ) em negrito

\* temperatura

\*\* termotolerantes

\*\*\* cianobactéria

Tabela 25 - Matriz da Correlação linear de Pearson ( $r$ ) dos parâmetros físico-químicos e biológicos das amostras de água superficial do ponto de coleta 3 (Praia Azul) da represa Salto Grande, Americana-SP.

	Cor	Turbidez	pH	Temp*	Termo**	Totais	<i>E.coli</i>	Cistos	Oocistos	Ciano***
Cor	1									
Turbidez	<b>0,98893</b>	1								
pH	0,56108	0,57070	1							
Temp*	0,38620	0,34111	0,00133	1						
Termo**	<b>0,70153</b>	<b>0,64337</b>	0,32102	<b>0,59057</b>	1					
Totais	0,49198	0,44101	0,10440	0,52736	<b>0,61480</b>	1				
<i>E.coli</i>	0,55515	0,48793	0,28306	0,31372	<b>0,83364</b>	0,51829	1			
Cistos	-	-	-	-	-	-	-	1		
Oocistos	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
Ciano***	0,36731	0,42837	<b>0,62957</b>	-0,29978	0,17909	-0,11151	0,37814	-	-	1

Resultados com significância ( $P < 0,05$ ) em negrito

\*temperatura

\*\* termotolerantes

\*\*\*cianobactérias

Tabela 26 - Matriz da Correlação linear de Pearson (r) dos parâmetros físico-químicos e biológicos das amostras de água superficial do ponto de coleta 4 (late Clube) da represa Salto Grande, Americana-SP.

	Cor	Turbidez	pH	Temp*	Termo**	Totais	<i>E.coli</i>	Cistos	Oocistos	Ciano***
Cor	1									
Turbidez	<b>0,92293</b>	1								
pH	<b>0,66263</b>	<b>0,82447</b>	1							
Temp*	<b>0,63624</b>	0,56722	0,33875	1						
Termo**	0,48586	0,23327	-0,11616	0,29600	1					
Totais	0,56426	0,42368	0,20144	<b>0,62484</b>	<b>0,72647</b>	1				
<i>E.coli</i>	<b>0,58848</b>	0,38862	0,09015	0,26904	<b>0,86685</b>	<b>0,66224</b>	1			
Cistos	-	-	-	-	-	-	-	1		
Oocistos	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
Ciano***	0,48181	0,55685	<b>0,70196</b>	0,05042	0,15712	0,34260	0,41364	-	-	1

Resultados com significância ( $P < 0,05$ ) em negrito

\*temperatura

\*\* termotolerantes

\*\*\*cianobactérias

Tabela 27 - Parâmetros considerados na avaliação qualitativa dos kits comerciais de anticorpos monoclonais empregados na detecção de cistos e oocistos nas amostras de água da represa de Salto Grande, Americana-SP e *score* de pontuação.

Parâmetros	Kit A (Merifluor® Meridian Bioscience Diagnostics, Cincinnatti, Ohio)	Kit B (Crypto/Giardia-Cel IF Test®)
Cor da fluorescência (verde-maçã)	+++	++++
Intensidade da fluorescência (brilhante)	+++	++++
Ausência de difusão da fluorescência	+++	++++
Predominância da fluorescência na parede do organismo (aspecto em “anel”)	+++	++++

++++ = muito bom

++++ = bom

+ = fraco

## 6. DISCUSSÃO

O desvio do curso de rios e alteração do fluxo, a retirada da vegetação, a captura e a translocação da fauna silvestre além da remoção da população ribeirinha, são os principais impactos oriundos da construção de um reservatório. Durante o enchimento e após o início do funcionamento do novo sistema, várias alterações físicas, químicas e biológicas ocorrem em função do fluxo d'água, da decomposição da vegetação inundada e outros processos que dependem da vazão e do tempo de residência da água. O uso desordenado das áreas adjacentes seja por processos de urbanização ou atividades agropastoris, e do próprio reservatório, incluindo a pesca, atividade de recreação, navegação e geração de energia elétrica contribuem para a eutrofização e alteração da qualidade da água dos reservatórios, principalmente quando estes estão próximos às áreas densamente povoadas como é o caso da represa de Salto Grande, no município de Americana (LOPES et al, 2004).

A eutrofização antropogênica é caracterizada pela produção vegetal excessiva e alta concentração de nutrientes provenientes dos despejos domésticos e industriais, além da descarga de fertilizantes aplicados na agricultura como ocorre nas margens do reservatório de Salto Grande. Assim, o crescimento não controlado de plantas aquáticas, tais como macrófitas, algas e cianobactérias são os principais efeitos da eutrofização.

Um estudo de mapeamento da área da represa de Salto Grande, realizado por Carvalho et al (2006), comparando dados relativos aos anos referentes de 1986 e 2006, revela que as áreas cobertas com macrófitas aumentaram consideravelmente, não se concentrando apenas nas margens em 2006. Tal fato pode ser explicado pela intensificação dos processos de industrialização da região e a influência dos ventos que promovem o deslocamento das macrófitas (de 2,97 km<sup>2</sup> em 1986 para 17,52 km<sup>2</sup> em 2006).

Outras causas da eutrofização são o aumento das concentrações de nitrogênio e fósforo na água (forma dissolvida e particulada), proliferação de cianobactérias, o aumento das concentrações de amônia e nitrito no sistema e o aumento das concentrações de material em suspensão particulado, de origem orgânica na água.

Deve-se considerar que em muitas regiões o processo de eutrofização vem acompanhado em geral das doenças de veiculação hídrica (TUNDISI et al, 2002).

O reservatório de Salto Grande foi formado a partir de uma barragem construída em um manancial lótico (Rio Atibaia) e represas com esta característica, representam ambientes cuja paisagem está em constante mudança, pois tendem a sofrer um processo gradativo de assoreamento o que provoca a formação de águas rasas e depósito de sedimentos, com o surgimento de áreas úmidas e habitats potencialmente colonizáveis pela flora e pela fauna, principalmente aves (PEGORARO, 2004).

A bacia do rio Atibaia apresenta alta densidade urbana e industrial o que determina um processo crescente de deterioração da qualidade de suas águas, ocasionado principalmente pela entrada de efluentes domésticos e industriais das cidades de Paulínia e Campinas (ZANATA, 2000). O município de Paulínia contribui com parte deste esgoto doméstico, além do industrial. Ressalte-se que as coletas foram realizadas já com o funcionamento da ETE de Paulínia, sendo que cerca de 20% do esgoto produzido em Paulínia não recebia tratamento durante o período deste estudo (PBH, 2008). Além de Paulínia e Campinas, 11 cidades (Americana, Atibaia, Bom Jesus dos Perdões, Itatiba, Jarinu, Morungaba, Nazaré Paulista, Nova Odessa, Piracaia, Valinhos e Vinhedo) contribuem com carga orgânica doméstica totalizando 18.767 Kg.DBO/dia, um alto valor em comparação com a Bacia do Rio Jaguari (14.153 kg.DBO/dia) (PBH, 2008).

Desta forma, o uso e a ocupação da bacia hidrográfica influenciam diretamente a qualidade de água do rio Atibaia que por sua vez, deságua no reservatório de Salto Grande que atua como barreira sanitária, retendo grande parte do material que chega pelo rio.

Poucos estudos tem por foco a prevalência de patógenos entéricos em lagos e reservatórios (ONO et al, 2001) já que rios utilizados como fontes de abastecimento de água, tem sido o alvo dos estudos epidemiológicos sobre contaminação por parasitos (ONGERTH e STIBBS, 1987; SMITH et al, 1991; KFIR et al, 1995).

No caso deste estudo, o Ponto 1 (Mini-Pantanal) pode ser caracterizado como ambiente lótico, por estar localizado próximo ao deságüe do rio Atibaia. Apresenta uma grande densidade de animais como: bovinos, aves aquáticas (garças, biguás, quero-

quero, frango d'água, irererê, marrecos, jaçanãs) (Fig.5) (FERREIRA, et al 2004). Ainda nesta região, Pegoraro (2004) registrou 144 espécies de aves, dentre eles, o mergulhão-caçador, biguás, garça branca, garça cinza, maria-faceira, socó-boi, gaviões, seriema. A presença de aves aquáticas está fortemente associada com o decréscimo da qualidade das águas em represas, pois a contaminação fecal contribui para o aumento de coliformes fecais e para a disseminação de enteropatógenos (GRACZYK et al, 2008, KIRSCHNER et al, 2004; SMITH et al, 1993).

Em relação à vegetação, Pegoraro (2003) obteve informações importantes sobre a paisagem primitiva da região do Mini-Pantanal e a transformação da mesma pela ocupação antrópica e vegetação arbórea. Há visível dominância de sangra-d'água (*Croton urucurana*) que cresce sobre faixas de terras nas quais a vegetação arbórea natural foi suprimida no decorrer do processo de ocupação ou que foi encoberta pelas águas do reservatório. Foi verificado também que o maior remanescente de vegetação natural (Mata Mesófila) ainda se encontra conservado nas proximidades da represa e do Mini-Pantanal na Fazenda Saltinho, sendo conhecido como Mata do Saltinho. Dentre as 34 espécies arbóreas, estão incluídas: *Tabebuia* sp (ipê-amarelo), *Chorisia speciosa* (paineira), *Croton urucurana* (sangra d'água), *Cariniana estrellensis* (jequitibá-branco), *Cedrella fissilis* (cedro).

Dos 4 pontos de coleta incluídos neste estudo, o Ponto 1 é o que se situa mais próximo do despejo do rio Atibaia o que contribui para o maior recebimento de esgotos de origem doméstica, uma das principais fontes de *Escherichia coli*, além das significativas concentrações de coliformes (coliformes totais:  $6,3 \times 10^5$  NMP/100mL; coliformes termotolerantes:  $2,0 \times 10^4$  NMP/100mL; *E.coli*:  $7,0 \times 10^3$  NMP/100 mL) observadas nesse ponto. Estes dados são concordantes com àqueles da Cetesb (2009) que registrou em águas superficiais de dois pontos do Rio Atibaia localizados à montante do reservatório de Salto Grande, concentrações médias de coliformes termotolerantes de  $5,51 \times 10^3$  NMP/100 mL na jusante de Paulínia e  $1,7 \times 10^4$  NMP/100 mL na captação de Sumaré (perto do Mini-Pantanal), acima dos limites estabelecidos no CONAMA 357/05 (BRASIL, 2005). Além de coliformes, as concentrações de fósforo total também foram elevadas (0,367 mg/L e 0,533 mg/L).

As altas concentrações de coliformes (totais, termotolerantes e *E.coli*) no ponto 1 comprovam a contribuição do rio Atibaia na alteração da qualidade da água neste ponto.

Por ser um ambiente lótico, os valores de turbidez ( $\bar{x} = 53,20$  NTU) observados no ponto de coleta 1 foram devidos ao significativo aporte de matéria orgânica oriunda da bacia de contribuição. Ressalte-se que a concentração de fósforo ( $1.690 \mu\text{g/g}$ ) constatada no sedimento deste ponto indica que este aporte é advindo predominantemente das contribuições do rio Atibaia (CETESB, 2009). Quanto à turbidez, os valores obtidos pela CETESB (2009) foram de 80 NTU (jusante de Paulínia) e 70 NTU (captação de Sumaré), ligeiramente maior que a observada neste estudo e está relacionada com a caracterização granulométrica do sedimento (areno-siltico-argilosa com significativa presença de finos) (CETESB, 2009). Chalar (2006) ressaltou que o alto conteúdo de fósforo total, fósforo solúvel reativo e ferro associados com partículas em suspensão e colóides foram fatores que contribuíram para a alta turbidez do reservatório de Salto Grande (Uruguay) oriundos do processo de erosão.

A ocorrência de chuvas que antecederam a coleta das amostras de água superficial da represa (50% das coletas) contribuiu para a grande concentração de partículas oriundas do revolvimento do sedimento e do escoamento de águas da superfície do solo e influenciaram os valores de turbidez observados neste estudo (Anexos A e B).

A matéria orgânica e os metais presentes no sedimento quando revolvidos ou advindos dos esgotos domésticos e industriais, encontram-se como partículas dissolvidas na água contribuindo para o aumento do valor da cor (observado no ponto 1), situação similar em relação à turbidez já que há grande quantidade de material em suspensão, principalmente, partículas do solo e fezes de animais silvestres que são abundantes no Mini-Pantanal.

Neste estudo foram registrados valores de pH tendendo à alcalinidade (6.93-7.5) (Fig.15). Esta tendência também foi registrada na represa de Salto Grande por Agujaro (2007), com valores de pH de 6.70 a 9.50. Entretanto, Espíndola et al (2004b) compilaram vários estudos sobre a represa de Salto Grande (entre 1986 e 2006) que registraram valores de pH com maior tendência à acidez (abaixo de 7.0). Em 2008, a qualidade das águas do Rio Atibaia no ponto de captação do município de Sumaré, a

jusante de Paulínia, foi comprometida devido ao elevado Potencial de Formação de Trihalometanos, verificado principalmente no período chuvoso e está associado ao arraste de substâncias húmicas depositadas na bacia e carregadas para as coleções hídricas por meio dos eventos de precipitação (CETESB, 2009).

Nesse ponto, foi registrada a ocorrência de cistos de *Giardia* spp. em 16,66% das amostras, nos meses de junho (102 cistos/L) e agosto (224 cistos/L) (Anexo A). Entretanto, não foram registradas concentrações de oocistos. Ajeagah et al (2007) estudaram a ocorrência de oocistos e cistos em um lago eutrófico tropical de Yaonde (África), utilizando a técnica de flutuação em sulfato de zinco e coloração por Ziehl-Neelsen modificada. Na entrada do lago, a densidade de cistos de *Giardia* spp. foi de 352 cistos/L. LeChevallier et al (1997) analisaram amostras de água de 6 represas em New Jersey e registraram 0,71 a 24,2 cistos/100 L de *Giardia* spp. Lopes (2009) avaliou a ocorrência de protozoários na represa de Vargem das Flores (Minas Gerais) empregando Filtá-Max<sup>®</sup>, sendo encontrado 0 a 8 cistos/10L e 0 a 4 oocistos/ 10L. Franco et al (2001) utilizaram a técnica de filtração em membranas e registraram positividade de 33 a 95 cistos/L de *Giardia* spp nas amostras de água superficial do rio Atibaia que sofre constante influência de esgoto doméstico. Em outro estudo, Cantusio (2004) registrou concentração média de 32 cistos/l na água bruta do rio Atibaia.

A presença de aves aquáticas na região do Mini-Pantanal também é um fator que contribui para a positividade de protozoários nas águas do reservatório, já que muitas espécies de aves são hospedeiras de cistos de *Giardia* spp. e de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (GRACZYK et al, 2008).

Neste ponto não foi observada correlação significativa entre os coliformes (termotolerantes e totais) e presença de cistos de *Giardia* spp. (Tab. 23). LeChevallier (1997) constataram que a ocorrência de coliformes fecais não coincidiu com a detecção de *Giardia* spp. em represas. Outro estudo também não registrou correlações entre protozoários e bactérias indicadoras (coliformes fecais e *Clostridium perfringens*) em amostras de água superficial de rios (CHAURET et al, 1995).

O transporte de patógenos através do reservatório depende de fenômenos físicos como sedimentação e biológicos como inativação e predação. Em relação à sedimentação, os protozoários *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. apresentam

diferentes taxas (0,84 mm/s e 0,36 mm/s, respectivamente), refletindo diferenças entre estes organismos de carga superficial, hidrofobicidade, afinidade de agregação, bem como o tamanho e densidades das partículas. A agregação de partículas com matéria orgânica ou minerais (argila) é um dos fatores mais importantes relacionados ao transporte, sedimentação ou sobrevivência do patógeno (DAI e BOLL, 2006; SEARCY et al, 2005).

A predação pode causar mudanças no transporte de patógenos pela represa, principalmente na sedimentação, ao serem eliminados junto com o “pellet” fecal do predador (protozoários de vida-livre ou zooplâncton) (BROOKES et al, 2004).

Ainda neste ponto, não foi analisada como parâmetro biológico a contagem de cianobactérias, pois neste local não há condições estáveis da coluna d'água, fator que favorece o desenvolvimento de cianobactérias e algas.

O ponto 2 representa a região de transição para a represa (ambiente lântico) cuja área marginal apresenta chácaras de lazer e bairros residenciais que contribuem para o aumento da poluição e assoreamento (Fig.6) As condições hidrodinâmicas da represa são as principais causas da variabilidade horizontal (desde a entrada do reservatório até à barragem) (Fig.3) (STRASKRABA e TUNDISI, 1999). Assim, este ponto está sob influência do rio Atibaia, apresentando semelhança quanto aos parâmetros físico-químicos (cor, turbidez e temperatura) e microbiológicos ao ponto 1 (Tab.15), pois não foram encontradas diferenças significativas. Neste local, ocorre o assoreamento, onde há deposição das partículas sólidas. Existe uma tendência natural para que este material particulado seja depositado, ao encontrar água com menor velocidade (alteração do fluxo), conforme a maior ou menor granulação das partículas e a menor ou maior turbulência do escoamento (GLYMPH, 1973; CARVALHO, 2000).

Ressalte-se que neste ponto, ambos os protozoários patogênicos de veiculação hídrica foram detectados: cistos de *Giardia* spp. em 41,6% das amostras de água (122 a 203 cistos/L) e, no mês de maio, houve a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp (170 oocistos/L).

A influência de águas mais rasas neste ponto, além do enriquecimento orgânico proveniente do esgoto de chácaras lançado diretamente no reservatório (comunicação pessoal, José Carlos- Barco Escola da Natureza) e presença de animais domésticos

como cães, porcos, bovinos (Fig.16 e Fig.17) são os principais fatores que favoreceram a ocorrência destes parasitos.

Keeley e Faulkner (2008) sugeriram que bovinos foram os principais contribuidores de oocistos de *Cryptosporidium* na água superficial do lago Texoma (Texas, EUA). Castro-Ermida et al (2009) atribuíram a predominância de criação de bovinos à positividade para cistos e oocistos na região onde foram coletadas as amostras de água superficial (Bacia do rio Tambre, Espanha). Hsu et al (1999) encontraram em 80% e 60% das amostras de água bruta superficial (próximas às regiões de criação de porcos) da Bacia do Rio Kau-Ping (Taiwan), cistos de *Giardia* spp.(concentração média de 4.776/100L) e oocistos de *Cryptosporidium* spp. (concentração média de 1.956/100L), respectivamente. Em outro estudo, Tsushima et al (2001) apontaram fezes de bovinos como fonte de contaminação de águas superficiais de 10 rios da região de Hokkaido (Japão), registrando concentrações médias de 16,73 oocistos /100 litros em 14 amostras de água bruta.

Enquanto a sedimentação reduz o número de patógenos na água (BROOKES et al, 2004), é pouco provável que oocistos de *Cryptosporidium* sedimentem rapidamente, devido à sua movimentação na água superficial a partir do ponto de contaminação, porque há uma diminuição de sua carga superficial na água. Ressalte-se que oocistos com carga neutra não aderem-se às partículas de solo, nem são removidos por sedimentação (ONO et al, 2001). Uma possível explicação para este fenômeno é a mudança ou neutralização das cargas superficiais dos oocistos, após serem lixiviados do adubo animal e influenciados pela força iônica da água, os quais resultam na dissociação do material particulado e redução da taxa de sedimentação (BUTKUS et al, 2003; MEDEMA et al, 1998).

No ponto 2 foi observada correlação entre cistos de *Giardia* spp, coliformes termotolerantes e *E.coli*, entretanto, não houve correlação com oocistos. LeChevallier e Norton (1992) verificaram correlação entre oocistos de *Cryptosporidium* e coliformes em amostras de água bruta; entretanto, Lipp et al (2001) não constatarem correlação entre *Cryptosporidium* e coliformes totais em amostras de água superficiais. Embora, *Cryptosporidium*, *Giardia*, *E.coli* e coliformes tenham como mesma origem, as fezes de animais e de serem diluídos igualmente no corpo d'água, a ausência de correlação

entre estes organismos reflete diferenças nas taxas de sobrevivência e sedimentação (KEELEY e FAULKER, 2008). *Giardia* e *Cryptosporidium* são conhecidos por sua capacidade de sobrevivência por vários meses em comparação com os indicadores fecais que morrem mais rapidamente do que os protozoários (HÖRMAN et al, 2004).

Em ambos os pontos, a detecção dos protozoários foi coincidente com a ocorrência de chuvas que antecederam as coletas das amostras de água (Anexo A e Anexo B). KEELEY e FAULKNER (2008) também observaram correlação entre oocistos de *Cryptosporidium* e ocorrência de chuvas no lago Texoma (Texas).

Os pontos 3 e 4 representam ambientes lênticos, pois sofrem pouca influência do rio Atibaia e localizam-se na região do represamento (Fig. 7 e Fig.8). A dinâmica deste sistema está relacionada ao processo de estabilização da água, da biomassa vegetal e animal, uma vez que muitos eventos se sucedem após o barramento do rio. Esta estabilização depende do volume da represa, do tempo de retenção, da morfometria, das características gerais da área inundada, dos usos da bacia hidrográfica e da qualidade da água dos rios formadores (ESPÍNDOLA et al, 2004b).

A taxa de sedimentação de material particulado em reservatórios é maior que em sistemas lóticos o que ocasiona maior tempo de retenção de água no corpo do reservatório e favorece a deposição desses particulados, que podem conter metais e outros elementos adsorvidos em sua superfície (DORNFELD et al, 2004).

O ponto 3 situa-se na Praia Azul, antigo pólo turístico da cidade de Americana-SP na década de 70. Nesta época iniciou-se a valorização desta região com construções de casa de veraneio, esportes náuticos, pesca, natação, tornando a represa de Salto Grande um dos grandes atrativos da região. Atualmente, a região da Praia Azul apresenta áreas de pastagens, urbanizadas e na sua margem oposta, cultura de cana-de-açúcar e de laranja (FONSECA, 2008). A poluição destas águas gerou problemas como proliferação de cianobactérias e aguapés, prejudicando a balneabilidade, até que foram declaradas impróprias para o banho (Fig.18 e Fig.19) (SPERANDIO e SPADACIO, 2009). A prática de pesca realizada pelos moradores desta região é freqüente (Fig.20)

As concentrações de coliformes observadas neste ponto (coliformes totais:  $3,46 \times 10^3$  NMP/100 mL; coliformes termotolerantes:  $5,31 \times 10^2$  NMP/100 mL; *Escherichia*

*coli*:  $2,9 \times 10^1$  NMP/100 mL) foram menores em relação as do ponto 1 e 2. Estatisticamente, estes pontos apresentaram diferenças significativas em relação aos indicadores fecais (Tab.17). O processo de sedimentação pode ter contribuído para a diminuição dos organismos, retendo-os no sedimento, cuja matéria orgânica serve como nutriente à estes organismos. Estas menores concentrações também podem ser atribuídas às macrófitas (Fig.19) que, à semelhança dos leitos cultivados, atuam reduzindo ou removendo contaminantes incluindo matéria orgânica, inorgânica e patógenos da água (KIVAISI, 2001). Poluentes como metais pesados, nitrogênio e fósforo podem ser adsorvidos ou absorvidos pelo sistema radicular das plantas aquáticas, contribuindo para a remoção destas substâncias no meio aquático. Estas plantas transportam oxigênio dos órgãos aéreos para as raízes, promovendo a oxidação de matéria orgânica e principalmente de coliformes fecais (DINIZ et al, 2005; VALENTIM, 1999).

Quanto à turbidez, o valor médio foi de 46,90 NTU, menor que o do ponto 1 (53,20 NTU), porém, maior que o ponto 2 (43,15 NTU). Entretanto, estes pontos não apresentaram diferenças significativas (Tab. 15). As fontes difusas de esgoto doméstico, a floração de cianobactérias, a presença de macrófitas e o escoamento superficial do solo usado para agricultura, contribuíram para os valores de turbidez nesse ponto. De acordo com CETESB (2009), o sedimento do reservatório é caracterizado como argilosa com elevadíssimo teor de finos, condição típica de ambientes deposicionais. A concentração de fósforo ( $2.400 \mu\text{g/g}$ ) constatada no sedimento desta represa confirma a alteração da qualidade da água ainda refletindo que este aporte é advindo predominantemente das contribuições do rio Atibaia (CETESB, 2009).

O ponto 3 apresentou maiores valores de pH devido ao consumo de  $\text{CO}_2$  das cianobactérias no processo de fotossíntese (OLIVER e GANF, 2000). Quanto maior o consumo de  $\text{CO}_2$ , menos ácido carbônico é produzido na água. Ressalte-se que em águas neutroalcalinas (pH: 6 a 9), temperatura entre  $15^\circ\text{C}$  a  $30^\circ\text{C}$ , altas concentrações de fósforo e nitrogênio, e baixas concentrações de gás carbônico, há um crescimento favorável das cianobactérias (CHORUS e BARTRAM, 1999).

Nesse ponto, foram registradas concentrações de 526.248 células/mL de cianobactérias (Fig.18). A produção de microcistinas pela *Microcystis aeruginosa* é outro fator que interfere na qualidade do corpo d'água. Quanto à balneabilidade, a Resolução CONAMA 274/2000 (BRASIL, 2000) que define os critérios para a classificação de águas destinadas à recreação de contato primário, diz que uma praia pode ser considerada imprópria quando ocorrerem circunstâncias que desaconselhem a recreação de contato primário como florações de algas ou outros organismos. De acordo com Oliver e Ganf (2000), considera-se uma floração, quando o número de células de cianobactérias ultrapassa 10.000 céls./mL que, dependendo da espécie, não promove nenhuma alteração de coloração ou formação de espumas. Neste estudo, ao registrar altas concentrações de cianobactérias, o reservatório de Salto Grande pode oferecer risco à população (Fig.22 e Fig.23).

No estudo piloto realizado em 2007, para pesquisa de protozoários no reservatório de Salto Grande, foram observadas cianobactérias dos gêneros *Microcystis* e *Planktotrix*. No estudo de Souza (2000) ao avaliar a comunidade fitoplânctônica, a classe Cyanobacteria foi o grupo dominante, sendo *Microcystis aeruginosa* a principal responsável pelos elevados valores de densidade de biomassa no reservatório de Salto Grande. Uma importante consideração levantada pela autora foi a hipótese das macrófitas funcionarem como barreiras protetoras contra ventos e correntes e contribuírem para o aumento das florações de *Microcystis spp*, especialmente nas margens.

Em relação aos protozoários, não foram encontradas concentrações de cistos e oocistos, no ponto 3, provavelmente em razão do processo de sedimentação que ocorre no ambiente lântico, como é o caso deste ponto.

O ponto 4 situa-se na região do late Clube, local onde há maior freqüência de banhistas, ocorrendo principalmente prática de esportes náuticos (jet-sky e Sky aquático) (Fig. 24). Este ponto apresentou semelhanças quanto aos parâmetros físico-químicos e densidade de cianobactérias em relação ao ponto 3 (Tab.15 e Tab.17).

Nesse ponto foram registradas temperaturas da água mais altas em relação aos outros pontos (1, 2, 3) podendo ser atribuídas à maior exposição solar do corpo d'água

o que deve ter contribuído para que as concentrações de coliformes fecais fossem significativamente menores em relação às aquelas do ponto 3 (Tab.17).

A ação microbicida da luz solar sobre os microrganismos se deve principalmente aos efeitos da radiação UVA (320–400 nm) que chega à superfície terrestre pois atinge os ácidos nucleicos e promove reações fotoquímicas de efeito microbicida (DANIEL et al, 2001). Diversos autores citam que o efeito bactericida da radiação solar na água depende do nível de oxigênio dissolvido (CURTIS et al, 1992; GOURMELON et al, 1994).

Descargas químicas no corpo d'água do reservatório também podem ter contribuído para este decaimento. Neste estudo, foi observada mortalidade de peixes no reservatório de Salto Grande no mês de janeiro de 2008 podendo indicar uma possível contaminação química das águas superficiais da represa de Salto Grande (Fig.21).

Foram registrados neste ponto, valores de pH (6.92 a 9.87) que também tenderam à alcalinidade como no ponto 3, devido à grande densidade de cianobactérias (459.827 células/mL), sendo observada a correlação entre pH e cianobactérias (Tab.26). A maioria das bactérias não tolera valores de pH acima de 9.5 e abaixo de 4.0. Neste local, também foram constatadas macrófitas, outro fator que influencia na densidade de coliformes.

Os indicadores microbiológicos, dentre eles, *E.coli*, apresentam elevadas concentrações nas regiões adjacentes à intrusão de rios, mas diminuem à medida que aumenta o represamento (BROOKES et al, 2005; BROOKES et al, 2004). Neste ponto também não houve ocorrência de *Giardia* spp e *Cryptosporidium* spp devido ao processo de sedimentação mais acentuado que no ambiente lótico (P1 e P2).

A detecção de cistos e oocistos somente nos pontos 1 e 2 pode ser decorrente da proximidade destes com o local do deságüe do rio Atibaia, além da contaminação fecal proveniente de animais domésticos de atividades agropastoris e silvestres (bovinos, suínos, aves aquáticas) (Fig.15 e Fig.16) que habitam o Mini-Pantanal. Brookes et al (2005) hipotetizaram que oocistos de *Cryptosporidium* spp. exibam maior afinidade por matéria orgânica (p. ex: afluentes de esgoto) que por partículas inorgânicas. Ainda que cistos de *Giardia* spp. sejam mais detectados que oocistos de

*Cryptosporidium* spp., por seu maior tamanho, OLIVEIRA (2005) e CANTUSIO e FRANCO (2004) relataram o encontro de 1 ou 2 amostras positivas por ano, no verão e início de outono (abril), ao relatarem o monitoramento destes protozoários no rio Atibaia, sendo também constatado nesta pesquisa (1 amostra positiva para *Cryptosporidium* spp.)

No caso deste estudo, pesquisas moleculares não foram realizadas devido aos inibidores (ácido húmicos, fúlvicos, metais pesados) presentes no corpo d'água.

Já a ausência dos protozoários nos pontos 3 e 4, justifica-se por localizarem-se distantes do rio Atibaia. Além disso, é possível que o processo de sedimentação dos patógenos durante o represamento, tenha influenciado na distribuição e ocorrência destes protozoários no corpo d'água do reservatório de Salto Grande. Hachich et al (2004) ao realizarem a investigação de protozoários nas águas superficiais das bacias hidrográficas do estado de São Paulo, relataram que mananciais lênticos apresentaram menor ocorrência de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp., que mananciais lóticos.

As florações de cianobactérias que ocorreram nos pontos 3 e 4 (Fig.18) acrescentaram dificuldades na detecção dos protozoários, devido à reação cruzada entre os anticorpos monoclonais fluorescentes para *Giardia* e *Cryptosporidium* com os epítomos de parede das cianobactérias (RODGERS et al, 1995), que podem exibir padrão de fluorescência similar durante a visualização na microscopia (Fig.26) Por este motivo, adotou-se nesse estudo, critérios rigorosos de positividade fundamentados naqueles estabelecidos pela USEPA (2005), incluindo a observação de aspectos morfológicos em microscopia de contraste de fase e epifluorescência. Convencionou-se também utilizar a purificação por separação imunomagnética nas amostras que apresentaram cianobactérias (nos meses de fevereiro, abril e junho) e mesmo assim, protozoários não foram encontrados.

A cianobactéria *Microcystis* spp. presente no reservatório de Salto Grande, possui tamanho esférico e mede em torno de 4 µm (RODGERS et al, 1995), podendo ser confundida com oocistos de *Cryptosporidium* spp. Porém, tal organismo possui forma colonial e apresenta uma camada mucilaginosa em torno das células podendo ser visualizada pela microscopia óptica. No caso deste estudo, a diferenciação ainda se fez pela microscopia de contraste de fase, na observação de estruturas internas como

esporozóitos, núcleos, corpos em crescente ou axonema dos protozoários. Além disso, a fluorescência das cianobactérias não corresponde aos critérios de positividade de protozoários propostos pela USEPA, devido à ausência de sutura nas células (presente em oocistos), fluorescência difusa e não uniforme das células. A cianobactéria *Cryptomonas* sp. (Fig.26) apresenta morfologia semelhante à *Giardia*, entretanto, não há presença de axonemas. O resultado da leitura das preparações realizadas sem a separação imunomagnética foi corroborada com os resultados obtidos quando da realização da purificação de protozoários empregando esta tecnologia, nas quais não houve a detecção dos protozoários (amostras de água com florações de cianobactérias nos meses de fevereiro, abril, julho).

A recuperação de protozoários em amostras hídricas, a despeito do método empregado pode ser afetada por muitas variáveis, incluindo a matriz de água bruta quanto à sua composição orgânica e inorgânica. A presença de partículas de argila, areia, metais e pH da amostra de água também afetam as taxas de recuperação (MCCUIN et al, 2001; McELROY et al, 2001; KUHN et al, 2002). Para Bradford e Schiyen (2002), a composição química da água é fator tão importante quanto a turbidez no caso da detecção dos protozoários *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp.

Considerando a metodologia de filtração em membranas, a alta turbidez da amostra impacta negativamente a performance deste método, devido ao grande número de partículas que contribuem para a obstrução dos poros da membrana, com conseqüente redução do volume efetivamente filtrado (CARRENO et al, 2001). Por este motivo, utilizou-se mais de uma membrana por amostra neste estudo.

A carga superficial negativa dos protozoários também influencia na detecção, pois oocistos de *Cryptosporidium* spp. aderem-se às partículas e exibem baixa hidrofobicidade; quanto maior a turbidez, maior a adesão a elas, prejudicando a eficiência de captura destes organismos. Ressalte-se que cistos de *Giardia* spp. tem um “comportamento” hidrofóbico o que pode permitir uma maior recuperação dos cistos (DAI et al, 2004; HSU e HUANG, 2002). Kim et al (2006) recomendam o uso de Tween 20, ao invés de Tween 80, para a eluição das amostras nas quais o objetivo é recuperar cistos de *Giardia* spp., pois o Tween 20 apresenta um maior balanço hidrofílico-lipofílico que o Tween 80.

O pH é outro fator que também influencia os valores de recuperação dos cistos e oocistos, pois interfere com as características de superfície da célula e influencia a estabilidade das ligações antígeno-anticorpo (COOK et al., 2006). Em pH neutro e ligeiramente ácido há melhores recuperações (HSU e HUANG, 2002; COOK et al., 2006). Cook et al (2006) relataram que pH ao redor de 5,5 favorece a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras ambientais. O potencial zeta de cistos e oocistos também é influenciado pelo pH e, esta força de adesão fica mais negativamente carregada quanto maior for o pH (HSU e HUANG, 2002). A tendência à alcalinidade das amostras de água dos pontos 1, 2, 3 e 4 pode ter interferido na recuperação de cistos e oocistos, pois a carga superficial e a agregação às partículas dos cistos e oocistos dependem do pH.

A realização dos ensaios-controle foi inicialmente realizada no ponto 2. A escolha deste ponto justifica-se pelo fato de que é justamente neste local que se inicia o represamento das águas e, nas margens, verifica-se a presença de bovinos. A baixa recuperação de oocistos (1,77%) e cistos (0,87%) no ensaio controle de fevereiro pode ser devido à alta turbidez (93 NTU) da amostra de água, já que ocorreram chuvas no dia anterior à coleta, favorecendo a agregação de oocistos às partículas presentes na amostra e, desta forma, oocistos não foram detectados nas amostras examinadas. Nos meses de maio e agosto houve uma diminuição da turbidez (70 NTU e 23,6 NTU, respectivamente) acarretando uma melhora na recuperação de protozoários (5,4% a 6,0% para oocistos e 21,5% a 74,6% para cistos). No mês de novembro, a turbidez da água foi de 25,9 NTU, gerando uma recuperação de oocistos de 8,3% enquanto para cistos a recuperação foi de 34,78%.

Feng et al (2003) verificaram o efeito da turbidez e das partículas na recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* spp a partir de matrizes de água bruta de represa. Em amostras de água que apresentaram turbidez de 1,8NTU, a recuperação de oocistos foi de 63,3%. Quando a turbidez subiu para 5 NTU, o valor de recuperação foi de 85%. Porém, houve um decréscimo na recuperação de oocistos para 24,9% quando a turbidez foi de 40 NTU. Estes resultados sugeriram que um grau moderado de turbidez ressalta a recuperação, mas, turbidez muito alta pode declinar a recuperação.

Quando empregado o Método 1623, Keeley e Faulkner (2008) também observaram a influência da turbidez nos ensaios de recuperação de cistos e oocistos em lagos que recebem esgoto. Em amostras de água com alta turbidez ( $33\pm 18$  NTU), as recuperações foram de  $49\%\pm 24$  oocistos e  $24\%\pm 20$  cistos enquanto para baixa turbidez ( $7\pm 11$  NTU), as recuperações foram de  $57\%\pm 15$  oocistos e  $24\%\pm 13$  cistos, ressaltando que as recuperações de cistos foram mais baixas do que as de oocistos.

A aplicação da separação imunomagnética nas amostras dos ensaios controle dos pontos 1, 2, 3 e 4 não acarretou aumento da sensibilidade da metodologia de filtração em membranas para oocistos de *Cryptosporidium* spp, porém, a IMS aumentou a recuperação de cistos de *Giardia* spp.(Tabela 11). O valor anômalo de recuperação de cistos de *Giardia* spp nos pontos 3 e 4 deve-se às diferenças de contagem dos cistos de *Giardia* spp. no preparo do inoculo (BELLAMY, 2004) (Tabela 11). Quando comparados com os critérios de performance estabelecidos pela USEPA (2005) (13 % a 111 % para *Cryptosporidium* spp. e 15 % a 118 % para *Giardia* spp.), em três ensaios (P2, P3 e P4), as médias de recuperações de *Giardia* alcançaram os padrões estabelecidos no caso da filtração em membranas sem a etapa de purificação por IMS. Para *Cryptosporidium*, apenas em 2 ensaios (P3 e P4), esses valores foram atingidos (Tab.11).

As baixas recuperações de oocistos obtidas nos ensaios-controle com IMS nos pontos 1 e 2, podem ser atribuídas ao efeito da matriz de água, já que características inerentes como turbidez, pH, cátions divalentes, algas e ferro podem afetar o processo de separação imunomagnética (WARE et al, 2003, PATON et al., 2001; COOK et al., 2006).

Nos ensaios-controle com IMS, a turbidez pode ter influenciado no desempenho da etapa de purificação. Estudos revelaram que um dos fatores críticos para a eficiência do processo de separação imunomagnética é o volume do sedimento, sendo que o seu aumento implica na diminuição do valor da captura (QUINTERO-BETANCOURT et al, 2003; USEPA, 2005); em águas com material particulado, a eficiência de recuperação diminui à medida que aumenta a turbidez (SAFARIKOVA E SAFARIK, 2001). Sabe-se que quanto maior o volume do sedimento submetido à purificação por IMS, menor é a eficiência da captura de oocistos (HSU e HUANG, 2001).

Os fabricantes dos kits de separação imunomagnética recomendam que seja considerada a proporção de 500 µL do sedimento: 100 µL de esferas ou “beads” no processamento da amostra. Conseqüentemente, quanto maior o sedimento resultante no final da eluição, maior o custo e tempo de análise, pois há a necessidade de alíquotar o sedimento, e processar individualmente cada uma delas (Dynabeads® GC-Combo).

Os valores de pH das amostras de água dos pontos 3 e 4 com tendência à alcalinidade, podem ter influenciado no processo de separação imunomagnética, pois para uma melhor performance desta etapa de purificação, o pH 7.0 deve ser mantido durante todo o processo. Ainda, a estabilidade dos tampões dos kits de IMS varia de acordo com a marca comercial (KUHN et al, 2002). KUHN et al (2002) relataram que é imprescindível que, à cada etapa, seja feita a mensuração do pH e caso necessário, sejam efetuadas correções. Esses autores ainda demonstraram que àquelas reações onde os valores de pH foram ajustados para 7.5, houve maior recuperação de organismos que nos ensaios onde ocorreram flutuação do pH.

O tempo e a velocidade de rotação, os compostos químicos presentes na amostra de água, a presença de cátions divalentes, são outros fatores interferentes no processo de IMS (SMITH e NICHOLS, 2009; HU et al, 2004).

Ainda, a etapa de purificação com separação imunomagnética pode ser afetada também, pelos níveis de carbono orgânico e ferro presentes na matriz de água (DIGIORGIO et al., 2002). No sedimento do reservatório de Salto Grande, as concentrações de ferro registradas pela CETESB (2009) foram de 40.226 µg/g a 65.492 µg/g. Leite et al (2004) analisaram amostras de água do reservatório de Salto Grande e verificaram concentrações máximas de ferro de 0,72 mg/L e mínima de 0,37mg/L, superiores àquelas estabelecidas pelo CONAMA 20/86 (BRASIL, 1986) para águas de Classe 2. Yakub e Stadterman-Knauer (2000) sugerem que a presença de ferro na água teria um efeito inibitório na recuperação destes protozoários, por interferir na etapa de formação dos complexos microesferas-anticorpos e epítomos dos cistos/ooquistos durante o procedimento de separação imunomagnética, devido à interação entre o ferro dissolvido e a superfície de cistos e oocistos.

Outro fator que pode ter influenciado na performance da separação é o emprego da dissociação ácida. Ware et al (2003) constataram que a dissociação térmica

acarretou melhores taxas de recuperação de organismos quando comparada à dissociação ácida. Em ensaios com água reagente, foram relatadas taxas de 71% para a dissociação dos complexos esferas magnetizadas- anticorpos de captura-oocistos de *Cryptosporidium* spp. pelo aquecimento à 80°C por 10 minutos enquanto a dissociação pela adição de 50µL de HCl 0,1N acarretou recuperação média de 41%, sendo que a diferença entre as dissociações foram estatisticamente significativas ( $p < 0,0001$ ). Entretanto, esses autores observaram menores taxas de recuperação quando os ensaios foram realizados tendo por matriz água superficial de rios (dissociação térmica: 51%; dissociação ácida: 10%;  $p < 0,0001$ ).

Quanto à qualidade da coloração dos dois kits comerciais de anticorpos monoclonais, o kit Crypto/Giardia-Cel IF Test<sup>®</sup> apresentou melhor desempenho que Merifluor<sup>®</sup>, considerando os *scores* apresentados na Tabela 27. Santos et al (2004) observaram maior intensidade de fluorescência de oocistos quando utilizado o kit Crypto/Giardia-Cel IF Test<sup>®</sup> quando comparado com Merifluor<sup>®</sup>, permitindo o contraste com o material interferente da amostra e facilitando a identificação de *Cryptosporidium* spp.

Em suma, a presença dos protozoários na represa de Salto Grande pode ser atribuída principalmente à carga poluidora de esgotos afluentes (rio Atibaia), mas também à ocupação antrópica no entorno da represa, além da presença de animais domésticos e silvestres.

Para a continuidade desta investigação, torna-se interessante, em um futuro estudo, avaliar a presença destes protozoários patogênicos no sedimento da represa de Salto Grande, pois, em ambientes ricos em nutrientes, os microrganismos podem sobreviver por períodos mais longos no sedimento do que na superfície (BROOKES et al, 2005, BROOKES et al, 2004), já que os patógenos acumulam-se no sedimento.

A construção de barragens é vantajosa, pois propicia o fornecimento de água para o consumo da população urbana, para produção agrícola e industrial, bem como a geração de energia elétrica. Entretanto, afeta a estrutura dos habitats existentes alterando substancialmente o equilíbrio do ecossistema, quando realizada sem planejamento e de maneira arbitrária em ambientes aquáticos (MARTINS et al, 2003).



**Figura 16 - Presença de bovinos nas margens da região do ponto 2.**



**Figura 17 - Presença de porcos nas margens da região do ponto 2.**



**Figura 18- Florações de cianobactérias nos pontos 3 e 4.**



**Figura 19- Macrófitas aquáticas nos pontos 3 e 4.**



**Figura 20 - Pescadores na região da Praia Azul.**



**Figura 21 - Peixe morto presente no reservatório de Salto Grande.**



**Figura 22 - Placa de “Proibido entrar na água” na Praia Azul.**



**Figura 23 - Crianças se banhando na Praia Azul.**

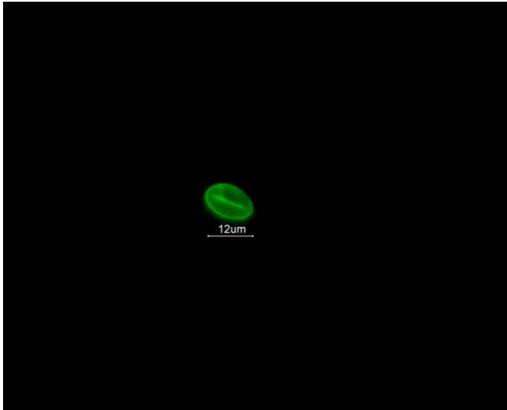


**Figura 24 - Prática de esporte náutico (Jet-sky) no reservatório de Salto Grande.**

**Figura 25- Prancha 1: Aspectos de cistos e oocistos corados com Merifluor® e Crypto/Giardia-Cel I.F.Test® .**

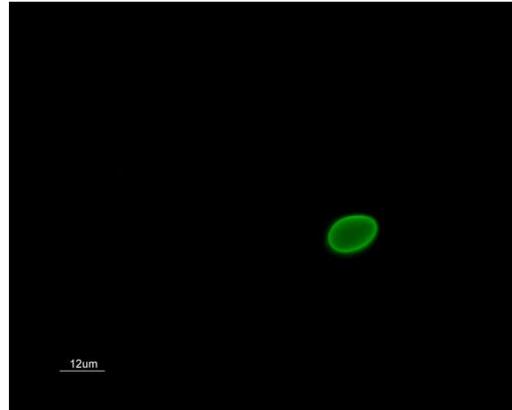
**Merifluor®**

Cisto de *Giardia* spp. (mês de julho)

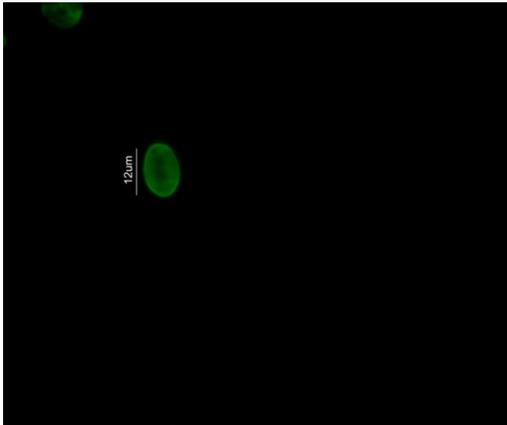


**Crypto/Giardia-Cel IF. Test®**

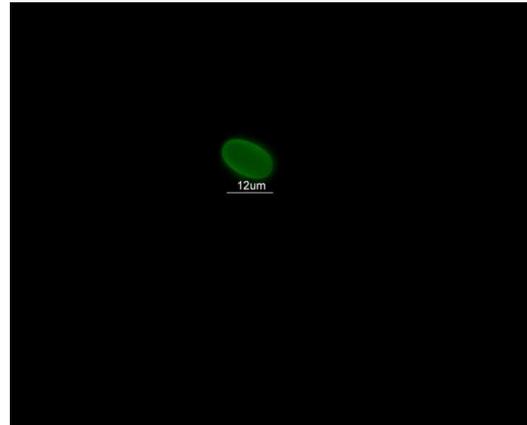
Cisto de *Giardia* spp. (mês de maio)



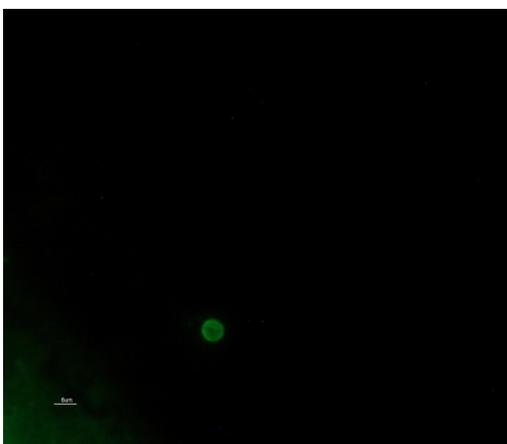
Cisto de *Giardia* spp. (mês de agosto)



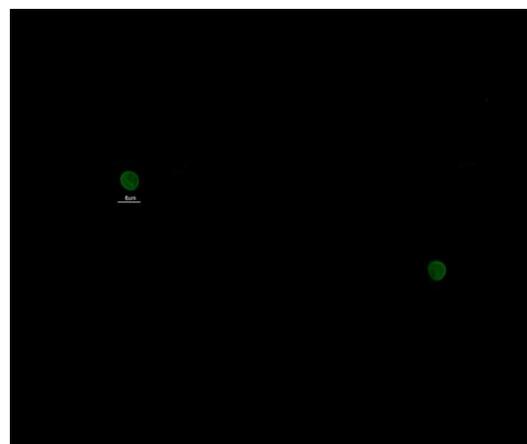
Cisto de *Giardia* spp. (mês de maio)



Oocisto de *Cryptosporidium* spp. (mês de maio)

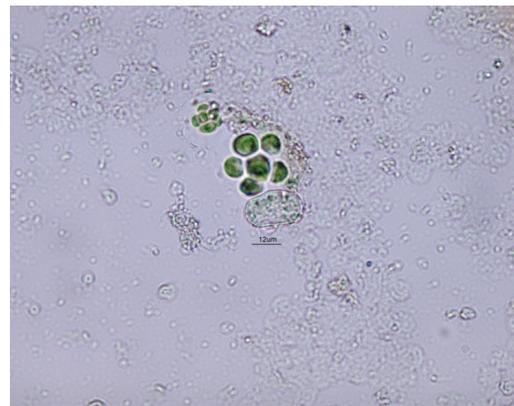
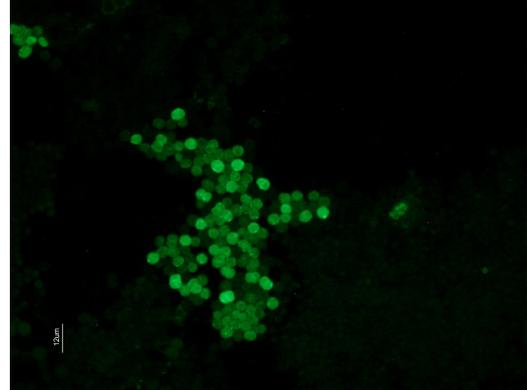


Oocisto de *Cryptosporidium* spp. (controle positivo)

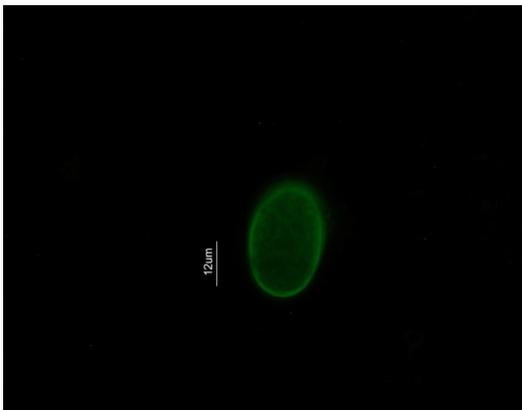


**Figura 26 - Prancha 2: Organismos interferentes encontrados nas amostras de água superficial dos pontos 3 e 4.**

*Microcystis* sp.



*Cryptomonas* sp.



## 7. Conclusões

1. Ambos os protozoários patogênicos de veiculação hídrica, *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp foram detectados nas amostras de água da represa Salto Grande, município de Americana-SP.
2. Cistos de *Giardia* spp. foram detectados nos pontos 1 (Mini-Pantanal) e 2 (Saltinho), com positividade de 16,6% e 41,6%, respectivamente. As concentrações de cistos nas amostras de água foram variáveis: de 102 a 224 cistos/L no ponto 1 e de 122 a 203 cistos/L no ponto 2.
3. Oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram detectados apenas no ponto 2 (Saltinho), com concentração de 170 organismos/L.
4. A proximidade dos pontos 1 e 2 ao despejo do rio Atibaia, a maior turbulência da água e a presença de animais silvestres e de bovinos são fatores que possivelmente contribuíram para a positividade dos cistos de *Giardia* spp. observada neste estudo.
5. Somente no ponto 2, os coliformes termotolerantes e *E.coli* apresentaram correlação com cistos de *Giardia* spp e portanto, neste estudo, se mostraram bons indicadores da ocorrência deste parasito. Entretanto, no caso deste estudo não foram bons indicadores para *Cryptosporidium* spp. A presença de bovinos na proximidade do local da coleta, sugere ser a principal fonte de oocistos.
6. A ocorrência dos protozoários *Giardia* spp e *Cryptosporidium* spp, alta concentração de coliformes fecais e presença de cianobactérias produtoras de cianotoxinas, tais como *Microcystis* sp. reforçam a impossibilidade de atividades de recreação e pesca nesta represa.
7. A técnica de filtração em membranas mostrou boa aplicabilidade para a detecção de cistos e oocistos nas amostras de água de um manancial eutrofizado com presença de floração de cianobactérias.
8. A separação imunomagnética em amostras de água nas quais registrou-se florações de cianobactérias, foi importante para a confirmação da presença/ausência de protozoários.
9. As características da matriz de água (turbidez, pH, presença de metais, cianobactérias) do reservatório de Salto Grande influenciaram fortemente as

taxas de recuperação dos protozoários *Cryptosporidium* spp e *Giardia* spp, especialmente a turbidez.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIQUM (Agência Brasileira da Indústria Química). Relatório de Atuação Responsável, 2008. Disponível em: <http://www.abiquim.org.br/atuaçãoresponsavel/relatorio%5Far2008/>. Acesso no dia 22/03/09.

AFNOR. Qualité de l'eau – Recherche et dénombrement d'oocystes de *Cryptosporidium* et de kystes de *Giardia* – Méthode de concentration et de dénombrement NF T90–455 Juillet 2001, Saint-Denis La Plaine. Association Française de Normalisation, France, 2001. Disponível em: [www.afnor.org](http://www.afnor.org). Acesso no dia 30/01/2009.

AGUJARO, L.F.; CARVALHO, M.C.; ISAAC, R.L.; CANTUSIO NETO, R. Cianobactérias e cianotoxinas: importância na qualidade da água e saúde pública. **Revista Higiene Alimentar**. Edição temática, v.22, p. 116-124, 2008.

AGUJARO, L.F. Subsídios para um plano de monitoramento de cianobactérias em reservatórios com vistas à balneabilidade. Estudo de caso: Reservatório Salto Grande, Americana, SP. **Tese de Doutorado**, Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

AJEAGAH, G.; NJINE, T.; FOTO, S.; BILONG, C.F.B.; KARANIS, P. Enumeration of *Cryptosporidium* sp. and *Giardia* sp. (oo)cysts in a tropical eutrophic lake. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v.4, p.223-232, 2007.

ALDOM J.E.; CHAGLA, A.H. Recovery of *Cryptosporidium* oocysts from water by a membrane filter dissolution method. **Letters in Applied and Microbiology**, v. 20, p. 186–7, 1995.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21<sup>a</sup>ed. Washington: American Public Health Association, Water Works Association e Water Environment Federation, 2005.

ANA (Agência Nacional das Águas). GEO Brasil Recursos Hídricos. Componente da Série de Relatórios sobre o Estado e Perspectivas do Meio Ambiente no Brasil (Resumo Executivo). Agência Nacional das Águas (ANA), Ministério do Meio Ambiente (MMA), Programa das Nações Unidas do Meio Ambiente (PNUMA), Brasília-DF, Janeiro de 2007. Disponível em: <http://www.ana.gov.br/SalaImprensa/projetos/Resumo%20executivo.pdf>. Acesso no dia 21/08/2009.

ARAUZO, M.; VALLADOLID, M. Short-term harmful effects of unionised ammonia on natural populations of *Moina micrura* and *Brachionus rubens* in a deep waste treatment pond. **Water Research**, v.37, p. 2547–2554, 2003.

ARMENGOL, X., BORONAT, L.; CAMACHO, A.; WURTSBAUGH, W. A. Grazing by a dominant rotifer *Conochilus unicornis* Rousselet in a mountain lake: in situ measurements with synthetic microspheres. **Hydrobiologia**, v. 446/447, p. 107–114, 2001.

ARMENGOL, L.; GARCIA, J.C.; COMERMA, M.; ROMERO, M.; DOLZ, J.; ROURA, M.; HAN, B.H.; VIDAL, A.; SIMEK, K. Longitudinal process in canyon type reservoir: the case of sal (N.E. Spain) IN: TUNDISI, J.G.; STRASKRABA, M. (Eds). Theoretical reservoir ecology and its applications. **Brazilian Academy of Sciences and Backhuys Publishers**, p.313-345, 1999.

ARMSON, A.; YANG, R.; THOMPSON, J.; JOHNSON, J.; REID, S.; RYAM, U.M. *Giardia* genotypes in pigs in Western Australia: prevalence and association with diarrhea. **Experimental Parasitology**, v.121, p. 381-383, 2009.

- ASHBOLT, N.J, GRABOW, W.O.K, SNOZZI, M. Indicators of microbial water quality.(Chap. 13.) In: **Fewtrell L, Bartram J, editors. Water quality: guidelines, standards and health Risk assessment and management for water-related infectious disease. London: IWA Publishing/World Health Organization; p. 289–315, 2001**
- ATHERHOLT, T.B; LECHEVALLIER, M.W.; NORTON, W.D.; ROSEN, J.S. Effect of rainfall on *Giardia* and *Crypto*. **Journal of the American Water Works Association**, v.90, p. 66-80, 1998.
- AUSTRALIAN DRINKING WATER 6 National Water Quality Management Strategy. Disponível em: <http://www.nhmrc.gov.au/publications/synopses/eh19syn.htm>. Acesso no dia 2 de novembro.
- BARTA, J.R.; THOMPSON, R.C.A. What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. **Trends in Parasitology**, v.22,p.463-465, 2006.
- BARTRAM, J.; THYSSEN, N.; GOWERS, A.; POND, K.; LACK, T . A joint report from the European Environment Agency and the Water and Health. WHO Regional Office for Europe. WHO Regional Publications 2002; n<sup>o</sup>. 94, p.116.
- BATISTA, A.M.M.; CERQUEIRA, D.A.; MARTINS, F.C.; PÁDUA, V.L.; HELLER, L. Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* sp e cistos de *Giardia* sp em um manancial lântico da região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. In: **XXXI CONGRESSO INTERAMERICANO AIDIS**. Centro de Eventos Casa Piedra, Santiago-Chile, 2008.
- BELLAMY, J.E.C. Quality assurance considerations for detection of waterborne zoonotic parasites using *Cryptosporidium* oocyst detection as the main example. **Veterinary Parasitology**, v.126 p. 235–248, 2004.
- BERINO, E.C.S. Ocorrência e detecção de *Cryptosporidium* sp e *Giardia* sp em águas brutas de abastecimento de formadores do lago Guaíba. **Tese de doutorado**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.
- BERTOLUCCI, G.C.; GILLI, G.; CARRARO, E.; GIACOSA, D.; PUPPO, M. Influence of raw water storage on *Giardia*, *Cryptosporidium* and Nematodes. **Water Science and Technology**, v.37, p. 261–267,1998.
- BILA, D.M; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, v.30, p.651-666, 2007.
- BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W.; GARRITY, G.M. Bergey's manual of systematic bacteriology. 2a ed. New York: Springer-Verlag, 721 p., 2001.
- BONDURANT, D. C.; LIVESEY, R. H. Reservoirs sedimentations studies. In: **ACKERMANN, W. C. et al. (Ed.). Man-made lakes: their problems and environmental effects. Washington: American Geophysical Union**, p. 364-367, 1973.
- BRADFORD, S.A.; SCHIJVEN, J. Release of *Cryptosporidium* and *Giardia* from Dairy Calf Manure: Impact of Solution Salinity. **Environmental Science and Technology**, v.36, p. 3916-3923, 2002.
- BRASIL. Resolução CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente). N<sup>o</sup> 20, 18 de junho de 1986. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 30 de julho de 1986. Disponível em: [www.mma.gov.br/port/conama/res/res86/res2086.html](http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res86/res2086.html). Acesso no dia 27/11/2009.
- BRASIL. Resolução CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente). N<sup>o</sup> 274, 29 de novembro de 2000. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 25 jan. 2001. Seção 1, p. 266- 270. Disponível em: [www.mma.gov.br/port/conama/res/res00/res27400.html](http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res00/res27400.html). Acesso no dia 27/11/2009.

BRASIL. Resolução CONAMA N° 357(Conselho Nacional do Meio Ambiente), 17 de março de 2005. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 17 mar. 2005. Seção 1, p. 58- 63. Disponível em: [www.mma.gov.br/port/conama/res/res05res35705.pdf](http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05res35705.pdf). Acesso no dia 20/09/2009.

BROOKES, J.D.; ANTENUCCI, J.; HIPSEY, M.; BURCHA, M.D.; ASHBOLT, N.J.; FERGUNSON, C. Fate and transport of pathogens in lakes and reservoirs. **Environmental International**, v.30, p. 741– 759, 2004.

BROOKES, J.D; HIPSEY, M.R; BURCH, M. D; REGEL, R. H; LINDEN, L .G; FERGUSON, C. M; ANTENUCCI, J .P. Relative value of surrogate indicators for detecting pathogens in lakes and reservoirs. **Environmental Science and Technology**, v.39, p. 8614-8621, 2005.

BUKHARI, Z.; SMITH H.V.; SKYES, N.; HUMPHREYS S.W.; PATON C.A.; GIRDWOOD R.W.A.;FRICKER C.R. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia* spp. cysts in sewage influents and effluents from plants in England. **Water Science and Technology**, v. 35, p. 385-390, 1997.

BUKHARI, Z.; McCUIN, R,M ; FRICKER, C.R.; CLANCY, J.L. Immunomagnetic separation of *Cryptosporidium parvum* from source samples of various turbidities. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p. 4495-4499,1998.

BURET, A.G.; CHIN, A.C.; SCOTT, K.G.E. Infection of human and bovine epithelial cells with *Cryptosporidium andersoni* induces apoptosis and disrupts tight junctional ZO-1: effects of epidermal growth factor. **International Journal for Parasitology**, v.33, p.1363–1371, 2003.

BURET, A.G. Mechanisms of epithelial dysfunction in *Giardiasis*. **Gut**, v. 56, p. 328–335, 2007.

BURTON, G.A.; GUNNISON, D.; LANZA, G.R. Survival of pathogenic bacteria in various freshwater sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, p. 633-638, 1987.

BUSHEN, O.Y.; KOHLI, A.; PINKERTON, R.C.; DUPNIK,K.; NEWMAN, R.D.; SEARS, C. L.; FAYER, R.; LIMA, A.A.M.; GUERRANT, R.L. Heavy cryptosporidial infections in children in northeast Brazil: comparison of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.101, p. 378-384, 2007.

BUTKUS, M.A.; BAYS, J.T.; LABARE, M.P. Influence of surface characteristics on the stability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.3819–3825, 2003.

CACCIO, S.M.; THOMPSON, R.C.A.; MCLAUCHLIN, J.; SMITH, H.V. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. **Trends in Parasitology**, v.21, p.430-437, 2005.

CAMA, V.A.; BERN, C.; ROBERTS, J.; CABRERA, L.; STERLING, C.R.; ORTEGA, Y.; GILMAN, R.H.; XIAO, L. *Cryptosporidium* species and subtypes and clinical manifestations in children, Peru. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, p. 1567–1574, 2008.

CANTUSIO NETO R.; FRANCO, R.M.B. Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em diferentes pontos do processo de tratamento de água, em Campinas, São Paulo, Brasil. **Higiene Alimentar**, v.18, p. 52-59, 2004.

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

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 and Microbiology**, v.102, p. 619-629, 2007.
- CARMICHAEL, W.W. Health effect of toxin-producing cyanobacteria: The Cyano HAB. **Human Ecological Risk Assessment**, v.7, p.1393-1407, 2001.
- CARRARO, E.; FEA, E.; SALVA, S.; GILLI, G. Impact of wastewater treatment plant on *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts occurring in surface water. **Water Science and Technology**, v.47, p.31-37, 2000.
- CARRENO, R.A.; POKORNY, N.J.; WEIR, S.C.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Decrease in *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity in vitro by using the membrane filter dissolution method for recovering oocysts from water samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.3309–3313, 2001.
- CARVALHO, J.C.B.; MATIAS, L.F.; CAPORUSSO, D. Monitoramento da qualidade ambiental no reservatório de Salto Grande, Americana-SP. Disponível em: [www.geo.ufv.br/simposio/simposio/trabalhos/trabalhos.../eixo1/041.pdf](http://www.geo.ufv.br/simposio/simposio/trabalhos/trabalhos.../eixo1/041.pdf). Acesso no dia 22/12/2009.
- CARVALHO, N.O. Assoreamento de reservatórios – conseqüências e mitigação dos efeitos. In: CD-ROM do IV Encontro Nacional de engenharia de Sedimentos, 1-22p. Santa Maria-RS, 2000.
- CASTRO-HERMIDA, J.A.; GARCÍA-PRESEDO, I.; ALMEIDA, A.; GONZÁLEZ-WARLETA, M.; CORREIA DA COSTA, J. M.; 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.
- CBH- PCJ. Plano de Bacias Hidrográficas 2008-2011 dos Rios Piracicaba, Capivari e Jundiá. Sumário Executivo. Comitê das Bacias Hidrográficas dos Rios Piracicaba, Capivari e Jundiá, 2008. Disponível em: <http://www.comitepcj.sp.gov.br/comitespcj.htm>. Acesso no dia 21/10/2009.
- CETESB. Fitoplâncton de Água Doce. Métodos Qualitativo e Quantitativo. Norma Técnica CETESB L5.303. São Paulo: CETESB, 2005. 23p.
- CETESB. Relatório de qualidade das águas interiores do estado de São Paulo 2007 / 528 p. CETESB, 2008. Disponível em: [http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/relatorios/rios/rel\\_aguas\\_int\\_2007/relatorio\\_2007.zip](http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/relatorios/rios/rel_aguas_int_2007/relatorio_2007.zip). Acesso no dia 21/08/2009.
- CETESB. Relatório de qualidade das águas interiores do estado de São Paulo 2008 / 528 p. CETESB, 2009. Disponível em: [http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/relatorios/rios/rel\\_aguas\\_int\\_2008/relatorio\\_2008.zip](http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/relatorios/rios/rel_aguas_int_2008/relatorio_2008.zip). Acesso no dia 21/08/2009.
- CHAI, J.Y.; GUK, S.M.; HAN, H.K.; YUN, C.K. Role of intra-epithelial lymphocytes in mucosal immune responses of mice experimentally infected with *C. parvum*. **Journal of Parasitology**, v.85, p.234– 239, 1999.
- CHALAR, G. Eutrophication dynamics on different temporary scales: Salto Grande Reservoir (Argentina–Uruguay). In: Tundisi, J.G., Matsumura-Tundisi, T., Sidagis, C. (Eds.), Eutrophication in South America: auses, Consequences and Technologies for Management and Control. International Institute of Ecology, Inc., São Carlos, SP, 2006.
- CHALMERS, R.M.; DAVIES, A.P. Minireview: Clinical cryptosporidiosis. **Experimental Parasitology** (2009) doi:10.1016/j.exppara.2009.02.003.

CHAURET, C.; ARMSTRONG, N.; FISHER, J.; SHARMA, R.; SPRINGTHORPE, S.; SATTAR, S. Correlating *Cryptosporidium* and *Giardia* with microbial indicators. **Journal of the American Water Works Association**, v.87, p.76-84, 1995.

CHAVES-MUNGUÍA, B.; CEDILLO-RIVERA, R.; MARTINEZ-PALOMO, A. The ultrastructure of the cyst wall of *Giardia lamblia*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.51, p. 220-226, 2004.

CHEN, A.X.; KEITHLY, J.S.; PAYA, S.V.; LARUSSO, N.F. Cryptosporidiosis. **The New England Journal of Medicine**, v.346, p. 1723-1731, 2002.

CHIN, A.C.; TEOH, D.A.; SCOTT, K.G.-E.; MEDDINGS, J.B.; MACNAUGHTON, W.K.; BURET, A.G. Strain-dependent induction of enterocyte apoptosis by *Giardia lamblia* disrupts epithelial barrier function in a caspase-3- dependent manner. **Infection and Immunity**, v.70, p.3673–3680, 2002.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. Toxic Cyanobacteria in Water. A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management. 1. ed. London: E&FN Spon, 416 p, 1999.

CIZEK, A.R.; CHARACKLIS, G.W.; KROMETIS, L.-A.; HAYES, J.A.; SIMMONS, O.D.; LONARDO, S.; ALDERISIO, K.A.; SOBSEY, M.D. Comparing the partitioning behavior of *Giardia* and *Cryptosporidium* with that of indicator organisms in stormwater runoff. **Water Research**, v.42, p.4421–4438, 2008.

CLANCY, J.L. Sydney's 1998 Water quality crisis. **Journal of the American Water Works Association**, v.92, p. 55-66, 2000.

CLANCY, J.L.; CONNELL, K.; McCUIN, R.M. Implementing PBMS improvements to USEPA'S *Cryptosporidium* and *Giardia* methods. **Journal of the American Water Works Association**, v.95, p.80-90, 2003.

COELHO, M.P. Análise do processo de assoreamento do reservatório de Americana, SP. **Dissertação de Mestrado**, Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 1993.

CONNELL, K.; RODGERS, C.C.; SHANK-GIVENS, H.L.; SCHELLER, J.; POPE, M.L.; MILLER, K. Building a better protozoa data set. **Journal of the American Water Works Association**, v.92, p.30–43, 2000.

CONSIDINE, R.F.; DIXON, D.R.; DRUMMOND, C.J. Oocysts of *Cryptosporidium parvum* and model sand surfaces in aqueous solutions: an atomic force microscope (AFM) study. **Water Research**, v.36, p.3421–3428, 2002.

COOK, N.; PATON, C.A.; WILKINSON, N.; NICHOLS, R.A.B.; BARKER, K.; SMITH, H.V. Towards standard methods for the detection of *Cryptosporidium parvum* on lettuce and raspberries. Part 1: Development and optimization of methods. **International Journal of Food Microbiology**, v.109, p. 215-221, 2006.

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 Science and Research**, v.35, p.1387–1398, 2001.

CRAUN, G.F.; BERGER, P.S.; CALDERON, R.L. Coliform Bacteria and Waterborne Disease Outbreaks. **Journal of the American Water Works Association**, v.89, p.96-104, 1997.

CURTIS, T.P.M.; MARA, D.D.; SILVA, S. A. The effect of sunlight on faecal coliforms in ponds: implication for research and design. **Water Science and Technology**, v. 26, p. 1729-1738, 1992.

- DAI, X.; BOLL, J. Settling velocity of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia*. **Water Research**, v.40 p.1321 – 1325, 2006.
- DAI, X.; BOLL, J.; HAYES, M.E.; ASTON, D.E. Adhesion of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* to solid surfaces: the role of surface charge and hydrophobicity. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, v.34, p. 259-263, 2004.
- DAI, X.; BOLL, J. Evaluation of attachment of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* to soil particles. **Journal of Environmental Quality**, v.32, p. 296-304, 2003.
- DALLE, F.; ROZ, P.; DAUTIN, G.; DI-PALMA, M.; KOHLI, E.; SIRE-BIDAULT, C.; FLEISCHMANN, M.G.; GALLAY, A.; CARBONEL, S.; BON, F.; TILLIER, C.; BEAUDEAU, P.; BONNIN, A. Molecular characterization of isolates of waterborne *Cryptosporidium* spp. collected during an outbreak of gastroenteritis in South Burgundy, France. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p. 2690–2693, 2003.
- DANIEL, L.A.; BRANDÃO, C.C.S; GUIMARÃES, J.R.; LIBÂNIO, M. Rede Cooperativa de Pesquisas. Métodos Alternativos de Desinfecção da Água. Processos de desinfecção e desinfetantes alternativos na produção de água potável. São Carlos: Ed. RiMa/ABES, 139p, 2001.
- DAVIES, C.M.; LONG, J.A.H.; DONALD, M.; ASHBOLT, N.J. Survival of faecal microorganisms in marine and freshwater sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.1888– 96, 1995.
- DEBERDT, G.L.B. Produção primária e caracterização da comunidade fitoplanctônica no Reservatório de Salto Grande (Americana-SP) em duas épocas do ano. Dissertação de Mestrado, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1997.
- DEEN, A.; CRAIG, R.; ANTENUCCI, J.P. The Sydney Water contamination incident of 1998—monitoring and modelling. In: Hydro 2000, 3rd International Hydrology and Water Resources Symposium, November 20–23, Perth, Australia, vol 1. IEAUST, Australia: Institution of Engineers Australia, p. 103– 109, 2000.
- DE MOURA, L.; BAHIA-OLIVEIRA, L.M.G.; WADA, M.Y.; JONES, J.L.; TUBOI, S.H.; CARMO, E.H.; RAMALHO, W.M.; CAMARGO, N.J.; TREVISAN, R.; GRAÇA, R.M.; DA SILVA, A.J.; MOURA, I.; DUBEY, J.P.; GARRET, D.O. Waterborne Toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, p.326-329, 2006.
- DIAS, G.M.F.; BEVILACQUA, P.D.; BASTOS, R.K.X.; OLIVEIRA, A.A.; CAMPOS, G.M.M. *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em água de manancial superficial de abastecimento contaminada por dejetos humano e animal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.60, p.1291-1300, 2008.
- DIAS JÚNIOR, O. Occurrence of *Giardia* spp. cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts in surface waters and sewage from Araras city, São Paulo, Brazil. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Prebisteriana Mackenzie, São Paulo, 1999.
- DIGIORGIO, C.L.; GONZALEZ, D.A; HUITT, C.C. *Cryptosporidium* and *Giardia* recoveries in natural waters by using environmental protection agency Method 1623. **Applied and Environmental Microbiology**, v.12, p. 5952-5955, 2002.
- DINIZ, C.R.; CEBALLOS, B.S.O.; BARBOSA, J.E.L.; KONIG, A. Uso de macrófitas aquáticas como solução ecológica para melhoria da qualidade de água. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.9, (Suplemento), p.226-230, 2005.
- DORNFELD, C.B; LEITE, M.A.; ESPÍNDOLA, E.L.G. Caracterização física e química do sedimento do reservatório de Salto Grande, Americana-SP. In: ESPÍNDOLA, E.L.G.; LEITE, M.A.; DORNFELD, C.B. **Reservatório de Salto Grande (Americana-SP): Caracterização, Impactos e Propostas de Manejo**. 1 ed. São Carlos, Rima: 2004. cap 6, p.91-105.

ECKMANN, L: Mucosal defences against *Giardia*. **Parasite Immunology**, v.25, p.259–270, 2003.

EGYED, Z., SRÉTER, T., SZÉLL, Z., VARGA, I. Characterization of *Cryptosporidium* spp.—recent developments and future needs. **Veterinary Parasitology**, v. 111, p.103-114, 2003.

ESPÍNDOLA, E.L.G.; LEITE, M.A.; DORNFELD, C.B. Reservatório de Salto Grande: Uma caracterização Geral do Sistema. In: ESPÍNDOLA, E.L.G.; LEITE, M.A.; DORNFELD, C.B. **Reservatório de Salto Grande (Americana, SP): Caracterização, Impactos e Propostas de Manejo**. 1 ed. São Carlos: Rima, 2004a. cap.1, p.1-17.

ESPÍNDOLA, E.V.; ROCHA, O.; RIETZLER, A.C. Caracterização Limnológica do Reservatório de Salto Grande (Americana, SP); Uma análise espacial e temporal. In: ESPÍNDOLA, E.L.G.; LEITE, M.A.; DORNFELD, C.B. **Reservatório de Salto Grande (Americana, SP): Caracterização, Impactos e Propostas de Manejo**. 1 ed. São Carlos: Rima, 2004b. cap. 3, p.37-54.

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

FGV (Fundação Getúlio Vargas). **Pesquisa Trata Brasil: Saneamento e Saúde**. Centro de Políticas Sociais, Instituto Brasileiro de Economia, Fundação Getúlio Vargas, 100p., novembro, 2007. Disponível em: [http://www3.fgv.br/ibrecps/CPS\\_infra/index\\_teste.htm](http://www3.fgv.br/ibrecps/CPS_infra/index_teste.htm). Acesso no dia 21/08/2009.

FARTHING, M.J. Clinical aspects of human cryptosporidiosis. **Contributions to Microbiology**, v.6, p.50-74. 2000.

FAYER, R.; FARLEY, C.A.; LEWIS, E.J.; TROUT, J.M.; GRACZYK, T.K. Potential role of the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*, in the epidemiology of *Cryptosporidium parvum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.2086–2088, 1997.

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.; TROUT, J.M.; WALSH, E.; COLE, R. Rotifers ingest oocysts of *Cryptosporidium parvum*. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, 47(2):161 –3, 2000.

FAYER, R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. **Veterinary Parasitology**, v.126, p.37–56, 2004.

FAYER, R.; DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. Zoonotic protozoa: from land to sea. **Trends in Parasitology**, v.20, p.531-535, 2004.

FAYER, R. General biology. In: Fayer, R.; Xiao, L. (eds.) *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis, second ed. CRC Press, Boca Raton, FL, pp, 1-42, 2008.

FAYER, R.; SANTÍN, M.; TROUT, J.M. *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). **Veterinary Parasitology**, v.156, p.191-198, 2008.

FAYER, R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. **Experimental Parasitology** (2009), doi:10.1016/j.exppara.2009.03.005.

FAYER, R.; SANTÍN, M.; *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). **Veterinary Parasitology** (2009), doi:10.1016/j.vetpar.2009.05.011.

FENG, Y.Y., ONG, S.L., HU, J.Y., SONG, L.F., TAN, X.L., NG, W.J. Effect of particles on the recovery of *Cryptosporidium* oocysts from source water samples of various turbidities. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.1898–1903, 2003.

FENNER, K.; SCHERINGER, M.; MACLEOD, M.; MATTHIES, M.; MCKONE, T.; STROEBE, M.; BEYER, A.; BONNELL, M.; LE GALL, A.C.; KLASMEIER, J.; MACKAY, D.; VAN DE MEENT, D.; PENNINGTON, D.; SCHARENBERG, B.; NORIYUKI, S.; WANIA, F. Comparing Estimates of Persistence and Long-Range Transport Potential among Multimedia Models. **Environmental Science and Technology**, v.39, p. 1932-1942, 2005.

FERGUSON, C.M.; COOTE, B.G.; ASHBOLT, N.J.; STEVENSON, I.M. Relationships between indicators, pathogens and water quality in an estuarine system. **Water Research**, v.30, p.2045– 2054, 1996.

FERRARI, B.C.; VESEY, G.; DAVIS, K.A.; GAUCI, M.; VEAL, D. A novel two-color flow cytometric assay for the detection of *Cryptosporidium* in environmental water samples. **Cytometry**, v.41, p.216–22, 2000.

FERREIRA, I.L; RIBEIRO, N.F.B. Aves aquáticas do reservatório de Salto Grande e Varjão de Paulínia. In: ESPÍNDOLA, E.L.G.; LEITE, M.A.; DORNFELD, C.B. **Reservatório de Salto Grande (Americana-SP): Caracterização, Impactos e Propostas de Manejo**. 1 ed. São Carlos: Rima, 2004. cap. 15, p.283-294.

FIGUEIREDO, M.C.B.; TEIXEIRA, S.A.; ARAÚJO, L.F.P.; ROSA, F.M.; PAULINO, W.D.; MOTA, S.; ARAÚJO, J.C. Avaliação da vulnerabilidade ambiental de reservatórios à eutrofização. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.12, p.399-409, 2007.

FONSECA, M.F. Geotecnologias aplicadas ao diagnóstico do uso da terra no entorno do Reservatório de Salto Grande, município de Americana (SP), como subsídio ao planejamento territorial. **Dissertação de Mestrado**, Instituto de Geociências, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

FRANCO, R.M.B. Infecções parasitárias em creches: estudo em uma área urbana, com ênfase em *Cryptosporidium parvum* e *Giardia duodenalis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.30, p.423-424, 1997.

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

FRANCO, R.M.B. Protozoários de veiculação hídrica: relevância em saúde pública. **Revista Panamericana de Infectologia**, v.9, p.36-43. 2007.

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

FRICKER, C.R; CRABB, J.H. Waterborne Cryptosporidiosis: Detection Methods and Treatment Options. **Advances in Parasitology**, v.40, p.242-278, 1998.

FUNASA (Fundação Nacional da Saúde). Cianobactérias tóxicas na água para consumo humano na saúde pública e processos de remoção em água para consumo humano. Ministério da Saúde. Brasília, 51p., maio 2003. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/mnl\\_ciano\\_bacterias.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/mnl_ciano_bacterias.pdf). Acesso no dia 19/09/2009.

GAJADHAR, A.A.; ALLEN, J.R. Factors contributing to the public health and economic importance of waterborne zoonotic parasites. **Veterinary Parasitology**, v.126, p.3–14, 2004.

GAMBA, R.C.; CIAPINA, E.M.P.; ESPÍNDOLA, R.S.; PACHECO, A.; PELLIZARI, V.H. Detection of *Cryptosporidium* sp. oocysts in groundwater for human consumption in Itaquaquecetuba city, São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, p.151-153, 2000.

GARCIA, L.S.; SHIMIZU, R.Y. Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, p.1526–1529, 1997.

GASSER, R.B.; O'DONOGHUE, P. Isolation, propagation and characterisation of *Cryptosporidium*. **International Journal for Parasitology**, v..29, p.1379–413, 1999.

GIANGASPERO, A.; CIRILLO, R.; LACASELLA, V.; LONIGRO, A.; MARANGI, M.; CAVALLO, P.; BERRILLI, F.; CAVE, D.D; BRANDONISIO, O. *Giardia* and *Cryptosporidium* in inflowing water and harvested shellfish in Lagoon in Southern Italy. **Parasitology International**, v.58, p.12-17, 2009.

GLYMPH, L.M. Sedimentation of Reservoirs. In: ACKERMANN, W.C et al, ed. Man made lakes: their problems and environmental. Washington DC. American Geophysical Union, p. 342-348, 1973.

GOLDMAN, C.R.; HORNE, A.J. Limnology. New York: McGraw-Hill, 464p., 1983.

GÓMEZ-COUSO, H.; MENDEZ-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.

GONEN, C.; YILMAZ, N.; YALCIN, M.; SIMSEK, I.; GONEN, O. Diagnostic yield of routine duodenal biopsies in iron deficiency anaemia: a study from Western Australia. **European Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v.19, p.37–41, 2007.

GOULART, M.D.; CALLISTO, M. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. **Revista da FAPAM**, ano 2, n. 1, 2003. Disponível em: [www.icb.ufmg.br/big/beds/arquivos/goulartecallisto.pdf](http://www.icb.ufmg.br/big/beds/arquivos/goulartecallisto.pdf). Acesso no dia 22/12/2009.

GOURMELON, M.; CILLARD, J.; POMMEPUY, M. Visible lighth damage in *Escherichia coli* in seawater: oxidative stress hypothesis. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 77, p. 105- 112, 1994.

GRACZYK, T.K.; CRANFIELD, M.R.; FAYER, R. Evaluation of commercial enzyme immunoassay (EIA) and immunofluorescent antibody (FA) test kits for detection of *Cryptosporidium* oocysts of species other than *Cryptosporidium parvum*. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v.54, p.274–279, 1996.

GRACZYK, T.K.; EVANS, B.M.; SHIFF, C.J.; KARREMAN, H.J.; PATZ, J.A. Environmental and geographical factors contributing to watershed contamination with *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Environmental Research**, v.82, p.263-271, 2000.

GRACZYK, T.K.; FRIED, B. Human Waterborne Trematode and Protozoan Infections. **Advances in Parasitology**, v.64, p. 111-160, 2007.

GRACZYK, T.K.; MAJEWSKA, A.C.; SCHWAB, K.J. The role of birds in dissemination of human waterborne enteropathogens. **Trends in Parasitology**, v.24, p.55-59, 2008.

GRIMASON, A.M.; SMITH, H.V.; PARKER, J.F.W.; BUKHARI, Z.; CAMPBELL, A.T.; ROBERTSON, L.J. Application of DAPI and immunofluorescence for enhanced identification of *Cryptosporidium* spp oocysts in water samples. **Water Research**, v.28, p.733-736, 1994.

GUK, S.M.; YONG, T.S.; CHAI, J.Y. Role of murine intestinal intraepithelial lymphocytes and lamina propria lymphocytes against primary and challenge infections with *C. parvum*. **Journal of Parasitology**, v. 89, p.270–275, 2003.

GUYONNET, J.P.; CLAUDET, J. Epidémie de gastro-entérite aiguë à *Cryptosporidium* liée à la pollution des eaux d'alimentation de la ville de Sète (Outbreak of acute cryptosporidium gastroenteritis related to tap water pollution in Sète town). **Technique Science Méthodes, génie urbain génie rural**, v.97, p. 23–29, 2002.

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

HARRIS, J.R.; ADRIAN, M.; PETRY, F. Amylopectin: A major component of the residual body in *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Parasitology**, v.128, p.269-282, 2004.

HEITMAN, T.L.; FREDERICK, L.M.; VISTE, J.R.; GUSELLE, N.J.; COOKE, S.E.; ROY, L., MORGAN, U.M.; THOMPSON, R.C.A.; OLSON, M.E. Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* and characterisation of *Cryptosporidium* spp. isolated from wildlife, human and agricultural sources of the North Saskatchewan River basin in Alberta, Canada. **Canadian Journal of Microbiology**, v.48, p.530–541, 2002.

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** 2004, v.13, p.79 – 92, 2004.

HIJNEN, W.A.M.; BEERENDONK, E.F.; MEDEMA, G.J. Inactivation credit of UV radiation (oo)cysts in water: a review. **Water Research**, v. 40, p. 3-22, 2006

HOMMER, V.; EICHHOLZ, J.; PETRY, F. Effect of antiretroviral protease inhibitors alone, and in combination with paromomycin, on the excystation, invasion and in vitro development of *Cryptosporidium parvum*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.52, p.359–364. 2003.

HOQUE, M.E.; HOPE, V.T.; KJELLSTROM, T.; SCRAGG, R.; LAY-YEE, R. Risk of giardiasis in Aucklanders: a case control study. **International Journal of Infectious Diseases**, v.6, p.191-197, 2002.

HÖRMAN, A.; RIMHANEN-FINNE, R.; MAUNULA, L.; VON BONSDORFF, C.H.; TORVELA, N.; HEIKINHEIMO, A.; HÄNNINEN, L. *Campylobacter* spp., *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., noroviruses, and indicator organisms in surface water in southwestern Finland. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.97–105, 2004.

HSU, B.M.; HUANG, C.; HSU, C.L.; HSU, Y.F.; YEH, J.H. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in the Kau-Ping River and its watershed in Southern Taiwan. **Water Research**, v.33, p. 2701-2707, 1999.

HSU B.M.; HUANG, C. Performances of the immunomagnetic separation method for *Cryptosporidium* in water under various operation conditions. **Biotechnology Progress**, v.17, p.1114-1118, 2001.

HSU, B.M.; HUANG, C. Influence of ionic strength and pH on hydrophobicity and zeta potencial of *Giardia* and *Cryptosporidium*. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.201, p.201-206, 2002.

HU, J.Y.; FENG, Y.Y.; ONG, S.L.; NG, J.; SONG, L.F.; TAN, X.L.; CHU, X.N. Improvement of recoveries for the determination of protozoa *Cryptosporidium* and *Giardia* in water using method 1623. **Journal of Microbiological Methods**, v.58, p. 321–325, 2004.

HUSSAIN, S.H. Wastewater disinfection - Chlorination/dechlorination optimization versus UV technology. Proceedings of the Annual ISA Analysis Division Symposium Volume 1, Pages 24-39, 2007.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). Pesquisa Nacional de Saneamento Básico, 2000. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/27032002pnsb.shtm>. Acesso no dia 16/03/2009.

ISAAC-RENTON, J.; MOOREHEAD, W.; ROSS, A. Longitudinal studies of *Giardia* in two community drinking water supplies: cyst levels, parasite viability and health impact. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.47-54, 1996.

JAKUBOWSKI, W.; CRAUN, G.F. Update on the control of *Giardia* in water supplies. In: Olson, B.E., Olson, M.E., Wallis, P.M. (Eds.), *Giardia: The Cosmopolitan Parasite*. CAB International, Wallingford, UK, p. 217-238, 2002.

JAKUBOWSKI, W.; BOUTROS, S.; FABER, W.; FAVER, R.; GHIORSE, W.; LECHEVALLIER, M.; ROSE, J.; SCHAUB, S.; STEWART, M. Environmental methods for *Cryptosporidium*. **Journal of the American Water Works Association**, v.88, p.107-121, 1996.

JAMIESON, R.C.; JOY, D.M.; LEE, H.; KOSTASCHUK, R.; GORDON, R.J. Resuspension of sediment-associated *Escherichia coli* in a natural stream. **Journal of Environmental Quality**, v. 34, p.581- 589, 2005.

JENKINS, M.B.; BOWMAN, D.D.; GHIORSE, W.C. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts by ammonia. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.784-788, 1998.

JEX, A.R.; SMITH, H.V.; MONIS, P.T.; CAMPBELL, B.E.; GASSER, R.B. *Cryptosporidium* - Biotechnology Advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. **Biotechnology Advances**, v. 26 p.304-317, 2008.

JOBLING, S.; NOLAN, M.; TYLER, C.R.; BRIGHTY, G.; SUMPTER, J.P. Widespread Sexual Disruption in Wild Fish. **Environmental Science and Technology**, v.32, p.2498-2506, 1998.

JOCHIMSEN, E.M.; CARMICHAEL, W.W.; AN, J.S.; CARDO, D.M.; COOKSON, S.T.; HOLMES, C.E.M.; ANTUNES, M.B.C.; MELO, D.A.; FILHO, T.M.; LYRA, V.S.T.; AZEVEDO, S.M.F.O.; JARWIS, W.R. Liver failure and death following exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. **The New England Journal of Medicine**, v.338, p.873-878, 1998.

JOHNSTON, S.P.; BALLARD, M.M.; BEACH, M.J.; CAUSER, L.; WILKINS, P.P. Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.623-626, 2003.

KFIR, R.; HILNER, C.; DU PREEZ, M.; BATEMAN, B. Studies on the prevalence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in South African water. **Water Science and Technology**, v.31, p.435-438, 1995.

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.

KEELEY, A.; FAULKNER, B.R. Influence of land use and watershed characteristics on protozoa contamination in a potential drinking water resources reservoir. **Water Research**, v. 42, p.2803-2813, 2008.

KIM, S.-H.; KIM, H.-W.; LEE, H.-Y.; KAHNG, H.-Y. Seasonal dynamics of pathogenic microorganisms (*Cryptosporidium*, *Giardia* and Fecal Bacteria) in a artificial lake ecosystem (Sangsa Lake, Korea). **Journal of Ecology and Field Biology**, v.31, p.161-165, 2008.

KIM, K.J.; JUNG, H-H; LEE, K. Evaluation of cyst loss in standard procedural steps for detecting of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in water. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v.11, p. 368-371, 2006.

KING, B.J; MONIS, P.T. Critical processes affecting *Cryptosporidium* oocyst survival in the environment. **Parasitology**, v.134, p. 309-323, 2007.

KIRSCHNER, A.K.T.; ZECHMEISTER, T.C; KAVKA, G.G; BEIWL, C.; HERZIG, A; MACH, R.L; FARNLEITNER, A.H. Integral strategy for evaluation of fecal coliform indicator performance in bird-influenced saline inland waters. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, 7396–7403, 2004.

KISTEMANN, T.; CLASSEN, T.; KOCH, C.; DANGENDORF, F.; FISCHEDER, R.; GEBEL, J.; VACATA, V.; EXNER, M. Microbial load of drinking water reservoir tributaries during extreme rainfall runoff. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p. 2188–2197, 2002.

KIVAISI, A.K. The potential for constructed wetlands for wastewater treatment and reuse in developing countries: a review. **Ecological Engineering**, v.16, p.545–560, 2001.

KRAMER, M. H; HERWALDT, B. L. CALDERON, R. L., JURANEK, D. D. Waterborne disease outbreaks, United States, 1993-1994. In: CDC Surveillance Sumaries. **MMWR**, v. 45, p. 1-33, apr 1996. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00040818.htm>. Acesso em 03/05/2009.

KUHN, R.C.; ROCK, C.M.; OSHIMA, K.H. Effects of pH and magnetic material on immunomagnetic separation of *Cryptosporidium* oocysts from concentrated water samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.2066 – 2070, 2002.

LEAL, D. A. G.; YAMASHIRO, S.; DEMÉTRIO, I.; DUARTE, V. F.; VACCARI, L. F.; DURIGAN, M.; ÁVILA, L. S. L.; BRANCO, N.; GREINERT-GOULART, J. A.; FRANCO, R. M. B. Protozooses intestinais em crianças que frequentam uma creche: investigação de amostras clínicas e ambientais para a compreensão da epidemiologia de *Cryptosporidium* e *Giardia*. In: **XXI Congresso Brasileiro de Parasitologia e II Encontro de Parasitologia do Mercosul, 2009, Foz do Iguaçu. XXI Congresso Brasileiro de Parasitologia e II Encontro de Parasitologia do Mercosul, 2009. v. 38.**

LECHEVALLIER, M.W.; NORTON, W.D. Examining relationships between particle counts and *Giardia*, *Cryptosporidium*, and turbidity. **Journal of the American Water Works Association** v. 84, p.54–60, 1992.

LECHEVALLIER, M.W.; NORTON, W.D.; ATHERHOLT, T.B. Protozoa in open reservoirs. **Journal of the American Water Works Association**, v.89, p.84-96, 1997.

LECLERC, H.; SCHWARTZBROD, L.; DEI-CAS, E. Microbial agents associated with waterborne diseases. **Critical Reviews in Microbiology**, v.28, p.371–409, 2002.

LEEMING, R.; NICHOLS, P.D.; ASHBOLT, N.J. Distinguishing sources of faecal pollution in Australian inland and coastal waters using sterol biomarkers and microbial faecal indicators. Research Report, vol 204. Melbourne: Water Services Association of Australia, 1998, 46 p.

LEITE, M. A. Variação espacial e temporal da taxa de sedimentação no Reservatório de Salto Grande (Americana-SP) e sua influência sobre as características limnológicas do sistema. 1998.170p. Dissertação de Mestrado, Escola de Engenharia de São Carlos, São Carlos, 1998;

LEITE, M.A.; ESPÍNDOLA, E.L.G.; DORNFELD, C.B.; TONISSI, F.B. Quantificação de Metais na Água do Reservatório de Salto Grande (Americana-SP). In: ESPÍNDOLA, E.L.G.; LEITE, M.A.; DORNFELD, C.B. **Reservatório de Salto Grande (Americana-SP): Caracterização, Impactos e Propostas de Manejo**. 1 ed. São Carlos: Rima, 2004. cap. 4, p.55-70.

LEMCKERT, C.J.; IMBERGER, J. Turbulent benthic boundary layer mixing events in fresh water lakes. In: Imberger J, editor. Physical processes in lakes and oceans. AGU Coastal and Estuarine Studies, Washington DC, USA, vol 54. 1998. p. 503–516.

LEVINE, N.D.; CORLISS, J.O.; COX, F.E.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; HONIGBERG, B.M.; LEEDALE, G.F.; LOEBLICH, A.R 3RD, LOM, J.; LYNN, D.; MERINFELD, E.G.; PAGE, F.C.; POLJANSKY, G.; SPRAGUE, V.; VAVRA, J.; WALLACE, F.G. A newly revised classification of the protozoa. **Journal of Protozoology**, v.27, p.37-58, 1980.

LEVINE, N.D. The protozoan phylum apicomplexa: Vol. II. Boca Raton, FL: CRC Press, 1988.

LEVINE, W.C.; STEPHENSON, W.T.; CRAUN, G.F. Waterborne disease outbreaks, 1986-1988. In: CDC Surveillance Summaries, MMWR, v.39, p.1-9, 1990. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00001596.htm>. Acesso no dia 26/03/09.

LI, Y.; SMITH, D.W.; BELOSEVIC, M. Morphological changes of *Giardia lamblia* cysts after treatment with ozone and chlorine. *Journal of Environmental Engineering and Science*, v.3, p.495–506, 2004.

LIM, Y.A.L., RAMASAME, S.D., MAHDY, M.A.K., SULAIMAN, W.Y.W., SMITH, H.V. Detection and molecular characterization of *Giardia* isolated from recreational lake water in Malaysia. *Parasitology Research*, 2009. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/f1131437526v5130/>. Acesso no dia 22/12/2009.

LINDEN, K.G.; SHIN, G.; SOBSEY, M.D. Comparative effectiveness of UV wavelengths for the inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water. **Water Science and Technology**, v.43, p.171–174, 2001.

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.

LINDSAY, D.S., BLAGBURN, B.L. Cryptosporidiosis in birds. In: Dubey, J.P., Speer, C.A. Fayer, R., (Ed.). *Cryptosporidiosis in man and animals*. CRC Press, Inc., Boca Raton, pp. 133-148, 1990.

LIPP, E.K., KURZ, R., VINCENT, R., RODRIGUEZ-PALACIOS, C., FARRAH, S.R., ROSE, J.B. The effects of seasonal variability and weather on microbial fecal pollution and enteric pathogens in a subtropical estuary. **Estuaries**, v.24, p.266–276, 2001.

LOPES, A.A.; YUBA, A.N.; SANTOS, C.; OLIVEIRA, M.C.; MINILLO, A.; BARBOSA, D.S. A Influência do Desenvolvimento Econômico-Industrial na Degradação da Qualidade da Água do Reservatório de Salto Grande. In: ESPÍNDOLA, E.L.G.; LEITE, M.A.; DORNFELD, C.B. **Reservatório de Salto Grande (Americana-SP): Caracterização, Impactos e Propostas de Manejo**. 1 ed. São Carlos. Rima, 2004. cap.2, p.19-36.

LOPES-FERREIRA, C. Estudo de uma área alagada do rio Atibaia visando a elaboração de proposta de manejo para melhoria da água no Reservatório de Salto Grande (Americana, SP). **Tese de Doutorado**, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.

LOPES, A.M.M.B. Avaliação da ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. e sua associação com indicadores microbiológicos e turbidez na represa de Vargem das Flores-MG.

**Dissertação de mestrado**, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Engenharia Hidráulica e Recursos Hídricos, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

MACDONALD, R. W.; BARRIE, L. A.; BIDLEMAN, T. F.; DIAMOND, M. L.; GREGOR, D. J.; SEMKIN, R. G.; STRACHAN, W. M. J.; LI, Y. F.; WANIA F.; ALAEE M.; ALEXEEVA L. B.; BACKUS S. M.; BAILEY R.; BEWERS J. M.; GOBEIL C.; HALSALL C. J.; HARNER T.; HOFF J. T.; JANTUNEN L. M. M.; LOCKHART W. L. Contaminants in the Canadian Arctic: 5 years of progress in understanding sources, occurrence and pathways. **The Science of the Total Environment**, v.254, p.93-234, 2000.

MACKENZIE, W.R.; HOXIE, N.J.; PROCTER, M.E.; GRADUS, M.S.; BLAIR, K.A.; PETERSON, D.E.; KAZMIERCAZK, J.J.; ADIS, D.G.; FOX, K.R.; ROSE, J.B.; DAVES, J.P. A massive outbreak in Milwaukee of *The* infection transmitted through the public water supply. **The New England Journal of Medicine**, v.331, p.161-167, 1994.

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

MCCUIN, R.M.; CLANCY, J.L. Modifications to United States Environmental Protection Agency Methods 1622 and 1623 for detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.267-274, 2003.

MCCUIN, R.M.; BUKHARI, Z.; SOBRINHO, J.; CLANCY, J.L. Recovery of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from source water concentrates using immunomagnetic separation. **Journal of Microbiological Methods**, v.45, p.69-76, 2001.

MCELROY, W.; CABELLO, E.; PILLAI, S.D. Efficacy of an immunomagnetic separation system for recovering *Cryptosporidium* oocysts from soils. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**, v.9, p.63-70, 2001.

MARTINS, D.; COSTA, N.V.; TERRA, M.A.; MARCHI, S.R.; VELINI, E.D. Caracterização química das plantas aquáticas coletadas no Reservatório de Salto Grande (Americana-SP). **Planta Daninha**, v.21, p.21-25, 2003.

MASCARINI, L.M.; DONALÍSIO, M.R. Giardíase e criptosporidiose em crianças institucionalizadas em creches no Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, n.6, p. 577-579, 2006.

MATOS, S.M.A.; ASSIS, A.M.O.; PRADO, M.S.; STRINA, A.; SANTOS, L.A.; JESUS, S.R.; BARRETO, M.L. *Giardia duodenalis* infection and anthropometric status in preschoolers in Salvador, Bahia State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.24, p.1527-1535, 2008.

MEAD, J.R. Cryptosporidiosis and the challenges of chemotherapy. **Drug Resistance Updates**, v.5, p.47-57, 2002.

MEDEMA, G.J.; BAHAR, M.; SCHETS, F.M. Survival of *Cryptosporidium parvum*, *Escherichia coli*, faecal enterococci and *Clostridium perfringens* in river water: influence of temperature and autochthonous microorganisms. **Water Science and Technology**, v. 35, p.249-252, 1997.

MEDEMA, G.J.; SCHETS, F.M.; TEUNIS, P.F.M.; HAVELAAR, A.H. Sedimentation of free and attached *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cycts in water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p.4460-4466, 1998.

MEISEL, J.L.; PERERA, D.R.; MELLIGRO, C.; RUBIN, C.E. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. **Gastroenterology**, v.70, p.1156-1160, 1976.

MENEZES, A.L.; LIMA, V.M.P.; FREITAS, M.T.S.; ROCHA, M.O.; SILVA, E.F.; DOLABELLA, S.S. Prevalence of intestinal parasites in children from public daycare centers in the city of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.50, p.57-59, 2008.

MIDDLEJ, V.; BENCHIMOL, M. *Giardia lamblia* behavior during encystment: How morphological changes in shape occur. **Parasitology International**, v.58, p.72–80, 2009.

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.; CACCIÓ, S.M.; THOMPSON, R.C.A. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. **Trends in Parasitology**, v.25, p.93-100, 2009.

MONS, C.; DUMETRE, A.; GOSELIN, S.; GALLIOT, C.; MOULIN, L. Monitoring of *Cryptosporidium* and *Giardia* river contamination in Paris area. **Water Research**, v.43, p.211-217, 2009.

MONTEMAYOR, M.; VALERO, F.; JOFRE, J.; LUCENA, F. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. oocysts in raw and treated sewage and river water in north-eastern Spain. **Journal of Applied and Microbiology**, v.99, p.1455-1462, 2005.

MORGAN, U.M.; XIAO, L.; FAYER, R.; LAL, A.A. AND THOMPSON, R.C.A. Variation in *Cryptosporidium*: towards a taxonomic revision of the genus. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.428-441, 1999.

MORGAN-RYAN, U.M.; FALL, A.; WARD, L.A.; HIJJAWI, N.; SULAIMAN, I.; FAYER, R.; THOMPSON, R.C.A.; OLSON, M.; LAL, A.; XIAO, L. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.49, p.433-440, 2002.

MORITA, S.; NAMIKOSHI, A.; HIRATA, T.; OGUMA, K.; KATAYAMA, H.; OHGAKI, S.; MOTOYAMA, N.; FUJIWARA, M. Efficacy of UV irradiation in inactivating *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.5387–5393, 2002.

MOURA, J.E.; PENAFORTE, C.; KERTI, R.; DAUFENBACH, L.Z.; CAMARGO, N.J.; TREVISAN, R.; DA SILVA, L.A.; SANTOS, S.F.; ASSAMURA, M.H.; SILVEIRA, N.T.M.; GEROLOMO, M.; CALIXTO, C.E.A.; FLORIANO, N.R.; GARRET, D.O. Surto de doença diarreica aguda por *Cyclospora cayetanensis*, Antonina, Paraná. Boletim Eletrônico Epidemiológico, 2002. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim\\_eletronico\\_03\\_ano02.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_eletronico_03_ano02.pdf). Acesso no dia 13/05/2009.

MUIRHEAD, R.W.; DAVIES-COLLEY, R.J.; DONNISON, A.M.; NAGELS, J.W. Faecal bacteria yields in artificial flood events: quantifying in-stream stores. **Water Research**, v.38, p.1215-1224, 2004.

MULLER, A.P.B. Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp., em águas de abastecimento superficiais e tratadas da região metropolitana de São Paulo. **Dissertação de Mestrado**, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

MUSIAL, C.E.; ARROWOOD, M.J.; STERLING, C.R.; GERBA, C.P. Detection of *Cryptosporidium* in water by using polypropylene cartridge filters. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, 687–692, 1987.

NEUMAYEROVA, H.; KOUDELA, B. Effects of low and high temperatures on infectivity of *Cryptosporidium muris* oocysts suspended in water. **Veterinary Parasitology**, v.153, p.197–202, 2008.

NEWMAN, R.D.; WUHHIB, T.; LIMA, A.A.; GUERRANT, R.L.; SEARS, C.L. Environmental sources of *Cryptosporidium* in urban slum in Northeastern Brazil. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.49, p.270-275, 1993.

- NICHOLS, G.; CHALMERS, R.; LAKE, I.; SOPWITH, W.; REGAN, M.; HUNTER, P.; GRENFELL, P.; HARRISON, F.; LANE, C. Cryptosporidiosis: A report on the surveillance and epidemiology of *Cryptosporidium* infection in England and Wales. Drinking Water Directorate Contract Number DWI 70/2/201, 2006. Disponível em: [http://www.dwi.gov.uk/research/reports/DWI70\\_2\\_201.pdf](http://www.dwi.gov.uk/research/reports/DWI70_2_201.pdf). Acesso no dia 23/09/2009.
- NIEMINSKI, E.C.; Schaefer, F.W.; ONGERTH, J.E. Comparison of two methods for detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.1714-1719, 1995.
- NIME, F.A.; BUREK, J.D.; PAGE, D.L.; HOLSCHER, M.A.; YARDLEY, J.H. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. **Gastroenterology**, v.70, p.592-598, 1976.
- NISHI, L.; BAESSO, M.L.; SANTANA, R.G.; FREGADOLLI, P.; FALAVIGNA, D.L.M.; FALAVIGNA-GUILHERME, A.L. Investigation of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in a public water-treatment system. **Zoonoses and Public Health**, v.56, p.221-228, 2009.
- O'DONOGHUE, P.J. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis in man and animals. **International Journal for Parasitology**, v.85, p.525-530, 1995.
- OHE, T.; WATANABE, T.; WAKABAYASHI, K. Mutagens in surface waters: a review. **Mutation Research**, v.567, p.109-149, 2004.
- OKHUYSEN, P.C.; CHAPPELL, C.L.; KETTNER, C.; STERLING, C.R. *Cryptosporidium parvum* metalloaminopeptidase inhibitors prevent in vitro excystation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.40, p.2781-2784, 1996.
- OKHUYSEN, P.C.; CHAPPELL, C.L.; CRABB, J.H.; STERLING, C.R.; DUPONT, H.L. Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. **The Journal of Infectious Diseases**, v.180, p.1275-1281, 1999.
- OLIVEIRA, P.V., Ocorrência de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. no Rio Atibaia, bacia do Rio Piracicaba, Campinas, SP. **Dissertação de Mestrado**, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.
- OLIVER, R.L.; GANF, G.G. Freshwater blooms. In: WHITTON, B. A.; POTTS, M. **The ecology of cyanobacteria**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p.149-194, 2000.
- OLSON, M.E.; GOH, J.; PHILLIPS, M.; GUSELLE, N. *Giardia* cyst and *Cryptosporidium parvum* oocyst survival in water, soil and cattle feces. **Journal Environmental Quality**, v.28, p.1991-1996, 1999.
- OLSON, M.E.; O'HANDLEY, R.M.; RALSTON, B. J.; MCALLISTER, T.A.; THOMPSON, R.C.A. Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. **Trends in Parasitology**, v.20, p.185-191, 2004.
- ONGERTH, J.E.; STIBBS, H.H. Identification of *Cryptosporidium* oocysts in river water. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, p.672-676, 1987.
- ONGERTH, J. E.; PECORARO, J.P.P. Electrophoretic mobility of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts. **Journal of Environmental Engineering**, v.122, p.228-231, 1996.
- ONO, K.; TSUJI, H.; KUMAR, S.; YAMAMOTO, A.; MASUDA, K.; ENDO, T.; HOTTA, H.; KAWAMURA, T.; UGA, S. Contamination of river water by *Cryptosporidium parvum* oocysts in Western Japan. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.3832-3836, 2001.

- ORTEGA, Y.R.; ADAM, R.D. *Giardia*: overview and update. **Clinical Infectious Diseases**, v.25, p.545-549, 1997.
- ORTIZ, J.J.; AYOUB, A.; GARGALA, G.; CHEGNE, N.L.; FAVENNEC, L. Randomized clinical study of nitazoxanide compared to metronidazole in the treatment of symptomatic *Giardiasis* in children from northern Peru. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v.15, p.1409–1415, 2001.
- PALM, D.; WEILAND, M.; MCARTHUR, A.G.; WINIECKA-KRUSNELL, J.; CIPRIANO, M. J.; BIRKELAND, S.R.; PACOCHA, S.E.; DAVIDS, B.; GILLIN, F.; LINDER, E. Developmental changes in the adhesive disk during *Giardia* differentiation. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v.141, p.199–207, 2005.
- PATON, C.A.; KELSEY, D.E.; REEVE, E.A.; PUNTER, K.; CRABB, J.H.; SMITH, H.V. Immunomagnetically separable for the recovery of *Cryptosporidium* sp. oocysts. In: Clark SA, Thompson KG, Keevil CW, Smith MS, editors. Rapid detection assays for food and water. **The Royal Society of Chemistry**, p. 38–43, 2001.
- PAYMENT, P.; FRANCO, E. *Clostridium perfringens* and somatic coliphages as indicators of the efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts. **Applied and Environmental Microbiology** v.59, p.2418–24, 1993.
- PEGORARO, J.L. Atividade educativas ao ar livre: um quadro a partir de escolas públicas da região de Campinas e dos usos de área úmida urbana com avifauna conspícua (Mini-Pantanal de Paulínia, SP). **Tese de Doutorado**, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.
- PEGORARO, J.L. Avifauna do Reservatório de Salto Grande: Levantamento de espécies a partir de sua porção superior, o MiniPantanal. In: ESPÍNDOLA, E.L.G.; LEITE, M.A.; DORNFELD, C.B. **Reservatório de Salto Grande (Americana-SP): Caracterização, Impactos e Propostas de Manejo**. 1 ed. São Carlos: Rima, 2004. cap. 16, p.295-314.
- PEREIRA, M.G.C.; ATNILL, E.R.; BARBOSA, A.P.; SILVA, A.S.; GARCIA-ZAPATA, M.T.A. Intra-familial and extra-familial risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection among children hospitalized for diarrhea in Goiânia, Goiás, Brazil. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v.66, p.787-793, 2002.
- PENG, M.M.; XIAO, L.; FREEMAN, A.R.; ARROWOOD, M.J.; ESCALANTE, A.A.; WELTMAN, A.C.; ONG, C.S.L.; MACKENZIE, W.R.; LAL, A.A.; BEARD, B.B. Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: evidence of two distinct human transmission cycles. **Emerging Infectious Diseases**, v.30, p.567-573, 1997.
- PETRY, F. Structural Analysis of *Cryptosporidium parvum*. **Microscopy and Microanalysis**, v.10, p.586–601, 2004.
- PLUTZER, J.; KARANIS, P. Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: An update. **Veterinary Parasitology** (2009), doi:10.1016/j.vetpar.2009.07.003.
- QUÍLEZ, J.; SÁNCHEZ-ACEDO, C.; CLAVEL, A.; DEL CACHO, E.; LÓPEZ-BERNAD, F. Comparison of an acidfast stain and a monoclonal antibody-based immunofluorescence reagent for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in faecal specimens from cattle and pigs. **Veterinary Parasitology**, v.67, p.75-81, 1996.
- QUINTERO-BETANCOURT W, PEELE E.R, ROSE J.B. *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayentanensis*: a review of laboratory methods for detection of these waterborne parasites. **Journal of Microbiological Methods**, v.49, p.209-224, 2002.

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, p. 5380-5388, 2003.

RAMIREZ, N.E.; WARD, L.A.; SREEVATSAN, S. A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. **Microbes and Infection**, v.6, p.773-785, 2004.

REDUKER, D.W.; SPEER, C.A.; BLIXT, J.A. Ultrastructure of *Cryptosporidium parvum* oocysts and excysting sporozoites as revealed by high resolution scanning electron microscopy. **Journal of Protozoology**, v.32, p.708-711, 1985.

RICHARDSON, S.D. Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. **Analytical Chemistry**, v.81, 4645-4677, 2009.

RIMHANEN-FINNE, R.; VOURINEN, A.; MARMO, S.; MALMBERG, S.; HANNINEN, M.L. Comparative analysis of *Cryptosporidium* and *Giardia* and indicator bacteria during sewage sludge hygienization in various composting processes. **Letters in Applied Microbiology**, v.38, p.301-305, 2004.

RIOS, L. Distribuição espaço-temporal e balanço da massa de fósforo na represa de Salto Grande Americana, SP. **Tese de Doutorado**, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1999.

ROBERTSON, L.J.; HERMANSEN, L.; GJERDE, B.K. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in sewage in Norway. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p.5297-5303, 2006.

ROCHELLE, P.A.; LEON, R.D.E.; JOHNSON, A.; STEWART, M.H.; WOLFE, R.L. Evaluation of immunomagnetic separation for recovery of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts from environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p.841-845, 1999.

RODGERS, M.R.; FLANNIGAN, D.J.; JAKUBOWSKI, W. Identification of algae which interfere with the detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts and a method for alleviating this interference. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.3759-3763, 1995.

ROSE, J.B. Environmental ecology of *Cryptosporidium* and public health implications. **Annual Review of Public Health**, vol. 18, p.135-161, 1997.

ROSSIGNOL, J.-F.; AYOUB, A.; AYERS, M.S. Treatment of diarrhea caused by *Giardia intestinalis* and *Entamoeba histolytica/dispar*: a double blind placebo controlled study of nitazoxanide. **Journal of Infectious Diseases**, v.184, p.381-384, 2001.

ROSSIGNOL, J.-F. *Cryptosporidium* and *Giardia*: Treatment options and prospects for new drugs. **Experimental Parasitology** (2009),doi:10.1016/j.exppara.2009.07.005.

RYAN, U.M.; XIAO, L.; READ, C.; SULAIMAN, I.M.; MONIS, P.; LAL, A.A.; FAYER, R.; PAVLÁSEK, I. A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlasek, 1999 (Apicomplexa : Cryptosporidiidae) from birds. **Journal for Parasitology**, v.89, p.809-813, 2003.

RYAN, U.; O'HARA, A.; XIAO, L. Molecular and biological characterization of *Cryptosporidium molnari*-like isolate from a guppy (*Poecilia reticulata*). **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.3761-3765, 2004.

SAFARIKOVA, M.; SAFARIK, I. The application of magnetic techniques in Biosciences. **Magnetic and Electrical Separation**, v.10, p.223-252, 2001.

SALATI, E.; LEMOS, H. M.; SALATI E. Água e o Desenvolvimento Sustentável. In: REBOUÇAS, A. C.; BRAGA, B. e TUNDISI, J.G. (Org.). **Águas Doces no Brasil – Capital Ecológico, Uso e Preservação**. 2ª ed. São Paulo: Editora Escrituras. cap. 2, p: 39-63, 2002.

SANTOS, L.U.; CANTUSIO NETO, R.; FRANCO, R.M.B. Protozoários patogênicos de veiculação hídrica: as metodologias de detecção em amostras de esgoto e a eficiência dos tratamentos de remoção e desinfecção. **Higiene Alimentar. Edição temática nº1**, v.22, p.22-28, 2008.

SANTOS, L.U.; BONATTI, T.R.; CANTUSIO NETO, R.; FRANCO, R.M.B. Occurrence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in activated sludge samples in Campinas, SP, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.46, p.309-313, 2004.

SAVIOLI, L.; SMITH, H.; THOMPSON, A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. **Trends in Parasitology**, v.22, p.203–208, 2006.

SAUCH, J.F. Use of immunofluorescence and phase-contrast microscopy for detection and identification of *Giardia* cysts in water samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v.50, p.1434–1438, 1985.

SCHETS, F.M.; WIJNEN, J.H.V.; SCHIJVE, J.F.; SCHOON, H.; RODA HUSMAN, A.M. Monitoring of waterborne pathogens in surface waters in Amsterdam, The Netherlands, and the potential health risk associated with exposure to *Cryptosporidium* and *Giardia* in these Waters. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, p. 2069–2078, 2008.

SCOTT, K.G.; LOGAN, M.R.; KLAMMER, G.M.; TEOH, D.A.; BURET, A.G. Jejunal brush border microvillous alterations in *G. muris* -infected mice: role of T lymphocytes and Interleukin-6. **Infection and Immunity**, v.68, p.3412–3418, 2000.

SCOTT, K.G.-E.; MEDDINGS, J.B.; KIRK, D.R.; LEES-MILLER, S.P.; BURET, A.G. Intestinal infection with *Giardia* spp. Reduces epithelial barrier function in a myosin light chain kinase-dependent fashion. **Gastroenterology**, v.123, p.1179–1190, 2002.

SEARCY, K.E.; PACKMAN, A.I.; ATWILL, E.R.; HARTER, T. Association of *Cryptosporidium parvum* with suspended particles: Impact on oocyst sedimentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.1072–1078, 2005.

SEMENZA, J.C.; NICHOLS, G. Cryptosporidiosis surveillance and waterborne outbreaks in Europe. **Eurosurveillance**, v.12, p.120-123, 2007.

SHEPHERD, K.M.; WYN-JONES, A.P. An evaluation of methods for the simultaneous detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.1317–1322, 1996.

SIMPSON, A.G.; ROGER, A.J.; SILBERMAN, J.D. Evolutionary history of 'early-diverging' eukaryotes: the excavate taxon *Carpodemonas* is a close relative of *Giardia*. **Molecular Biology and Evolution**, v.19, p. 1782–1791, 2002.

SMITH, H.V.; GRIMASON, A.M.; BENTON, C.; PARKER, J.F.W. The occurrence of *Cryptosporidium* spp. Oocysts in Scottish waters and the development of a fluorogenic viability assay for individual *Cryptosporidium* spp. oocysts. **Water Science and Technology**, v.24, p.169–172, 1991.

SMITH, H.V.; BROWN, J.; COULSON, J.C.; MORRIS, G.P.; GIRDWOOD, R.W.A. Occurrence of oocysts of *Cryptosporidium* sp. in *Larus* spp. gulls. **Epidemiology and Infection**, v.110, p.135–143, 1993.

SMITH, H.V.; ROBERTSON, L.J.; ONGERTH, J.E. Cryptosporidiosis and Giardiasis, the impact of waterborne transmission. **Journal of Water Supply: Research and Technology – AQUA**, v.44, p.258–274, 1995.

SMITH, H.V. Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in water. In: **PICKUP, R.W, SAUNDERS, J.R. Molecular approaches to environmental microbiology**. Ellis-Horwood; p. 195–225, 1996.

SMITH, H.V. Detection of parasites in the environment, In: SMITH, H.V.; STIMSON, W.H., CHAPPEL, L.H., (Eds.), Infectious diseases diagnosis: current status and future trends, **Parasitology**, v. 117, p.S113–S141, 1998.

SMITH, H.V.; GRIMASON, A.M. *Giardia* and *Cryptosporidium* in water and wastewater. In The Handbook of Water and Wastewater Microbiology (Mara, D. and Horan, N., eds), pp. 619–781, Elsevier, 2003.

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

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. **Epidemiology and Infection**, v.134, p.1141-1149, 2006.

SMITH, H.V. Diagnostics. In: Fayer, R., Xiao, L. (Eds.), *Cryptosporidiosis of Man and Animals*. CRC Press and IWA Publishing, USA, pp. 173–208, 2008.

SMITH, H.V.; NICHOLS, R.A.B. *Cryptosporidium*: Detection in water and food. **Experimental Parasitology** (2009), doi:10.1016/j.exppara.2009.05.014.

SMITH, H.V.; CAMPBELL, B.M.; PATON, C.A.; NICHOLS, R.A.B. Significance of enhanced morphological detection of *Cryptosporidium* sp. Oocysts in water concentrates determined by using 4', 6'-diamidino-2-phenylindole and immunofluorescence microscopy. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68 p. 5198-5201, 2002.

SOCIEDADE DE ABASTECIMENTO DE ÁGUA E SANEAMENTO S/A (SANASA). Disponível em: [http://www.sanasa.com.br/noticias/not\\_con3.asp?par\\_nrod=897&flag=TK](http://www.sanasa.com.br/noticias/not_con3.asp?par_nrod=897&flag=TK). Acesso no dia 22/09/2009.

SOUZA, R.C.R. Dinâmica espaço-temporal da comunidade fitoplanctônica de um reservatório hipereutrófico: Salto Grande, Americana, São Paulo. **Tese de Doutorado**, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2000.

SPERANDIO, A.M.G.; SPADACIO, C.A. Praia Azul...Uma história construída coletivamente em Americana, SP. In: **Projeto AIPS- Ações Intersectoriais para a Promoção da Saúde**, 2009.

STEIN, P.L. The great Sydney water crisis of 1998. **Water, Air and Soil Pollution**, v.123, p.419-436, 2000.

STOTT, R.; MAY E.; MATSUSHITA E.; WARREN A. Protozoan predation as a mechanism for the removal of *Cryptosporidium* oocysts from wastewaters in constructed wetlands. **Water Science and Technology**, v.44, p.191–198, 2001.

STRAŠKRABA, M.; TUNDISI, J. G. Reservoir water quality management. In: **Guidelines of lake management**. International Lake Environment Committee, 1999, 229p.

SUNNOTEL, O.; LOWERY, C.J.; MOORE, J.E.; DOOLEY, J.S.G.; XIAO, L.; MILLAR, B.C.; ROONEY, P.J.; SNELLING, W.J. *Cryptosporidium*. **Letters in Applied Microbiology**, v.43, p.7-16, 2006.

TEIXEIRA, M.G.; COSTA, M.C.; CARVALHO, V.L.; PEREIRA, M.S.; HAGE, E. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam Bahia, Brazil. **Bulletin Panamerican Health Organization**, v.27, p.244-253, 1993.

THOMPSON, R.C.A.; LYMBERY, A.J.; MELONI, B.P. Genetic variation in *Giardia* Kunstler, 1882: taxonomic and epidemiologic significance., **Protozoological Abstracts**, v.14, p.1-28, 1990.

THOMPSON, R.C.A.; REYNOLDS, J.A.; MENDIS, A.H.W. *Giardia* and *Giardiasis*. **Advances in Parasitology**, v.32, p.71–160, 1993.

THOMPSON, R.C.A. Presidential address: rediscovering parasites using molecular tools- towards revising the taxonomy of *Ecchinococcus*, *Giardia* and *Cryptosporidium*. **International Journal for Parasitology**, v.32, p.493-496. 2002.

THOMPSON, R.C.A. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. **Journal for Parasitology**, v.89, p.S134-S140, 2003.

THOMPSON, R.C.A. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and *Giardiasis*. **Veterinary Parasitology**, v.126, p.15–35, 2004.

THOMPSON, R.C.A.; MONIS, P.T. Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. **Advances in Parasitology**, v.58, p.69–137, 2004.

THOMPSON, R.C.A.; OLSON, M.E.; ZHU, G.; ENOMOTO, S.; ABRAHAMSEN, M.S.; HIJJAWI, N.S. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. **Advances in Parasitology**, v. 59, p.77–158, 2005.

THOMPSON, R.C.A. *Giardiasis: Modern Concepts in Control and Management*. **Annales Nestlé (Engl)**, v.66, p.23-29, 2008.

THORNTON, K.W (1990) Perspectives on Reservoir Limnology. In: **THORNTON, K.W, KIMMEL, B.L, PAYNE, F.E Reservoir Limnology: Ecological Perspectives**. p. 1-15, 1990.

THURMAN, R.; FAULKNER, B.; VEAL, D. Water quality in rural Australia. **Journal of Applied Microbiology**, v.84, p.627–632, 1998.

TRATA BRASIL. Saneamento, nova realidade- O Brasil está muito longe do ideal. Trata Brasil, Saneamento é Saúde. Disponível em: [http:// www.tratabrasil.org.br/novo\\_site/?id=5760](http://www.tratabrasil.org.br/novo_site/?id=5760). Acesso no dia 26/03/09.

TRAUB, R.J, MONIS, P.T, ROBERTSON, I.D. Molecular epidemiology: a multidisciplinary approach to understanding parasitic zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v.35, p. 1295–1308, 2005.

TROEGER, H.; EPPLE, H.J.; SCHNEIDER, T.; WAHNSCHAFFE, U.; ULLRICH, R.; BURCHARD, G.D.; JELINEK, T.; ZEITZ, M.; FROMM, M.; SCHULZKE, J.D. Effect of chronic *Giardia lamblia* infection on epithelial transport and barrier function in human duodenum. **Gut**, v. 56, p.316–317, 2007.

TROUT, J.M.; WALSH, E.J.; FAYER, R. Rotifers Ingest *Giardia* Cysts. **Journal for Parasitology**, v.88, p. 1038–1040, 2002.

TSUSHIMA, Y.; KARANIS, P.; KAMADA, T.; NAGASAWA, H.; XUAN, X.; IGARASHI, I.; FUJISAKI, K.; TAKAHASHI, E.; MIKAMI, T. Detection of *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Environmental Water in Hokkaido, Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.63, p.233-236, 2001.

TUCCI, A.; DEBERDT, G.L.B.; DEBERDT, A.J. Análise da Comunidade de Fitoplâncton do Reservatório de Salto Grande (Americana, SP): Uma revisão dos Estudos Desenvolvidos em um Sistema Eutrófico. In:

ESPÍNDOLA, E.L.G.; LEITE, M.A.; DORNFELD, C.B. **Reservatório de Salto Grande (Americana, SP): Caracterização, Impactos e Propostas de Manejo**. 1 ed. São Carlos: Rima, 2004. cap.7, p.107-153.

TUNDISI, J.G.; TUNDISI, T.M.; ROCHA, O. Limnologia de Águas Interiores. Impactos, Conservação e Recuperação de Ecossistemas Aquáticos. In: REBOUÇAS, A. C.; BRAGA, B. e TUNDISI, J.G. (Org.). **Águas Doces no Brasil – Capital Ecológico, Uso e Preservação**. 2ª ed. São Paulo: Editora Escrituras. Cap.6. p.205-221, 2002.

TZIPORI, S.; WARD, H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. **Microbes and Infection**, v.4, p. 1047–1058, 2002.

TZIPORI, S.; WIDMER, G. A hundred-year retrospective on cryptosporidiosis. **Trends in Parasitology**, v.24, p.184-189, 2008.

UNICEF (UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND). Handbook on water quality. New York, 2008. Disponível em: [http://www.unicef.org/wash/files/WQ\\_Handbook\\_final\\_signed\\_16\\_april\\_2008.pdf](http://www.unicef.org/wash/files/WQ_Handbook_final_signed_16_april_2008.pdf). Acesso no dia 26/03/2009.

UN-WATER STATISTICS. Statistics: Graphs & Maps. Water Resources, 2009a Disponível em: <http://www.unwater.org>. Acesso no dia 23/04/09.

UN-WATER STATISTICS . Statistics: Graphs & Maps. Water pollution, Environmental Degradation and Disasters, 2009b. Disponível em: <http://www.unwater.org>. Acesso no dia 23/04/2009.

UN-WATER. Coping with water scarcity,. A strategic issue and priority for system-wide action August, 2006. Disponível em: <http://www.unwater.org/downloads/waterscarcity.pdf> . Acesso no dia 23/04/2009.

USEPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). Office of Water. Washington DC. Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by filtration/IMS/FA. EPA-815-R-05-002, 2005. Disponível em: <http://www.epa.gov/microbes/1623de05.pdf>. Acesso no dia 23/04/2009.

USEPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). Disponível em: <http://www.epa.gov/ogwdw/lt2/training/module-microscopy>. Acesso no dia 23/04/2009

USEPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). 1998. USEPA method 1622: *Cryptosporidium* in water by filtration/IMS/IFA. EPA 821-R-98–010. Office of Water, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C. Disponível em: <http://www.epa.gov/nerlcwww/online.htm>. Acesso no dia 23/04/2009.

USEPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY).1999. Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/FA. EPA 821-R-99–006. Office of Water, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C. Disponível em:<http://www.epa.gov/nerlcwww/online.htm>. Acesso no dia 23/04/2009.

USEPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). 1995. ICR Protozoan Method for detecting *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water by a fluorescent antibody procedure. Disponível: <http://www.epa.gov/nerlcwww/online.htm>. Acesso no dia 23/04/2009.

VALENTIM, M.A.A. Uso de leitos cultivados no tratamento de efluentes de tanque séptico modificado. **Dissertação de Mestrado**, Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, 1999.

VERNILE, A.; NABI, A.Q.; BONADONNA, L.; BRIANCESCO, R.; MASSA, S. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Italian water supplies. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.152, p.203–207, 2009.

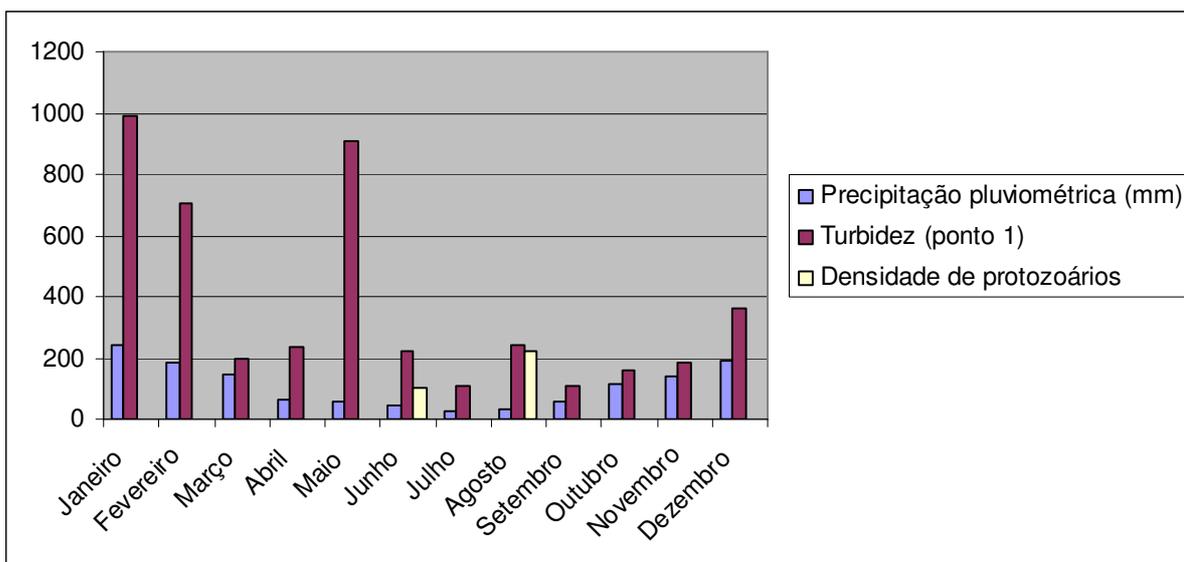
- VESEY, G.; SLADE, J.S.; BYRNE, M.; SHEPHERD, K.; FRICKER, C.R. A new method for the concentration of *Cryptosporidium* oocysts from water. **Journal of Applied Bacteriology**, v.75, p.82–86, 1993.
- VESEY, G.; DEERE, D.; GAUCI, M.R.; GRIFFITHS, K.R.; WILLIAMS, K.L.; VEAL, D. Evaluation of fluorochromes and excitation sources for immunofluorescence in water samples. **Cytometry**, v.29, p.147–54, 1997.
- VIANA, S.G.F. Giardíase. In: **Parasitologia Clínica: uma abordagem clínica**. Rio de Janeiro, editora Elsevier, cap 3. 2008.
- VOLOTÃO, A.C.; COSTA-MACEDO, L.M.; HADDAD, F.S.M.; BRANDÃO, A. ; PERALTA, J.M; FERNANDES, O. Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using  $\beta$ -giardin gene: A phylogenetic analysis. **Acta Tropica**, v.102, p.10–19, 2007.
- WADE, T.J.; PAI, N.; EISENBERG, J.N.; COLFORD, JR.; DO, J.M. U.S Environmental Protection Agency water quality guidelines for recreational waters prevent gastrointestinal illness? A systematic review and meta-analysis. **Environmental Health Perspective**, v.111, p.1102-1109, 2003.
- WARE, M. W.; WYMER, L.; LINDQUIST, H.; SCHAEFER III, F.W. Evaluation of an alternative IMS dissociation procedure for use with method 1622—detection of *Cryptosporidium* in water. **Journal of Microbiological Methods**, v.55, p.575– 583, 2003.
- WIDMER, G.; LIN, L.; KAPUR, V.; FENG, X.; ABRAHAMSEN, M. Genomics and genetics of *Cryptosporidium parvum*: the key to understanding cryptosporidiosis. **Microbes and Infection**, v.4, p.1081–1090, 2002.
- WILKES, G.; EDGE, T.; GANNON, V.; JOKINEN, C.; LYAUTEY, E.; MEDEIROS, D.; NEUMANN, N.; RUECKER, N.; TOPP, E.; LAPEN, D.R. Seasonal relationships among indicator bacteria, pathogenic bacteria, *Cryptosporidium* oocysts, *Giardia* cysts, and hydrological indices for surface waters within an agricultural landscape. **Water Research**, v.43, p. 2209-2223, 2009.
- WRIGHT, J.M.; DUNN, L.A.; UPCROFT, P.; UPCROFT, J.A. Efficacy of antiGiardial drugs. **Expert Opinion on Drug Safety**, v.2, p.529–541, 2003.
- WOHLSEN, T.; BATES, J.; GRAY, B.; ALDRIDGE, P.; STEWART, S.; WILLIAMS, M.; KATOULI, M. The occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in the Lake Baroon catchment, Queensland, Australia. **Journal of Water Supply: Research and Technology- AQUA**, v.55, p.357-366, 2006.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) Analyse des eaux résiduaires en vue de leur recyclage en agriculture. Manuel des techniques de laboratoire en parasitologie et bactériologie, Genève, 1997. Disponível em: <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/who/emplo.pdf>. Acesso no dia 21/09/2009.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Water Treatment and Pathogen Control: Process Efficiency in Achieving Safe Drinking Water. Edited by Mark W LeChevallier and Kwok-Keung Au, 2004. Disponível em: [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/watreatment/en/index.html](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/watreatment/en/index.html). Acesso no dia 25/08/2009.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Water Recreation and Disease. Plausibility of Associated Infections: Acute Effects, Sequelae and Mortality , 2005. Disponível em: [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/bathing/recreadis/en/index.html](http://www.who.int/water_sanitation_health/bathing/recreadis/en/index.html). acesso no dia 23/03/09.

- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Guidelines for Drinking Water Quality *Cryptosporidium*. EHC *Cryptosporidium* draft 2.02 January, 2006. Disponível em: [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/gdwqrevision/cryptodraft2.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/gdwqrevision/cryptodraft2.pdf). Acesso no dia 27/11/2009.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Water, Sanitation and Health. Water related-diseases, 2009. Disponível em: [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/diseases/diarrhoea/en/](http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/diarrhoea/en/). Acesso no dia 23/03/2009.
- WU, J.Y. Sources and Transport of *Escherichia coli* in the Blackstone River Watershed During Wet-Weather Events. Master's thesis- Department of Public Health - University of Massachusetts, Amherst, Massachusetts, 2007.
- WU, J.; REES, P.; STORRER, S.; ALDERISIO, K.; DORNER, S. Fate and transport modeling of potential pathogens: the contribution from sediments. **Journal of the American Water Resources Association**, v. 45, p.35-44, 2009.
- XIAO, L.H.; FAYER, R.; RYAN, U.; UPTON, S.J. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, p.72-97, 2004.
- XIAO, L.; RYAN, U.M. Molecular epidemiology. In *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis ed. Fayer, R. and Xiao, L. pp. 119–171. Boca Raton: CRS Press, Taylor & Francis Group, 2006.
- XIAO, L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. **Experimental Parasitology**, 2009 doi:10.1016/j.exppara.2009.03.018
- YAKUB, G.P.; STADERMAN-KNAUER. Evaluation of imunomagnetic separation for recovery of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* from highiron matrices. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.3628 – 3631, 2000.
- YODER J., ROBERTS V., CRAUN, G.F, HILL, V., HICKS, L.A., ALEXANDER, N.T., RADKE, V., CALDERON, R.L., HLAUSA, M.C., BEACH, M.J., ROY, S.L. Surveillance for Waterborne Disease and Outbreaks Associated with Drinking Water and Water not Intended for Drinking --- United States, 2005—2006. In: CDC. Surveillance Summaries. **MMWR**, v. 57, p.39-62, 2008a. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/ss5709a4.htm>. Acesso no dia 4/08/2009
- YODER J., HLAUSA, M.C., CRAUN, G.F., HILL, V., ROBERTS V., YU, P.A., HICKS, L.A., ALEXANDER, N.T., CALDERON, R.L., ROY, S.L., BEACH, M.J. Surveillance for Waterborne Disease and Outbreaks Associated with Recreational Water Use and Other Aquatic Facility-Associated Health Events --- United States, 2005—2006. In: CDC. Surveillance Summaries. **MMWR**, v. 57, p.1-29, 2008b. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/ss5709a1.htm#fig3>. Acesso no dia 4/08/2009.
- ZANATA, L.H. Heterogeneidade ambiental do reservatório de Salto Grande (Americana, SP) com ênfase na distribuição das populações de Cladocera. **Dissertação de mestrado**, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.
- ZARDI, E.M.; PICARDI, A.; AFELTRA, A. Treatment of cryptosporidiosis in immunocompromised hosts. **Chemotherapy**, v.51, p.193–196, 2005.
- ZARLENGA, D.S.; TROUT, J.M. Concentrating, purifying and detecting waterborne parasites. **Veterinary Parasitology**, v.126, p.195–217, 2004.
- ZIEGLER, P.E; WADE, S.E; SCHAAF, S.L; STERN, D.A; NADARESKI, C. A; MOHAMMED, H.O. Prevalence of *Cryptosporidium* species in wildlife populations within a watershed landscape in southeastern New York State. **Veterinary Parasitology**, v.147, p.176–184, 2007.

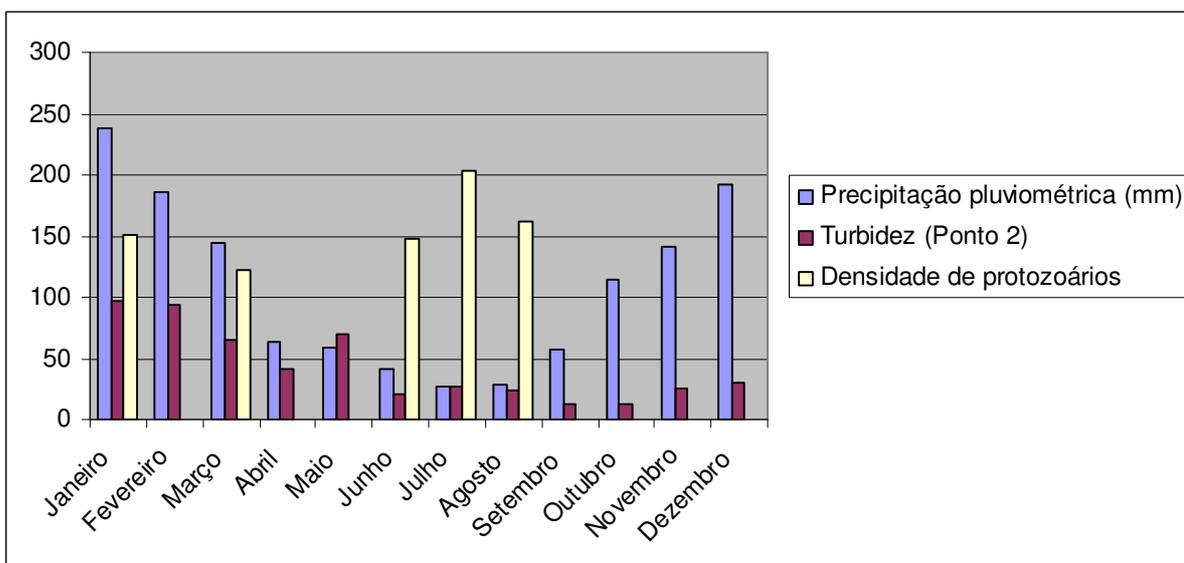
ZIMMER, J.L.; SLAWSON, R.M.; HUCK, P.M. Inactivation and potential repair of *Cryptosporidium parvum* following low- and medium-pressure ultraviolet irradiation. **Water Research**, v.37, p.3517-3523, 2003.

## 9. ANEXOS

### ANEXO A – Gráfico em colunas da precipitação pluviométrica\*, turbidez e densidade de protozoários do ponto 1 (Mini-Pantanal).



### ANEXO B – Gráfico em colunas da precipitação pluviométrica\*, turbidez e densidade de protozoários do ponto 2 (Saltinho).



\*Precipitação pluviométrica da cidade de Americana-SP (CEPAGRI- Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas aplicadas à Agricultura).