

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA



Rita Borges França

***Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. e ovos de helmintos em esgoto
hospitalar: destruição e análise de dano estrutural dos protozoários após o
processo fotoeletroquímico**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
RITA BORGES FRANÇA
Regina Maura Bueno Franco
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação de Mestrado apresentada
à Comissão de Pós-Graduação do
Instituto de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção
de título de mestre em Parasitologia.

Orientadora: Prof^{ra}.Dr^a.Regina Maura Bueno Franco

Campinas, SP

2007

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

F844c

França, Rita Borges

Cryptosporidium spp., *Giardia* spp. e ovos de helmintos em esgoto hospitalar: destruição e dano estrutural dos protozoários após o processo fotoeletroquímico / Rita Borges França. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientadora: Regina Maura Bueno Franco.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Giardia*. 2. *Cryptosporidium*. 3. Esgoto hospitalar.
4. Fotoeletroquímica. I. Franco, Regina Maura Bueno. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. and helminthes eggs in raw hospital sewage: destruction and structural damage of protozoa after photoelectrochemical process.

Palavras-chave em inglês: *Giardia*; *Cryptosporidium*; Hospital sewage; Photoelectrochemistry.

Titulação: Mestre em Parasitologia.

Banca examinadora: Regina Maura Bueno Franco, Maria Valnice Boldri Zanoni, Selma Giorgio.

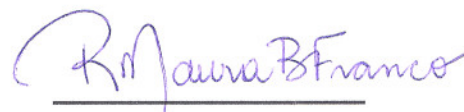
Data da defesa: 29/06/2007.

Programa de Pós-Graduação: Parasitologia.

Campinas, 29 de junho de 2007.

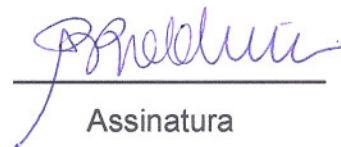
BANCA EXAMINADORA

Prof^ª Dr^a Regina Maura Bueno Franco
(orientadora)



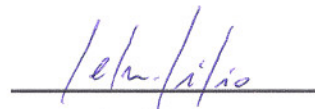
Assinatura

Prof^ª Dr^a Maria Valnice Boldrin Zanoni



Assinatura

Prof^ª Dr^a Selma Giorgio



Assinatura

Prof. Dr. José Roberto Guimarães



Assinatura

Prof^ª Dr^a Marlene Tiduko Ueta



Assinatura

Dedico esta tese àqueles que fizerem o bom uso dela.

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

À Profa. Maura, pela orientação e enorme dedicação para a realização deste trabalho;

Ao Prof. Rodnei, pela oportunidade, orientação e encorajamento;

Aos colegas e amigos do Laboratório de Protozoologia: Nilson, Taís, Mirna, Diego, Romeu e Bianca, pela colaboração, ajuda e sugestões e à Luciana, que eu tanto admiro e que muito me ajudou durante o período da tese, um laço de amizade seguido de conversas e cafés;

Aos colegas e amigos do Laboratório de Engenharia Eletroquímica: Mara, Rosângela, Carla, Christiane, Andréa, Edison, Spitzer, Peterson e Bárbara, pelas orientações nas áreas de química e de engenharia;

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Parasitologia;

Ao Orlando, pela ajuda e cooperação na época “pré-mestrado”;

Ao meu pai Paulo França, pelo incentivo na vida acadêmica e apoio;

À minha mãe Angela Borges, pela confiança e pelo amparo;

À minha família Ana, Eliane, Eveline, Manuel, Pedro e Eduardo pelo afeto e à Neu, pelas leituras da tese e almoços;

Ao Tuco, pela companhia e por compartilhar angústias de um final de tese;

À Renata e à Lorena, por me ajudarem a tentar alcançar o equilíbrio;

Aos meus queridos amigos, pelo carinho;

Obrigada!

*A água de boa qualidade é como a saúde ou a liberdade:
só se tem valor quando acaba.*

João Guimarães Rosa

RESUMO

O efluente hospitalar apresenta, dentre seus componentes, organismos como vírus, bactérias, protozoários e helmintos, que ocasionam muitas doenças com implicações em saúde pública. *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. são protozoários parasitos com grande importância por sua veiculação hídrica e cujas formas infectantes são resistentes aos processos rotineiramente usados no tratamento de água e esgoto. A transmissão destes pode ocorrer com a ingestão dos oocistos e cistos eventualmente presentes na água e nos alimentos contaminados, por contato direto (pessoa a pessoa), por contato indireto (objetos contaminados), pelo contato sexual ou pode ser zoonótica. Os métodos mais utilizados para desinfecção em estações de tratamento são a aeração, cloração e irradiação por UV, mas a cloração, não é suficiente para eliminar oocistos de *Cryptosporidium* spp e cistos de *Giardia* spp. A tecnologia eletroquímica oferece um meio de tratamento eficiente para a oxidação da carga orgânica e microbiológica degradando-as ou mineralizando-as. O presente trabalho teve por objetivos: (1) verificar a ocorrência natural de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em amostras 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; (2) verificar a presença de ovos e larvas de helmintos no esgoto hospitalar empregando a técnica da NOM (Norma Oficial Mexicana) e (3) avaliar a taxa de destruição e o dano estrutural causado em cistos e oocistos após o tratamento fotoeletroquímico. No esgoto hospitalar bruto 4,1 % e 58,3 % das amostras foram positivas para *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., respectivamente, sendo observada a concentração média de $2,7 \times 10^3$ oocistos/L e $3,8 \times 10^5$ cistos/L. Foi possível verificar a elevada presença de helmintos, com 90 % das amostras apresentando positividade e concentração de $5,8 \times 10^4$ ovos/L e $4,0 \times 10^5$ larvas/L. Os protozoários e helmintos presentes em altas concentrações no esgoto hospitalar representam uma séria ameaça à saúde humana. Para os ensaios com o

tratamento fotoeletroquímico, amostras de 1 L de esgoto hospitalar foram artificialmente contaminadas com cistos e oocistos e, posteriormente, submetidas a esse tratamento em um reator de bancada, com tempos de exposição de 0, 30, 60 e 90 minutos. Por meio das técnicas de imunofluorescência direta, microscopia de contraste de fase e microscopia eletrônica de varredura verificou-se o dano estrutural causado pela ação dos radicais hidroxila nesses protozoários patogênicos e a destruição dos mesmos. O tratamento fotoeletroquímico mostrou uma redução na concentração dos protozoários nos tempos de 30 e 60 minutos e após 90 minutos, nenhum cisto ou oocisto foi detectado. A presença do cloreto no efluente bruto (média de 45 mg/L) desencadeou uma potencialização da ação de mecanismo do reator, gerando efeito associado com a eletrólise, dos radicais hidroxila com a formação de hipoclorito.

Palavras-chave: *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., esgoto hospitalar, processo fotoeletroquímico.

ABSTRACT

Hospital effluent presents organisms as virus, bacteria, protozoan and helminthes, that cause many illnesses with implications in public health. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. are parasites with waterborne importance and its cysts and oocysts are resistant to the routinely processes used in water treatment. Their transmission can occur by oocysts and cysts ingestion in the water and contaminated foods, by direct contact (person the person), by indirect contact (contaminated objects), by sexual contact or zoonotic. The methods used for disinfection and treatment of sewage are aeration, chlorination and irradiation of ultraviolet light, but the treatment by chlorination is not enough to inactivate *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia* spp. cysts. The electrochemical technology offers an efficient treatment for the oxidation of organic and microbiological load, degrading and mineralizing them. The present work had as objectives: (1) to verify the natural occurrence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in samples of Clinical Hospital sewage from Unicamp using centrifugal-concentration followed by clarification with ether method and visualization by immunofluorescence assay, during one year, (2) to verify the presence of eggs and larvae of helminthes in the hospital sewage by NOM (Mexican Official Norm) technique and (3) to evaluate the destruction rate and the structural damage caused in cysts and oocysts by photoelectrochemical treatment. In raw hospital sewage 4.1% and 58.3% of the samples were positive for *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp., respectively, with concentrations of 2.7×10^3 oocysts/L and 3.8×10^5 cysts/L. The high presence of helminthes, 90% positive, with 5.8×10^4 eggs/L and 4.0×10^5 larvae/L and protozoan in hospital sewage represent a serious threat to human being health. For the assays with the photoelectrochemical treatment, samples of 1 L of hospital sewage artificially contaminated with cysts and oocysts were submitted to this treatment in a bench reactor, with times of exposition of 0, 30, 60 and 90 minutes. By the techniques of immunofluorescence assays, microscopy of phase contrast and scanning electronic microscopy, the structural damage and destruction were observed, caused by hydroxyl radicals in these

pathogenic protozoans. The photoelectrochemical treatment showed a concentration reduction of the protozoan in 30 and 60 minutes, and after 90 minutes no cyst or oocysts were detected. The chloride present in raw effluent (average of 45 mg/L) unchained a potential action of the reactor mechanism, generating an effect associated with electrolysis of the hydroxyl radicals with production of hypochlorite.

Key-words: *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., hospital sewage, photoelectrochemical process.

Lista de Figuras

Figura 1 (A): Mecanismo de formação do radical hidroxila na superfície de anodos dimensionalmente estáveis: via descarga anódica da água (reação a); via descarga fotoeletroquímica da água (reações b-c); (B): Mecanismo de oxidação de orgânicos pelo radical hidroxila: via formação de óxidos superiores (reações d-e); via combustão direta (reação f).....	41
Figura 2: Caixa coletora do efluente do Hospital de Clínicas da Unicamp.....	48
Figura 3: Organograma das etapas laboratoriais realizadas durante os ensaios de tratamento fotoeletroquímico.....	56
Figura 4 (A): Reator fotoeletroquímico de bancada; (B): Esquema do reator: 1- sistema de refrigeração, 2- anodo DSA [®] , 3- catodo de tela de titânio, 4- tubo de quartzo.....	58
Figura 5 (A) e (B): Larvas de nematóides encontradas na amostra de esgoto hospitalar bruto do Hospital de Clínicas da Unicamp (aprox. 140 e 180 µm, respectivamente).....	71
Figura 6: Ovo larvado da amostra 7 com incorporação do corante vital Azul Trypan encontrado no esgoto do Hospital de Clínicas da Unicamp (aprox. 70 µm de comprimento).....	71
Figura 7: Cistos de <i>Giardia</i> do inóculo purificado, utilizados nos ensaios com tratamento fotoeletroquímico. Visualização por RID (400×).....	74
Figura 8: Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> agregados, presentes na suspensão comercialmente adquirida da empresa Waterborne Inc. (600×).....	74
Figura 9: Destruição de oocistos visualizados em RID, no decorrer do tratamento fotoeletroquímico aplicado ao esgoto hospitalar do Hospital de Clínicas da Unicamp.....	78
Figura 10: Destruição de cistos visualizados em RID, no decorrer do tratamento fotoeletroquímico aplicado ao esgoto hospitalar do Hospital de Clínicas da Unicamp.....	78

Figura 11: Cisto de <i>Giardia</i> spp. presente na amostra bruta.....	79
Prancha 1: <i>Cryptosporidium</i> spp. após tratamento fotoeletroquímico.....	80
Prancha 2: <i>Giardia</i> spp. após tratamento fotoeletroquímico.....	81

Lista de Tabelas

Tabela 1: Espécies do gênero <i>Cryptosporidium</i>	13
Tabela 2: Espécies do gênero <i>Giardia</i>	21
Tabela 3: Estimativa da concentração de oocistos e cistos /L, média e desvio padrão (DP), em 12 meses de coleta do esgoto bruto do Hospital de Clínicas da Unicamp (periodicidade quinzenal).....	68
Tabela 4: Eficiência de recuperação do método de centrífugo-concentração seguida de clarificação com éter e limite mínimo de detecção (LMD).....	69
Tabela 5: Número de ovos e larvas de helmintos encontrados em 10 amostras do esgoto hospitalar bruto mediante procedimento da Norma Oficial Mexicana (NOM, 1996).....	70
Tabela 6: Medidas de cloreto do esgoto hospitalar do Hospital de Clínicas da Unicamp.....	72
Tabela 7: Resultados dos ensaios (em triplicata) de 1 L de eletrólito suporte de perclorato de sódio, acrescido de cistos e oocistos, inoculados artificialmente e tratados com reator fotoeletroquímico por 60 minutos.....	73
Tabela 8: Estimativa do número de organismos/L detectados em diferentes tempos do tratamento fotoeletroquímico (0, 30, 60, 90 minutos), aplicados no efluente hospitalar bruto (HC/Unicamp), após contaminação experimental, em um reator fotoeletroquímico.....	76

Lista de Abreviaturas

AIDS: Acquired Immunodeficiency Syndrome
CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente
DAPI: 4',6'-diamidino-2-phenylindole
DNA: Ácido desoxirribonucleico
DP: Desvio Padrão
ETE: Estação de Tratamento de Esgoto
FISH: *Fluorescent In Situ Hybridization*
FITC: Isotiocianato de Fluoresceína
gr. sp.: Gravidade Específica
HAART: *Highly Active Retroviral Therapy*
HC: Hospital de Clínicas
HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana
IMS: *Immunomagnetic Separation*
LMD: Limite Mínimo de Detecção
MCF: Microscopia de Contraste de Fase
MDR: *Multi Drug Resistance*
MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura
MRP: Proteína associada à *Multi Drug Resistance*
NOM: Norma Oficial Mexicana
OH[•]: Radical Hidroxila
PCR: *Polymerase Chain Reaction*
pH: Potencial Hidrogeniônico
RID: Reação de Imunofluorescência Direta
RNA_m: Ácido Ribonucléico mensageiro
RSSS: Resíduos Sólidos de Serviços de Saúde
RuO₂: Dióxido de rutênio
SODIS: *Solar Disinfection*
STF: tampão fosfato
t₀, t₃₀, t₆₀, t₉₀: tempo de tratamento fotoeletroquímico (0, 30, 60, 90 minutos)

THM: Trialometano

TiO₂: Dióxido de titânio

USEPA: *United States Environmental Protection Agency*

UV: Radiação Ultravioleta

SUMÁRIO

Resumo.....	vii
Abstract.....	ix
Lista de figuras.....	xi
Lista de tabelas.....	xiii
Lista de abreviaturas.....	xiv
1. Introdução.....	1
2. Revisão bibliográfica.....	9
2.1 Protozoários patogênicos de veiculação hídrica – Transmissão.....	9
2.2 <i>Cryptosporidium</i> spp.....	10
2.3 <i>Giardia</i> spp.....	20
2.4 Helmintos.....	25
2.5 Protozoários no ambiente.....	27
2.6 Métodos para detecção de <i>Cryptosporidium</i> e <i>Giardia</i> em amostras de esgoto...	31
2.6.1 Concentração.....	32
2.6.1.1 Centrífugo-concentração.....	32
2.6.1.2 Floculação em CaCO ₃	32
2.6.1.3 Filtração.....	32
2.6.2 Purificação.....	32
2.6.2.1 Separação Imunomagnética (IMS).....	32
2.6.2.2. Centrifugação em densidade de gradiente.....	33
2.6.3 Visualização.....	33
2.6.3.1 Citometria de fluxo.....	33
2.6.3.2. RID (Reação de imunofluorescência direta).....	33
2.7 Métodos para medida de infectividade.....	34
2.7.1 Cultivo celular.....	34
2.7.2 Infectividade animal.....	35
2.8 Tecnologia Eletroquímica.....	37
3. Objetivos.....	46
4. Material e Métodos.....	47

4.1 Local de estudo e amostras colhidas.....	47
4.2 Ocorrência natural de <i>Cryptosporidium</i> spp., <i>Giardia</i> spp. e ovos de helmintos no efluente hospitalar.....	48
4.2.1 Detecção dos protozoários parasitos.....	48
4.2.1.1 Centrífugo-Concentração seguida de clarificação com éter.....	49
4.2.1.2 Visualização e quantificação por meio da reação de imunofluorescência direta (RID).....	50
4.2.2 Avaliação da Sensibilidade da metodologia de centrífugo-concentração e clarificação com éter (experimento–controle positivo).....	51
4.2.3 Detecção de helmintos mediante a metodologia da Norma Oficial Mexicana (NOM).....	53
4.2.4 Medidas físico-químicas.....	54
4.2.5 Análise dos dados de ocorrência natural dos protozoários.....	55
4.3 Ensaio com tratamento fotoeletroquímico.....	56
4.3.1 Reator de bancada.....	57
4.3.2 Pré-avaliação do reator (ação dos radicais hidroxila).....	58
4.3.3 Inoculação de parasitos.....	60
4.3.3.1. Preparo de suspensão purificada de cistos de <i>Giardia</i> spp.....	60
4.3.4 Tratamento do esgoto hospitalar no reator fotoeletroquímico.....	62
4.3.4.1 Experimento-controle negativo do reator.....	63
4.3.4.2 Avaliação de dano aos parasitos mediante evidência direta visual (RID e MCF).....	64
4.3.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	64
4.3.4.4 Cálculo da taxa de destruição.....	66
5. Resultados.....	67
5.1 Ocorrência natural de <i>Cryptosporidium</i> spp., <i>Giardia</i> spp. e ovos de helmintos em esgoto hospitalar bruto.....	67
5.1.1 Visualização e quantificação por meio da reação de imunofluorescência direta (RID).....	67
5.1.2 Avaliação da Sensibilidade da metodologia de centrífugo-concentração e clarificação com éter (Experimento-controle positivo).....	69

5.1.3 Detecção de helmintos através da metodologia da Norma Oficial Mexicana (NOM).....	69
5.1.4 Medidas físico-químicas.....	71
5.2 Ensaio com tratamento fotoeletroquímico.....	72
5.2.1 Pré-avaliação do reator (ação dos radicais hidroxila).....	72
5.2.2 Inoculação de parasitos.....	73
5.2.3 Tratamento do esgoto hospitalar no reator fotoeletroquímico.....	75
5.2.3.1 Experimento-controle negativo do reator.....	79
5.2.3.2 Avaliação de dano aos parasitos mediante evidência direta visual (RID e microscopia de contraste de fase).....	79
5.2.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	83
6. Discussão.....	85
6.1 Ocorrência natural de <i>Cryptosporidium</i> spp., <i>Giardia</i> spp. e ovos de helmintos no efluente hospitalar.....	86
6.2 Ensaio com tratamento fotoeletroquímico.....	101
6.2.1 O tratamento do esgoto hospitalar no reator fotoeletroquímico.....	103
6.2.1.1 Avaliação do dano morfológico e estrutural (RID, contraste de fase e MEV)..	110
7. Conclusões.....	119
8. Referências Bibliográficas.....	121
9. Anexos.....	148
9.1 Anexo I: Resolução 358/06 CONAMA.....	148
9.2 Anexo II: Tabela de precipitação no mês de outubro de 2005.....	159
9.3 Anexo III: Declaração de Bioética e Biossegurança.....	160

1. INTRODUÇÃO

A água tem sido motivo de discussões quanto ao seu uso e despejo de esgoto em mananciais. A quantidade de água doce disponível para o consumo humano, incluindo água de rios, subterrânea e de lagos, é menos de 0,5 % de toda a água do planeta Terra. O restante é água do mar, das geleiras ou armazenada no solo, inacessível ao homem (REBOUÇAS, 2002).

Segundo o Unicef (Fundo das Nações Unidas para a Infância), menos da metade da população mundial tem acesso à água potável. Estima-se que 1,2 bilhões de pessoas (35 % da população mundial) não têm acesso à água tratada e 1,8 bilhões de pessoas (43 % da população mundial) não contam com serviços adequados de saneamento básico. Diante desses dados, constata-se que 10 milhões de pessoas morrem anualmente em decorrência de doenças intestinais transmitidas pela água (CETESB, 2006).

A situação de escassez torna-se mais crítica com o aumento da poluição dos recursos hídricos. As modificações ambientais, como a disposição inadequada de resíduos sólidos e lançamento de efluentes sem tratamento nos cursos d'água, podem criar ambientes propícios para a disseminação de patógenos. A ausência de tratamento de efluentes pode resultar na contaminação de mananciais das cidades e, portanto inviabilizar ou encarecer o sistema de abastecimento de água. No entanto, esta prática é bastante comum (PHILIPPI JR., 2005).

Aproximadamente 2 milhões de toneladas de lixo são depositadas por dia em rios e mares incluindo lixo industrial, químico, hospitalar, doméstico e o de agricultura que contém fertilizantes e pesticidas (UNESCO, 2003).

Com isso, o impacto em saúde pública torna-se cada vez maior, principalmente aqueles relacionados às doenças de veiculação hídrica. Dentre elas, estão enquadradas as doenças causadas por bactérias (*Salmonella typhi*, *Shigella* sp., *Escherichia coli*, *Vibrio cholera*, *Legionella pneumophila*, *Leptospira* sp.); vírus (enterovírus, rotavírus, vírus hepatite A, adenovírus); protozoários (*Entamoeba histolytica*, *Giardia* sp., *Cryptosporidium* sp.) e helmintos (*Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis*, *Schistosoma mansoni* e *Trichuris trichiura*).

Nos últimos 25 anos, ocorreram 148 surtos de doenças de veiculação hídrica na América do Norte e Reino Unido. Desses, 20 % foram causados por protozoários com 448.486 casos ressaltando-se que em 47 % dos surtos a etiologia não foi identificada (CRAUN et al., 1998).

A saúde pública deve ter como principal objetivo o estudo e busca de soluções para os problemas de saúde e da manutenção da qualidade de vida da população, considerando os sistemas sócio-cultural, econômico e ambiental (BUSS, 2000).

O CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) resolução nº. 358/2005 (Anexo 1), dispõe sobre o tratamento e a disposição final dos resíduos dos serviços de saúde e dá outras providências. Este considera que soluções consorciadas, para fins de tratamento e disposição final de resíduos de serviços de saúde, são especialmente indicadas para pequenos geradores e municípios de pequeno porte e, ainda considera que há necessidade de ação integrada entre os órgãos federais, estaduais e municipais de meio ambiente, de saúde e limpeza urbana, com o objetivo de regulamentar o gerenciamento dos resíduos de serviços de saúde.

O esgoto hospitalar é extremamente infectante pela presença de patógenos e enquadra-se na classe de risco 4 (elevado risco individual e para a comunidade). A própria resolução considera os resíduos de serviços de saúde, aqueles resultantes de atividades exercidas nos serviços definidos no artigo 1º desta Resolução que, por suas características, necessitam de processos diferenciados em seu manejo, exigindo ou não tratamento prévio à sua disposição final.

No artigo 15 os resíduos do Grupo A1, constantes do Anexo I desta Resolução, devem ser submetidos a processos de tratamento em equipamento que promova redução de carga microbiana compatível com nível III de inativação microbiana e devem ser encaminhados para aterro sanitário licenciado ou local devidamente licenciado para disposição final de resíduos dos serviços de saúde e “considera-se nível III de inativação microbiana: inativação de bactérias vegetativas, fungos, vírus lipofílicos e hidrofílicos, parasitas e microbactérias com redução igual ou maior que $6 \log_{10}$...”.

No Brasil, o volume total de esgoto coletado passou de 11.000.000 m³/dia para 14.000.000 m³/dia de 1989 a 2000. Em relação ao esgoto efetivamente tratado, o aumento foi de 2.000.000 m³/dia para mais de 5.000.000 m³/dia, no mesmo período. Contudo, deve-se ressaltar que somente 20 % do total dos municípios brasileiros coletam e tratam completamente o esgoto antes do seu despejo no meio ambiente (IBGE, 2002).

Em relação às doenças de veiculação hídrica, o esgoto tem sido a principal fonte de contaminação, no caso de surtos epidêmicos (CRAUN, 1998).

Assim, um dos grandes problemas é o esgoto hospitalar pela elevada carga microbiana e resíduos de fármacos, entre outros.

Estudos realizados pela OPAS/OMS (Organização Pan-Americana de Saúde/Organização Mundial de Saúde) relatam que a média de resíduos produzidos por unidades de saúde na América Latina varia de 1 a 4,5 kg/leito/dia, dependendo da complexidade e frequência dos serviços e da tecnologia utilizada.

O efluente hospitalar apresenta entre seus componentes patógenos como vírus, bactérias, protozoários e helmintos, que ocasionam muitas doenças com implicações em saúde pública. Além disso, os hospitais liberam em seu esgoto uma variedade de substâncias tais como fármacos, antibióticos, desinfetantes, anestésicos, metais pesados e drogas não metabolizadas por pacientes (KÜMMERER, 2001; EMMANUEL et al., 2005). As substâncias químicas orgânicas que mais preocupam são aquelas que persistem no ambiente e podem se associar com resíduos de vários tipos, tornando-se tóxicas aos humanos e aos animais (O'CONNOR et al., 2005). Os fármacos são encontrados em estações de tratamento de esgoto e, por não haver um tratamento específico, foram ressaltados como sendo a maior fonte de descarga desses compostos no ambiente (DAUGHTON et al., 1999, CARBALLA et al., 2004). Ferrari et al. (2003) monitoraram três fármacos: carbamazepina (antiepilético), ácido clofíbrico (regulador lipídico) e diclofenaco (analgésico/antinflamatório). E encontraram positividade em todas as amostras oriundas de estações de tratamento de esgoto da França, Itália, Grécia e Suécia.

Outro grupo de poluentes que deve ser ressaltado são os chamados interferentes endócrinos. Estes são encontrados em fármacos, produtos de

higiene pessoal, plásticos e podem interferir em hormônios naturais causando problemas reprodutivos e de crescimento, particularmente em animais aquáticos, causando anomalias sexuais (O'CONNOR et al., 2005; ONDA, 2003). Dentre os produtos de higiene pessoal estão reguladores lipídicos, hormônios sintéticos, esteróides, fragrância, xampu e cosméticos (LISHMAN et al., 2006), que podem estar presentes tanto no esgoto hospitalar quanto no doméstico.

No Brasil, a maioria dos despejos do efluente hospitalar é feito diretamente, sem tratamento, nos mananciais, o que compromete a qualidade do corpo hídrico. Ao mesmo tempo, esses mananciais também são usados para a captação de água para o consumo humano, ocasionando um círculo vicioso. A Portaria nº 518/04 do Ministério da Saúde, estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade de água de abastecimento, para o consumo humano e seu padrão de potabilidade e esta “recomenda a inclusão da pesquisa de organismos patogênicos, com o objetivo de atingir, como meta, um padrão de ausência, dentre outros, de enterovírus, cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp.” (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

O Hospital de Clínicas da Unicamp é um hospital de referência com 450 leitos, localizado na Região Metropolitana de Campinas. O número médio de internações deste hospital foi de 14.056 internações entre os anos de 2002 e 2004 (UNICAMP, 2005). Nos anos de 2002 e 2003, uma média aproximada de 450 m³/dia de consumo de água foi registrada. O índice de consumo (IC) é de 1326,8 L/leito/dia. Salermo et al. (2005) citam que os valores de IC em hospitais situam-se entre 250 e 600 L/leito /dia, sendo o valor encontrado bastante elevado. No ano de

2004, houve uma redução de 9,1 % de consumo com a manutenção de aparelhos e conserto de vazamentos em equipamentos sanitários (ILHA et al., 2006).

O esgoto da Unicamp é lançado em rede de coleta municipal, passando pelo Ribeirão das Pedras, localizado no distrito de Barão Geraldo e seguindo até o Ribeirão Anhumas, que por sua vez, posteriormente se junta ao Rio Atibaia. O Rio Atibaia é considerado um dos mais importantes mananciais de abastecimento público da região. A cidade de Campinas capta um volume médio de 296.000 m³/dia deste rio para abastecer uma população de aproximadamente 1 milhão de habitantes (CANTUSIO NETO, 2004).

Os protozoários patogênicos *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. são de grande importância por sua veiculação hídrica e suas formas infectantes são resistentes aos processos rotineiramente usados no tratamento de água e esgoto (GRIMASON et al., 1990).

Tanto a transmissão da criptosporidiose quanto da giardiose ocorre com a ingestão de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. presentes na água, nos alimentos ou pelo contato pessoal, com animais portadores de diarreia ou superfícies contaminadas (FAYER et al., 2000). Os fatores envolvidos na contaminação do ambiente com ambos os patógenos são: a atividade humana ou não-humana (se zoonótico); as diferenças de comportamento sócio-econômico; a distribuição geográfica; a infra-estrutura sanitária; a qualidade da água e seu fornecimento; o número de hospedeiros infectados; os números de formas infectantes eliminadas; o clima e a hidrogeologia da área (SMITH, 1998).

A transmissão por veiculação hídrica alcançou grande expressividade nos últimos 25 anos e pode ser causada por água potável contaminada, águas de recreação (piscinas, mar, lagos), águas de irrigação, drenagem das pastagens de fazendas, poços artesianos e nascentes contaminadas (SLIFKO et al., 2000).

Os helmintos são de grande importância em saúde pública visto que, apresentam uma distribuição cosmopolita, sendo muito comuns em esgoto bruto, apresentam uma baixa dose infectante e longa persistência no ambiente pela sua alta resistência, podendo sobreviver até 6 anos em solo (ARAKI et al., 2000; JIMÉNEZ et al., 2002). Por essa razão, os ovos de helmintos são indicadores da eficiência dos processos de tratamento e de desinfecção. Eles podem gerar ação mecânica (irritação na parede intestinal, migrações erráticas), ação espoliadora (competição de proteínas, e vitaminas) e tóxica (edema, urticária e convulsões) em seus hospedeiros (JIMÉNEZ et al., 2002).

Estima-se que 1,5 bilhões de pessoas são infectadas com *Ascaris lumbricoides*; 1,3 bilhões, com *Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus* e 1 bilhão, com *Trichuris trichiura*, no mundo (CROMPTON, 1999).

As doenças de veiculação hídrica exibiam uma taxa de fatalidade no final do século XVIII e no início do século XIX. Para evitar tais doenças, passou-se a utilizar técnicas de desinfecção em águas de sistemas de abastecimento. A partir de então, a desinfecção passou a ser um passo de extrema importância e obrigatória nos sistemas de abastecimento de água (ASSALIN, 2001).

No Brasil, o desinfetante mais utilizado é o cloro que apresenta vantagens como: alta eficiência; baixo custo e capacidade de se manter residual, assegurando a qualidade da água até o momento de consumo. Porém tem

desvantagens como a formação de subprodutos nocivos, como trialometanos (THM), decorrente da reação do cloro com compostos orgânicos presentes na água (SINGER, 1999). Os THM são formados pela substituição de 2 ou mais átomos de hidrogênio do metano (CH_4) por átomos de cloro, bromo ou iodo. Dentre eles estão: triclorometano ou clorofórmio (CHCl_3), diclorometano (CHCl_2), bromodiclorometano (CHBrCl_2), dibromoclorometano (CHClBr_2), iododiclorometano (CHICl_2), clorodiodometano (CHClI_2). Os dois primeiros são os mais comumente formados em águas de abastecimento (PIRES, 1997). São compostos identificados como potenciais agentes cancerígenos até mesmo em concentrações inferiores a 0,1 mg/L (LAZAROVA, 1999).

O tratamento por cloração não é suficiente para inativar *Cryptosporidium* sp. e *Giardia* sp., sendo assim necessário uma tecnologia que seja mais eficaz.

A tecnologia eletroquímica oferece uma forma eficiente e versátil de controle da poluição aquosa, modificando, degradando ou mineralizando compostos orgânicos através de processos onde o único reagente envolvido é o elétron. A oxidação anódica pode ocorrer por troca direta de elétrons entre o composto orgânico e a superfície do eletrodo ou, de forma indireta, pela intermediação de espécies eletroativas oxidantes formadas no anodo (COMNINELLIS, 1988; SAVALL, 1995; FÓTI, 1997). Essa tecnologia é considerada de grande valia visto que os produtos finais de oxidação da matéria orgânica são espécies inócuas como CO_2 , água e íons inorgânicos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Protozoários patogênicos de veiculação hídrica - Transmissão

Os protozoários gastrointestinais oportunistas são de grande preocupação para a saúde pública. Os principais protozoários causadores de infecções gastrointestinais são as diferentes espécies de *Giardia*, *Cryptosporidium*, *Entamoeba histolytica*, *Isospora belli* e *Cyclospora cayetanensis*.

Cryptosporidium spp. e *Giardia* spp. são protozoários patogênicos com grande preocupação por sua veiculação hídrica e cujas formas infectantes são resistentes aos processos rotineiramente usados no tratamento de água e esgoto como cloração e adição de dióxido de cloro (GRIMASON et al., 1990; TSAI e LIN, 1999). Porém, a criptosporidiose foi considerada recentemente como uma doença indolente pelo programa de Doenças Negligenciadas (Neglected Disease Initiative) da Organização Mundial de Saúde (SAVIOLLI et al., 2006).

Tanto a transmissão da criptosporidiose quanto da giardiose ocorre mediante a ingestão dos oocistos de *Cryptosporidium* sp. e cistos de *Giardia* sp. presentes na água, nos alimentos ou pelo contato interpessoal, com animais portadores de diarreia ou superfícies contaminadas (FAYER et al., 2000). A transmissão pela via aérea de *Cryptosporidium* spp. ocorre com maior frequência do que se imaginava em imunocompetentes, causando apenas gastroenterite sem acometer o sistema respiratório. Já em imunodeprimidos, a aspiração de oocistos pode causar lesões no sistema respiratório, evoluindo para um quadro agudo de pneumonia (TZIPORI e WARD, 2002). Os sintomas incluem tosse, rouquidão e

falta de ar. Na maioria dos casos foram diagnosticados oocistos no escarro, aspirado traqueal, fluido e exsudato broncoalveolares (FAYER, 1997).

Uma vez contaminada, a água pode disseminar uma infinidade de agentes causadores de doenças como vírus, bactérias, fungos, helmintos e protozoários que, de uma forma geral, possuem formas de resistência que são capazes de sobreviver, se dispersar neste ambiente e alcançar novos hospedeiros.

O grande potencial de veiculação hídrica de *Cryptosporidium* e *Giardia* ficou evidente nos surtos ocorridos nos Estados Unidos, Japão, Canadá, Itália, Inglaterra, Austrália e Nova Zelândia, registrados no período de 1984 a 1999. De 83 surtos epidêmicos de criptosporidiose, 72 deles foram transmitidos diretamente pela água, seja através de água potável ou águas de recreação (FAYER et al., 2000).

Muitos parasitos exóticos e emergentes estão aparecendo em novas áreas, e agentes de doenças infecciosas autóctones estão sendo ampla e rapidamente lançados pelos sistemas de distribuição de água (GAJADHAR e ALLEN, 2004).

2.2 *Cryptosporidium* spp.

Primeiramente visto por Tyzzer em 1907, *Cryptosporidium* sp. é um protozoário do filo Apicomplexa, classe Sporozoasida, subclasse Coccidiasina, ordem Eucoccidiorida, subordem Eimeriorina, família Cryptosporidiidae (LEVINE, 1984).

É um parasito oportunista e emergente, sendo um organismo intracelular intestinal obrigatório e tendo por habitat a região das microvilosidades da célula. É um coccídio cuja forma de resistência chamada de oocisto, tem uma parede de dupla membrana, apresenta 4 esporozoítos no seu interior, mede de 3,0 a 8,5 μm (SUNNOTEL et al., 2006), tem forma de ovalada à esférica e quando eliminado nas fezes já é infectante.

O oocisto é altamente resistente às condições ambientais, pode resistir ao tratamento de água com o cloro e mantém a sua infectividade por longos períodos (6 meses) quando mantidos de 4°C a 20°C (FAYER, 1998). Oocistos expostos a -70°C por 1 hora, foram capazes de causar infecção em camundongos, sendo que a inativação ocorre após um minuto de exposição à temperatura de 73 °C (FAYER, 2004).

O oocisto contém uma sutura, por onde ocorre a abertura do mesmo para a liberação dos esporozoítos (excistação). Internamente, ele apresenta quatro esporozoítos sem a presença de esporocisto, corpo residual, um vacúolo de lipídeos e grânulos de amilopectina, para a sua nutrição (FAYER, 1998). A ultraestrutura da parede do oocisto é composta por quatro camadas distintas: a externa com 5 nm é uma cadeia de rede difusa com zonas interespessadas de densidades diferentes e composta por material filamentoso; espaço elétron-transparente de 5 nm; a central, de 10 nm de espessura é fibrilar e a camada interna, mais espessa, com 20 nm e elétron-densa. Ainda há a presença de estruturas particuladas e glicoproteína filamentosa (PETRY, 2004).

Os esporozoítos, liberados pelo oocisto, penetram na microvilosidade do enterócito (ocasionalmente no epitélio respiratório, biliar ou conjuntiva do olho) e

se instalam na região intracelular, porém em ambiente extracitoplasmático (KOSEK et al., 2001).

Em seu ciclo biológico, são produzidos oocistos de parede espessa (cerca de 80 % do total de oocistos) que são eliminados nas fezes dos hospedeiros infectados; há um segundo tipo de oocisto, os de parede fina (20 % do total) que não são carregados pelas fezes, sendo responsáveis pela auto-infecção do hospedeiro, permanecendo no mesmo e aumentando o grau de infecção (KOSEK et al., 2001).

A dose mínima infectante é considerada relativamente baixa: de 9 a 1.042 oocistos, de acordo com a cepa. Inferências feitas a partir dos surtos sugerem que uma dose de 1 a 10 oocistos pode ser infectante para o hospedeiro imunocomprometido (KOSEK et al., 2001). Isso foi evidenciado a partir do estudo realizado durante o surto de Milwaukee, ocorrido em 1993, onde a concentração de oocistos era de 0,13 oocistos/L e mais de 403.000 pessoas foram infectadas (EISENBERG et al., 1998).

Atualmente, o gênero *Cryptosporidium* compreende 16 espécies descritas, diferenciando-se entre si pelo hospedeiro, local de infecção e tamanho dos oocistos (Tabela 1) (SMITH et al., 2005; SUNNOTEL et al., 2006).

Tabela 1: Espécies do gênero *Cryptosporidium*.

Espécies	Hospedeiro	Local	Tamanho (µm)
<i>C. andersoni</i>	Bovinos	Abomaso	5,5 × 7,4
<i>C. baileyi</i>	Aves	Cloaca, bursa e trato respiratório.	4,6 × 6,2
<i>C. canis</i>	Canídeos e humanos	Intestino delgado	5,0 × 4,7
<i>C. felis</i>	Felídeos e humanos	Intestino delgado	4,5 × 5,0
<i>C. galli</i>	Aves	Proventrículo	8,0-8,5 × 6,2-6,4
<i>C. hominis</i>	Humanos	Intestino delgado	4,5 × 5,5
<i>C. meleagridis</i>	Aves e humanos	Intestino	4,5-5,0 × 4,6-5,2
<i>C. molnari</i>	peixes	Estômago	4,7 × 4,5
<i>C. muris</i>	Humanos e roedores	Estômago	5,6 × 7,4
<i>C. parvum</i>	Humanos e ruminantes	Intestino	4,5 × 5,5
<i>C. saurophilum</i>	Serpentes e lagartos	Mucosas intestinal e da cloaca	4,2-5,2 × 4,4-5,6
<i>C. serpentis</i>	Serpentes e lagartos	Estômago	4,8-5,6 × 5,6-6,6
<i>C. suis</i>	Suíños e humanos	Intestino delgado	5,1 × 4,4
<i>C. wrairi</i>	Porquinho-da-Índia	Intestino delgado	4,0-5,0 × 4,8-5,6
<i>C. bovis</i>	Ruminantes	Intestino delgado	4,2-4,8 × 4,8-5,4
<i>C. scophthalmi</i>	Peixes	Intestino	3,0-4,7 × 3,7-5,0

Em 1997, Peng et al. relataram duas rotas de transmissão da criptosporidiose em humanos, 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. Assim, *C. parvum* não é uma única espécie, mas dois tipos relacionados (HUNTER, 2005), o que foi confirmado posteriormente com novas pesquisas (MORGAN et al., 1998; McLAUCHLIN et al., 1999; HOMAN et al., 1999; WIDMER et al., 1998).

Recentemente, Slapeta, 2006 (disponível on-line em 21/08/2006) propôs a denominação de "*C. pestis*" n. sp. para designar o genótipo bovino de *C. parvum*. Esta re-classificação foi criticada por Xiao et al. (2006), com fundamento nas regras do Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN) e nas resoluções que foram propostas durante o simpósio "A Taxonomia do Gênero *Cryptosporidium*", ou seja, para nomear uma nova espécie os seguintes requerimentos devem ser seguidos: 1. providenciar dados morfométricos dos oocistos; 2. providenciar caracterização genética com base em três indicadores genéticos distintos; 3. demonstrar especificidade de hospedeiro, em condições naturais e/ou experimentais e 4. cumprimento às regras do ICZN. Não atendendo a essas premissas, Xiao et al. (2006) consideram *C. pestis* n. sp. como inválido. Porém, como a controvérsia é uma característica na taxonomia de *Cryptosporidium*, a discussão continua e, Slapeta (2007) manteve a denominação de *C. pestis* para o genótipo bovino de *C. parvum*.

Por outro lado, Xiao et al. (2004) propõe que a denominação *C. parvum* seja referência apenas para designar o genótipo bovino desta espécie. Para outros genótipos do complexo *C. parvum*, seria colocado apenas o gênero *Cryptosporidium* seguido da genotipagem, ficando o conceito assim estabelecido:

Cryptosporidium genótipo cervino (e não mais *C. parvum* genótipo cervino) ou *Cryptosporidium* genótipo de macaco (e não *C. parvum* genótipo de macaco).

Hoje se sabe que existem subtipos o que pode levar à diferenciação de genótipos espécie-específicos e, futuramente, à descrição de novas espécies. Populações genéticas distintas de *C. parvum* podem emergir em um grupo de hospedeiros em um curto período de tempo. Isso pode ocorrer devido às possíveis mutações na fita de DNA durante o ciclo sexuado do protozoário, o que poderia explicar a detecção freqüente de genótipos hospedeiro-específicos e a existência de genótipo humano (*C. hominis*) geograficamente restrito (TANRIVERDI et al., 2006).

A criptosporidiose está diretamente ligada ao nível de imunidade do hospedeiro. Deu-se maior importância ao estudo do *Cryptosporidium* sp. a partir dos anos 80, com o advento da AIDS. Indivíduos portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) com células CD4 acima de 200 células/mm³ são capazes de eliminar a infecção, mas aqueles pacientes com menos de 100 células CD4/mm³ podem apresentar diarreia crônica, de severidade proporcional ao grau de imunocomprometimento e má absorção de nutrientes (WHITE e FLANIGAN, 2003). Além dos imunocomprometidos, a criptosporidiose ainda pode afetar crianças (0-5 anos), idosos, desnutridos, diabéticos, pessoas que fazem hemodiálise, quimioterapia ou que se submetem aos transplantes de órgãos ou terapia com corticosteróides.

Os sintomas da doença são variáveis de acordo com o estado imunológico do hospedeiro: diarreia aguda (5-19 dias) e auto-limitante que pode

se tornar profusa e de longa duração nos indivíduos imunocomprometidos. Também neste caso, a criptosporidiose pode evoluir para uma forma fulminante, com evacuações aquosas de 17-20 litros/dia (GRIFFITHS, 1998), desidratação aguda, além de implicações sintomáticas extra-intestinais, podendo atingir pulmões, esôfago, estômago, fígado, pâncreas, cólon, reto, dutos biliar e pancreático e até a conjuntiva do olho (FAYER, 1997). Apesar de a infecção apresentar característica secretória, estudos histopatológicos revelam atrofia nas vilosidades e infiltrado inflamatório na lâmina própria (KOSEK, 2001).

Drogas que foram promissoras para o tratamento da criptosporidiose, dependem do genótipo e a única droga que foi aprovada nos EUA, é utilizada para tratar somente crianças de 1 a 11 anos (ROSSIGNOL et al., 2001). Para adultos a eficácia e segurança do tratamento com nitazoxanida ainda não foi estabelecida (RAMIREZ et al., 2004).

Portanto, ainda não existe um tratamento totalmente eficaz para a criptosporidiose. Alguns fatores que contribuem para a falta de eficácia dos tratamentos para criptosporidiose são: 1- a localização única do parasito na célula hospedeira (na região da microvilosidade celular), o que afeta a concentração da droga; 2- falta de alvos específicos em nível molecular ou estrutural; 3- diferenças nos caminhos bioquímicos; 4- presença de proteínas de transporte ou “bombas” que transportam as drogas para fora do parasito ou para o citoplasma da célula hospedeira (MEAD, 2002).

Porém, a localização do parasito no hospedeiro é bastante específica, sendo seu nicho intracelular e extracitoplasmático. O espaço formado entre o

parasito e a membrana do hospedeiro é chamado de vacúolo parasitóforo, que modula o transporte de certas drogas fazendo com que elas entrem no citoplasma da célula do hospedeiro, mas não penetrem no parasito. Além disso, o protozoário sintetiza duas proteínas: a proteína chamada *multi-drug resistance* (MDR) e a proteína associada à MDR (MRP) que estão presentes na membrana do parasito e são responsáveis pela extrusão de drogas contra o gradiente de concentração (MEAD, 2002). A introdução da HAART (*Highly Active Anti-Retroviral Therapy*) resultou em uma diminuição de 60 % das infecções oportunistas em indivíduos com AIDS, mas não se sabe ao certo quanto tempo esses tratamentos efetivos vão persistir visto que a MDR e inibidores da protease poderão resultar em um re-aumento da carga viral (MEAD, 2002).

Cryptosporidium spp. é considerado hoje como o principal protozoário causador de diarreias em seres humanos, com distribuição mundial e prevalência de 5 % a 50 % (SUNNOTEL, et al., 2006; SAVIOLLI, 2006).

A primeira ocorrência de criptosporidiose reportada no ser humano ocorreu em 1976 (NIME et al., 1976; MEISEL et al., 1976). A partir de 1982, os diversos casos passaram a ser associados às pessoas imunocomprometidas e o número de indivíduos infectados começou a aumentar drasticamente com o avanço da AIDS (SOLO-GRABRIELE e NEUMEISTER, 1996).

De 1984 a 2002, 69 surtos de criptosporidiose causados por veiculação hídrica foram relatados nos EUA, afetando 436.232 pessoas. No mesmo período em países como Reino Unido, Canadá, Japão, Itália, Nova Zelândia, e Irlanda do Norte, foi registrado um total de 58 surtos e 38.284 casos desta protozoose. As

águas destinadas ao consumo humano foram responsáveis por 49,6 % de todas as ocorrências e aquelas utilizadas para recreação, por 50,4 % (OLIVEIRA, 2005).

Na Inglaterra e no País de Gales, no período entre 1992 e 2003, 89 surtos de veiculação hídrica foram relatados, afetando 4321 pessoas. Desses, 69 % envolvia infecção por *Cryptosporidium* (SMITH et al., 2006).

A baixa dose infectante, juntamente com as suas características de resistência aos tratamentos de água com cloro, hipoclorito de sódio e filtração, faz com que o *Cryptosporidium* seja uma ameaça às estações de tratamento de água. Tanto nos EUA quanto na Inglaterra, ocorreram outros surtos de criptosporidiose que foram relacionados com o abastecimento de água (GOLDSTEIN, 1996; RICHARDSON, 1991). Outras causas diversas como contaminação de águas superficiais ou poços artesianos por esgoto de origem humana, infiltração de água não tratada em poços e a utilização somente da etapa de cloração como tratamento, sem o procedimento de filtração geraram várias ocorrências de casos de criptosporidiose (SMITH, 1998).

O surto mais expressivo foi o de Milwaukee (EUA), que ocorreu em 1993, com um número estimado de 403.000 casos de criptosporidiose. A possível causa do surto foi a contaminação da água de consumo por resíduos de atividades agropecuárias e falhas no sistema operacional do tratamento da água (MACKENZIE et al., 1994). Mais tarde, descobriu-se que a contaminação era por *Cryptosporidium* genótipo 1 (PENG et al., 1997), hoje considerado como *Cryptosporidium hominis* (MORGAN-RYAN, 2002), com isso, comprovou-se o papel do esgoto de origem humana na alteração da qualidade da água bruta captada (PENG et al., 1997).

Mais recentemente, o esgoto de Milwaukee foi analisado mediante estudo genético da proteína GP60 KDa (ferramenta molecular que permite a detecção em nível de subgenótipo). De 179 amostras examinadas, 50 delas (27,9 %) continham 6 espécies diferentes de *Cryptosporidium*: *C.andersoni*, *C. muris*, *C. hominis*, *C. parvum*, *C.canis* e *C. felis*, além do genótipo de cervídeo (ZHOU et al., 2003; XIAO, 2001). Dentre essas espécies, o sub-genótipo de *C. hominis* observado, Ib, possui alta virulência e isso explica o grande número de pessoas que desenvolveram criptosporidiose neste surto e a longa duração da diarreia (até 19 dias, em imunocompetentes). O achado destas espécies de *Cryptosporidium* no esgoto durante um ano, demonstra que há uma transmissão estável da criptosporidiose, mesmo na ausência da ocorrência de um novo surto, em Milwaukee.

No Reino Unido, são diagnosticados 4.000 a 6.000 casos de criptosporidiose anualmente (TZIPORI, 1998).

No Brasil, a prevalência chegava a atingir 24,44 % dos portadores de AIDS na cidade de São Paulo há 19 anos (DIAS et al., 1988). Contudo, segundo o Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis, do Ministério da Saúde, esse valor diminuiu para 3,5 % nos 10 anos seguintes, em função do desenvolvimento de novas drogas para pacientes com positividade para o HIV (CAROLLO, 2006). Entretanto, provavelmente esta taxa ainda é subestimada, pois os laboratórios só realizam a pesquisa de *Cryptosporidium* quando há a requisição médica específica (SODRÉ e FRANCO, 2001; I Fórum de discussão do eixo São Paulo - Rio de Janeiro sobre a epidemiologia molecular de *Cryptosporidium*, 2006).

No ano de 2005, outras ocorrências no Brasil foram presentes em Ribeirão Preto (SP) e em São Paulo com casos registrados em crianças, abrangendo uma prevalência de 1,8 % entre os anos de 1994 - 1997 e, de 60 % a 80 %, respectivamente (MEDEIROS et al., 2001; COX et al., 2005). Um estudo recente, com crianças de creche, revelou uma positividade de 20,3 % em amostras de fezes (CARVALHO-ALMEIDA, 2006).

2.3 *Giardia* spp.

Mais de 50 espécies de *Giardia* foram descritas entre 1920 e 1930, com base nas características morfológicas. É um protozoário flagelado da classe Zoomastigophorea e ordem Diplomonadida.

É também freqüentemente encontrado em gado bovino, ovino, caprino, cães, gatos, várias espécies de mamíferos silvestres e aves (Tabela 2) (THOMPSON, 2004).

Tabela 2: Espécies do gênero *Giardia*.

Espécies	Hospedeiro	Tamanho do trofozoíto (μm)
<i>G. duodenalis</i>	Mamíferos domésticos e selvagens e humanos	12-15 $\times$ 6-8
<i>G. agilis</i>	Anfíbios	20-30 $\times$ 4-5
<i>G. muris</i>	Roedores	9-12 $\times$ 5-7
<i>G. ardeae</i>	Aves silvestres	$\sim$ 10 $\times$ $\sim$ 6,5
<i>G. microti</i>	Rato almiscarado e rato calunga	-
<i>G. psittaci</i>	Aves (psittacídeos)	$\sim$ 14 $\times$ $\sim$ 6

A sua forma de trofozoíto é elipsóide, piriforme e binucleada, com 4 pares de flagelos, medindo de 12 a 15 μm . Apresenta um disco ventral côncavo, um par de corpos medianos e axonemas (THOMPSON, 2004). O gênero *Giardia* se tornou um organismo chave para compreensão da evolução de células eucarióticas por possuir uma organização intracelular simples, sem mitocôndrias ou peroxissomos, mas contém um sistema secretório que tem sido proposto a ser um arquétipo do complexo de Golgi, existente em organismos superiores, porém, novos estudos relataram a presença de uma organela remanescente da mitocôndria, o mitossoma (LANFREDI-RANGEL et al., 1999; MARTI et al., 2003; TOVAR et al., 2003).

A sua forma cística tem um tamanho aproximado de 10-12 μm (ALI e HILL, 2003) e é responsável pela disseminação da infecção pela sua resistência a fatores ambientais. A parede cística da *Giardia* mede de 0,3 a 0,5 μm e possui dois componentes: uma camada filamentosa, composta por filamentos de diferente tamanhos (7-15 nm de diâmetro) e uma camada membranosa composta por uma membrana interna e outra externa (ERLANDSEN et al., 1989; ERLANDSEN et al., 1996). A parede filamentosa é composta por 43 % de carboidratos (em massa seca), sendo a maioria, 86 %, galactosamina e acredita-se que exista N-acetilgalactosamina (ERLANDSEN et al., 1996). Manning et al. (1992) reportaram a presença de 5 a 7 nmol de aminoácidos presentes em 10^6 cistos e relataram que é provável que os filamentos sejam compostos de um complexo de carboidratos e proteínas, mas é incerto afirmar a composição exata dos filamentos da parede cística.

A utilização de procedimentos baseados em PCR (*Polymerase Chain Reaction*) mostra que *G. duodenalis* não é uma espécie uniforme, mas um complexo de espécies compreendendo variedades genética e fenotipicamente distintas, ainda que genótipos similares morfologicamente exibam diferenças na especificidade de hospedeiro (THOMPSON, 2004).

Os genótipos foram discriminados e agrupados da seguinte forma: Grupo A, B, C, D, E, F e G. Em relação aos sub-grupos, o grupo A pode ser ramificado em: - A I (zoonótico) e - A II (exclusivamente humano) enquanto o Grupo B compreende outros dois sub-grupos: - B III (zoonótico) e - B IV (exclusivamente humano). Os demais grupos exibem especificidade de hospedeiro, sendo - C e D, específicos

de cães; - E, ocorrendo em gado bovino, ovelhas e porcos; - F de gato e - G de ratos domésticos (THOMPSON, 2004). O genótipo B é aparentemente o mais prevalente como mostram estudos realizados no Reino Unido, Austrália e Índia (AMAR et al., 2002; READ et al., 2001; TRAUB et al., 2004). Porém, não existem pesquisas em larga escala para determinar a distribuição, prevalência, sintomas clínicos e patogenicidade dos genótipos infectantes para o homem, em nível mundial (ALI e HILL, 2003; THOMPSON et al., 2004).

A dose infectante para *Giardia* é de 10 cistos ou menos (RENDTORFF, 1954) e os sintomas da giardiose são variáveis, compreendendo diarreia, desidratação, dores abdominais, perda de massa e em crianças pode interferir no desenvolvimento físico e cognitivo (THOMPSON, 2000).

O trofozoíto de *Giardia* possui um disco ventral com microtúbulos o que permite a sua adesão ao epitélio intestinal. As proteínas secretadas pelo cisto têm efeito direto na célula epitelial, causando alterações nas microvilosidades e na bordadura em escova, o que leva à má absorção de nutrientes (gorduras e vitamina B-12) no processo de digestão (LANE e LLOYD, 2002). A apoptose e a severidade da doença são reguladas por fatores de virulência ligados ao parasito e pelo estado nutricional e imunológico do hospedeiro. Deve ser levado em consideração também que o aumento da permeabilidade intestinal resulta em uma tomada de antígenos no lúmen, o que ocasiona reações alérgicas e fatores que podem gerar confusão quando determinando a etiologia de distúrbios nutricionais (THOMPSON, 2004).

A giardiose possui tratamento e as drogas mais comuns são nitroimidazol, benzimidazol, albendazol, secnidazol e nitazoxanida como bases do princípio ativo (BARR, 1998). O tratamento é eficaz na maioria dos casos, mas em geral, somente os indivíduos que exibem um quadro clínico sintomático são submetidos ao tratamento de modo que os portadores assintomáticos apresentam grande significado para a saúde pública por atuarem como fonte de cistos (THOMPSON, 2002).

A *Giardia* tem uma distribuição geográfica global, causando um número estimado de $2,8 \times 10^8$ casos por ano (LANE e LLOYD, 2002) e é o parasito intestinal mais comum em humanos. Na Ásia, África e América Latina, aproximadamente 200 milhões de pessoas têm giardiose sintomática e 500.000 novos casos são reportados a cada ano (THOMPSON, 2004).

O primeiro surto devidamente documentado de giardiose de origem hídrica foi em 1965, em Aspen, Colorado, EUA (CRAUN, 1990). De 1965 a 2002, ocorreram 148 relatos de surtos de giardiose por veiculação hídrica nos EUA, com 30 009 casos confirmados (OLIVEIRA, 2005).

No Brasil, um estudo realizado na cidade de São Paulo mostrou que crianças com menos de 5 anos de idade têm uma prevalência de 5,5 % (58/1044) para giardiose e ao fazer uma análise de estudos realizados nas décadas de 70, 80 e 90, os autores assinalam "...o decaimento da ocorrência dessa parasitose no decorrer desses períodos" (MUNIZ et al., 2002). Já Prado et al. (2003) encontraram uma prevalência maior, ao redor de 13,7 % (95/1156), em crianças de 2 a 5 anos, na cidade de Salvador, Bahia. E concluem que a giardiose pode

impedir o crescimento da criança mesmo quando a infecção é assintomática, supostamente, pela má absorção (PRADO et al., 2005). Ferreira et al. (2000), analisaram a tendência secular das parasitoses intestinais em crianças de São Paulo, comparando os anos de 1984 com 1996 e encontraram reduções expressivas na prevalência das parasitoses em geral de 30,9 % para 10,7 %. A taxa de giardiose, em especial, baixou de 14,5 % para 5,5 % e foi atribuída a melhorias na escolaridade materna e nas condições de moradia e saneamento.

Mesmo que esses estudos mostrem um declínio da giardiose, o MMWR (*Morbidity and Mortality Weekly Report*) exibe um aumento nos últimos anos, nos EUA. Durante o período de 1998 a 2002, o número total de casos reportados de giardiose decaiu de 24.226 em 1998, para 19.708 em 2001 e depois aumentou para 21.300 no ano de 2002 (CDC, 2005).

Um fator complicador da giardiose é a intermitência da eliminação de cistos nas fezes. Devido à variável dispersão dos organismos, há a necessidade de examinar no mínimo três amostras antes de liberar o diagnóstico. O ideal é que as amostras sejam coletadas com dois ou três dias de intervalos ou em três dias consecutivos. Mesmo assim, a série de três coletas pode dar resultados negativos e o paciente estar infectado. É importante que tanto o médico quanto o laboratorista reconheçam esse fato.

2.4 Helmintos

Os helmintos são uma preocupação para a saúde pública. Estima-se que 1,5 bilhões de pessoas são infectadas por *Ascaris lumbricoides*, 1,3 bilhões por

Ancylostoma duodenale e *Necator americanus* e 1 bilhão por *Trichuris trichiura*, mundialmente (CROMPTON, 1999).

Cento e trinta e três milhões de pessoas sofrem de infecções por alta carga parasitária de helmintos. As doenças diarreicas contam por si só, com uma estimativa de perda de 4,3 % de todo o peso das doenças globais (COFIE et al., 2006).

Esgotos contaminados com ovos de helmintos, bem como o lodo produzido pelas estações de tratamento de esgoto, contribuem para a transmissão dessas infecções por dispersar os ovos no ambiente. Para prevenir tal transmissão, a concentrações de ovos de helmintos no esgoto e no lodo, é regulamentada em vários países (NELSON e DARBY, 2001). No Brasil, a resolução CONAMA 375 de 2006, estabelece critérios e procedimentos para o uso, em áreas agrícolas, de lodo de esgoto gerado em estação de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados, visando benefícios à agricultura e evitando riscos à saúde pública e ao ambiente.

Ovos de helmintos são mais fáceis de serem detectados pelas ETE devido ao seu maior tamanho. Eles ficam retidos no processo de filtração. Apesar disso, possuem paredes resistentes. Ovos de *Ascaris* têm uma parede de multicamadas composta por lipídeos, proteína, quitina e mucopolissacarídeos. Podem persistir por longos períodos de tempo em ambientes tropicais e subtropicais (NITHIUTHAI, 2004). O esgoto se torna contaminado com ovos dessas espécies contribuindo para a transmissão de doenças e os seus estágios infectantes podem ser carregados pela água.

As doenças deste grupo relacionadas com a transmissão por águas contaminadas com fezes são: cisticercose, ascaridiose e hidatidose.

Jiménez-Cisneros et al., 2001 encontraram uma concentração de 23-27 ovos de helmintos por litro em uma amostra de esgoto doméstico bruto, no México. No Brasil, na cidade de Curitiba, foram encontrados ovos de helmintos, em esgoto bruto, com concentrações de 85 % de *Ascaris*, 5,5 % de *Toxocara*, 4,5 % de *Trichuris*, 4,7 % de *Hymenolepis* spp. e 0,4 % de *Taenia* spp (PAULINO et al., 2001). A infecção por *Ascaris* é bastante elevada mundialmente. Na China, por exemplo, há uma estimativa de que 532 milhões de pessoas estejam contaminadas com esse helminto (PENG et al., 1998).

2.5 Protozoários no ambiente

A veiculação hídrica tem se tornado um assunto de extrema importância em saúde pública, visto que os patógenos são fácil e rapidamente disseminados dessa forma. Essa veiculação pode transportar os estágios infectantes para águas: de abastecimento, de recreação, marinhas e de irrigação, o que pode contribuir para contaminar os alimentos (SLIFKO, 2000). Dessa forma, o potencial para atingir um grande número de indivíduos susceptíveis é enorme o que torna o controle das doenças de veiculação hídrica um desafio.

Na Inglaterra e País de Gales, entre os anos de 1992 e 2003, ocorreram 89 surtos de veiculação hídrica cuja causa variou entre águas de abastecimento público (27 %), águas de abastecimento privado (28 %), águas de recreação (39 %), entre outros (SMITH et al., 2006).

Surtos causados por protozoários são mais comuns do que aqueles causados por helmintos devido ao tamanho pequeno das formas de resistência dos protozoários.

Dentre eles, *Entamoeba*, *Giardia*, *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, *Toxoplasma*, *Balantidium* e *Blastocystis* são alguns que podem ser listados (KARANIS et al., 2007). Eles estão presentes em fontes de água não tratadas devidamente ou em alimentos contaminados. *Cryptosporidium* e *Giardia* se tornaram patógenos de veiculação hídrica significativos por serem autóctones de muitos animais, pelas altas densidades de concentração ambiental e pela sua alta resistência aos desinfetantes comumente utilizados em estações de tratamento. Isso mostra a grande contribuição que o esgoto tem na disseminação desses patógenos (RUECKER, 2005). Cistos de *Giardia* podem sobreviver por 24 dias a uma temperatura de 20°C, já oocistos de *Cryptosporidium* permanecem no ambiente por mais de 6 meses (GAJADHAR e ALLEN 2004).

Na Noruega, Robertson et al. (2006) relataram a ocorrência de 80 % de *Cryptosporidium* e 93% de *Giardia* em esgoto bruto, assumindo que giardiose é mais prevalente. No Paquistão, um estudo mostrou 67,2 % de prevalência de giardiose em fazendeiros expostos ao esgoto não tratado (1.145/1.704). Desses, apenas 3,7 % apresentavam quadro de diarreia, indicando que a maioria das infecções detectadas era assintomática (EINSINK et al., 2006). Outro estudo relata a presença de *Blastocystis* em efluente de ETE na Escócia e na Malásia indicando que a estação não estava removendo completamente os cistos (SURESH, 2005).

No Brasil, estudos têm sido aprimorados registrando a ocorrência desses protozoários em águas de rios, em fontes de água ditas “potáveis” em efluentes de

ETE e em águas marinhas. Santos et al. (2004) encontraram uma prevalência de 100 % para *Giardia* com uma concentração média de $5,8 \times 10^5$ e 25,0 % para *Cryptosporidium* com $1,0 \times 10^4$ oocistos, em efluente de uma ETE, em Campinas, SP. Um outro estudo na mesma cidade, foi realizado com amostras de água do Rio Atibaia e nele foi encontrado 52 % de positividade para *Giardia* com 25,1 cistos/L. Após a descarga do Ribeirão Pinheiros que, por sua vez, recebe esgoto de municípios vizinhos, esse valor aumentou para 76 %, em uma concentração de 64,1 cistos/L (OLIVEIRA, 2005).

Um estudo feito com águas minerais naturais de nascentes distribuídas pela cidade de Campos do Jordão, revela que 13 das 22 fontes analisadas apresentam um padrão de qualidade impróprio para o consumo humano, com a presença de pelo menos um dos protozoários patogênicos analisados (*Cryptosporidium* ou *Giardia*) em 25 % das fontes estudadas (BRANCO, 2006). Neste município, a taxa de tratamento de esgoto é zero, o que aumenta as chances de contaminação das fontes de água.

Um dos aspectos epidemiológicos de grande relevância em saúde pública que emergiu em anos recentes, é o fato de que os cistos e oocistos que são liberados nas fezes de animais contaminados, em grande número, podem ser carregados da superfície da terra para rios e estuários das proximidades e eventualmente, chegar às águas marinhas. Isso tem sido comprovado por estudos realizados com animais marinhos que vão desde moluscos filtradores (ostras, mexilhões) até mamíferos (leões marinhos e focas) (FAYER, 2004), demonstrando que as águas marinhas estão sendo atingidas pelos esgotos com alto grau de contaminação e pela drenagem de fezes de animais. Um aspecto que merece ser

estudado é a contribuição dos pequenos caminhos d'água que chegam às praias, muitas vezes compostos por esgoto doméstico (GERBA e SMITH JR, 2005), para a contaminação da água do mar.

Por serem ingeridos crus, os moluscos marinhos filtradores como ostra, berbigão e mexilhão estão susceptíveis a receber essa contaminação e transmitir ao ser humano. Gómez-Couso et al. (2003) encontraram 34 % de amostras positivas para *Cryptosporidium* em moluscos como esses.

Os trabalhos sobre tratamentos de esgoto hospitalar abordam análises de eficiência de remoção geralmente para bactérias (coliformes fecais, estreptococos fecais, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella* sp.), pois esses organismos têm fácil reprodução em meios de cultura. Por outro lado, as bactérias são microrganismos menos resistentes e são inativados rapidamente em relação aos cistos e oocistos de protozoários (TSAI, 1998).

As taxas de remoção variam de 3 log em tratamento aeróbico (CHITNIS, 2004) a 98,5 % para coliformes fecais e 99,5 % para *Pseudomonas aeruginosa* com tratamento com hipoclorito (TSAI, 1999).

O uso do grupo coliformes como um indicador da possível presença de patógenos entéricos em sistemas aquáticos tem sido assunto de debate. Coliformes totais não são exclusivamente de origem fecal; já os termotolerantes, por exemplo, *Escherichia coli*, estão presentes na flora intestinal de animais de sangue quente, portanto a sua presença em águas é indicativa de contaminação fecal (ROMPRÉ et al., 2002).

Em suma, as características dos protozoários parasitos são bem distintas dos grupos de bactérias indicadoras, pois além de ser de difícil cultivo *in vitro*, o

número de organismos presente no ambiente é menor. Daí a necessidade de métodos diferenciados e de maior sensibilidade para a detecção de cistos e oocistos (FRICKER e CRAB, 1998).

2.6 Métodos para detecção de *Cryptosporidium* e *Giardia* em amostras de esgoto.

A seleção dos métodos utilizados para detecção de *Cryptosporidium* e *Giardia* no ambiente deve priorizar o tipo de amostra em questão ou os objetivos do programa de amostragem. A precisão e sensibilidade do método, assim como os níveis de detalhamento requeridos, devem prescrever a seleção do procedimento mais adequado para a aplicação solicitada (BELLAMY, 2004).

Os métodos utilizados para amostras de água não são aplicáveis para esgoto, pois este possui um alto teor de gorduras e partículas em suspensão. De um modo geral, os métodos hoje existentes para esgoto foram adaptados da parasitologia clínica e daqueles utilizados para detecção desses protozoários em amostras hídricas (McCUIN e CLANCY, 2005).

Os métodos para detecção e identificação de *Cryptosporidium* e *Giardia* em amostras ambientais geralmente consistem em três etapas: (1) amostragem e concentração, (2) purificação ou separação do organismo-alvo das outras partículas também presentes na amostra, (3) a visualização, confirmação e enumeração dos organismos (FRICKER e CRABB, 1998).

2.6.1 Concentração

Para a primeira etapa, a concentração de *Cryptosporidium* e *Giardia* em águas de esgoto, os seguintes procedimentos podem ser utilizados:

2.6.1.1 Centrífugo-concentração, um método simples, fácil e de baixo custo (ROBERTSON et al., 2000). Utilizado para pequenos volumes de amostras, tem uma boa taxa de recuperação e pode ser aplicado com velocidades variáveis. Para *Cryptosporidium* e *Giardia* utiliza-se 1050 x *g* por 10 minutos.

2.6.1.2 Floculação em CaCO₃ (carbonato de cálcio), método utilizado para volumes grandes, de 10L. Ele produz um grande precipitado que é dissolvido em ácido sulfâmico (VESEY et al., 1993a). É um método simples e robusto, porém reduz a infectividade do oocisto (SHEPHERD e WYN-JONES, 1996).

2.6.1.3 Filtração, que pode ser feita com aparatos distintos: membranas ou cápsulas de filtração (FiltaMax, Iddex® e Envirocheck, Gelman®). As membranas podem ser de ésteres mistos de celulose ou de nitrato de celulose, com porosidade nominal de 3 µm, mediante sucção com bomba a vácuo. É um método prático para amostras com baixa turbidez, pois, caso contrário, pode ocorrer a obstrução dos poros da membrana (FRANCO et al., 2001).

2.6.2 Purificação

Na segunda etapa, de purificação, podem ser empregados os protocolos:

2.6.2.1 Separação Imunomagnética (IMS) (BUCKHARI et al., 1998): Utiliza-se esferas paramagnéticas medindo 4,5 µm de diâmetro, ligadas à anticorpos

monoclonais específicos para *Cryptosporidium* e *Giardia*. Essas esferas têm a capacidade de realizar a captura dos cistos e/ou dos oocistos presentes na amostra. Posteriormente, eles são separados das sujidades inerentes à amostra por um ímã. A seguir, os complexos (esferas + anticorpos + cistos/oocistos) devem ser dissociados por processo ácido ou térmico. É um método eficiente, porém de alto custo.

2.6.2.2. Centrifugação em densidade de gradiente utilizando soluções de Sheather (sacarose), sulfato de zinco, entre outros. Os organismos alvo migram para a densidade que se iguale com a sua densidade específica. A vantagem é que causam pouco dano morfológico nos cistos e oocistos (ARROWOOD, 1997).

2.6.3 Visualização

Para a terceira etapa, a de visualização, têm-se os seguintes métodos:

2.6.3.1 Citometria de fluxo detecta o organismo-alvo pela morfometria (VESEY et al., 1993b). A amostra recebe anticorpos monoclonais anti-*Cryptosporidium* marcados com o corante fluorescente FITC (isotiocianato de fluoresceína) e posteriormente passa pelo sorteamento de células ativado.

2.6.3.2. RID (Reação de imunofluorescência direta) é o método mais utilizado para visualização de cistos e oocistos em amostras ambientais. Essa técnica usa anticorpos monoclonais marcados com o corante fluorogênico FITC. A visualização é confirmada comparando critérios pré-estabelecidos como forma,

tamanho, fluorescência e presença de axonemas (cistos) e sutura (oocistos) (GARCIA et al., 1987).

2.7 Métodos para medida de infectividade

O conceito de infectividade é a capacidade que o parasito tem de completar o seu ciclo de vida em um hospedeiro susceptível, com a produção e eliminação de novas formas de resistência nas fezes. Existem vários métodos de medida de inativação para *Cryptosporidium* e *Giardia* descritos na literatura, porém, somente os testes de infectividade animal (nos casos de *Giardia* sp. e *Cryptosporidium* sp.) (JENKINS et al, 2003) e cultivo celular (no caso de *Cryptosporidium* sp.) (CHOI et al., 2004) são capazes de oferecer resultados confiáveis (FINCH e BELOSEVIC, 2002).

Assim, o uso de corantes fluorogênicos vitais como DAPI, SYTO-9, SYTO-59 e *hexadium* (BELOSEVIC et al., 1997) e os testes de excitação não devem ser empregados quando o objetivo for a avaliação de infectividade. É importante ressaltar que não há correlação estatística entre os testes de infectividade e os de coloração vital ou excitação (USEPA, 2006; SMITH et al., 2002; FINCH e BELOSEVIC, 2002).

2.7.1 Cultivo celular: Incubação de células hospedeiras (existem várias linhagens de células disponíveis nos bancos de célula) com antibióticos e suplementos à 37°C, umidificado e com atmosfera de CO₂. Faz-se a inoculação dos parasitos excistados e analisa-se, posteriormente, a porcentagem de células

infectadas e nas quais é possível observar o foco de desenvolvimento parasitário (CHOI et al., 2004; SLIFKO et al., 1997). Ainda são necessários estudos mais profundos, pois existem falhas neste método: não se sabe ao certo se todos os genótipos de *Cryptosporidium* são sensíveis, cada linhagem celular reage de uma forma diferente à infecção e existe variação entre as combinações de meios de cultivo, temperatura e tempo de incubação (CLANCY et al., 2000).

2.7.2 A Infectividade animal é um método de referência tanto para *Cryptosporidium* quanto para *Giardia* (FINCH e BELOSEVIC, 2002). Ele compreende a inoculação intragástrica de cisto e oocistos em camundongos com linhagem Balb/C nude, para *Giardia* ou gama-knockout, para *Cryptosporidium*. Após 7 dias são feitas análises de fezes dos animais e cortes histológicos do intestino delgado para avaliação da presença de trofozoítos. Não existe correlação entre os testes de coloração e infectividade (NEUMANN et al., 2000).

O RT-PCR (*Reverse Transcriptase of Polymerase Chain Reaction*) (XIAO et al., 2000) é um método que não é aplicável quando o objetivo é a infectividade, pois a fita de DNA pode estar presente mesmo se o organismo estiver inviável/morto. Essa técnica compreende a purificação do RNA, amplificação, eletroforese em gel de poliacrilamida, coloração em brometo de etídio, visualização em UV (JENKINS et al., 2003). Ela é baseada no princípio de que somente organismos vivos efetuam a transcrição para formar RNAm, mas já foi demonstrado que cistos de *Giardia* em processo de morte celular por aquecimento (*heat killing*) produzem RNAm detectável por RT-PCR (GASSER e O'DONOGHUE, 1999). Por ser bastante sensível, deve-se tomar extremo cuidado

com contaminação da amostra (resultados falso-positivos). Então é fundamental minimizar a contaminação cruzada, realizar controles e duplicatas e validar o sistema de primers. Os primers utilizados para *Cryptosporidium* são os genes 18S do RNA ribossomal, GP60, β -tubulina, Hsp70, microsátélites e proteínas da parede do oocisto e para *Giardia* são β -giardina, 16S rDNA e isomerase triose fosfato (CACCIÓ et al., 2002; TANRIVERDI et al., 2006; FELTUS et al., 2006).

Outra possibilidade para avaliação morfoestrutural dos cistos e oocistos, com a finalidade de avaliar a eficiência de algum processo de tratamento, reside na cuidadosa análise morfológica, seja por microscopia ótica ou eletrônica de varredura e de transição (WIDMER et al., 2002). Imunofluorescência sugere dano aos epítomos através, por exemplo, da diminuição da fluorescência característica. A MEV (microscopia eletrônica de varredura) é uma ferramenta que permite confirmar os danos aos protozoários, sobretudo em nível de sua superfície (WIDMER et al., 2002; BRASSEUR et al., 1998; McGUIGAN et al., 2006). Com isso, a MEV traz maior resolução quando o intuito é observar características morfológicas e da superfície da parede celular.

Os cistos de *G. duodenalis* possuem uma superfície com textura lisa (TOMBES et al., 1979). Assim, a MEV é uma ferramenta útil quando o interesse é avaliar a eficiência de certos tratamentos de águas contaminadas. Alguns exemplos extraídos da literatura podem ser citados: McGuigan et al. (2006) mostraram a eficiência da desinfecção solar (*Solar Disinfection: SODIS*) para *Cryptosporidium* e *Giardia* presentes em água potável e posteriormente os analisaram por excitação, infectividade animal, DAPI e MEV. Widmer et al. (2002)

estudaram a estrutura de *Giardia lamblia* expostas ao ozônio, mostrando resultados perante análise morfológica, com MEV, comprovando que o ozônio penetra no cisto e degrada a maioria das proteínas da parede cística. Brasseur et al. (1998) testaram dois tipos de oxidantes (permanganato de potássio e hipoclorito de sódio) em oocistos de *Cryptosporidium* e verificaram aspectos morfológicos após tratamento. Apresentaram granulações, fendas e irregularidades na superfície, sugerindo um dano morfológico na parede do oocisto, com a presença desses desinfetantes.

2.8 Tecnologia Eletroquímica

A tecnologia eletroquímica oferece um meio eficiente de controle da poluição hídrica por meio de reações redox, seja através das reações diretas entre as espécies poluentes e as superfícies eletródicas, ou do sinergismo desses processos com a eletrogeração “*in situ*” de espécies oxidantes. Inclusive ela pode ser uma forma eficiente e versátil de controle da poluição hídrica, modificando, degradando ou mineralizando compostos orgânicos através de processos onde o único reagente envolvido é o elétron. Além disso, atua como um poderoso inativador de microrganismos patogênicos.

Segundo Pelegrini et al. (2001), o revestimento de óxidos metálicos, mais adequado para a oxidação de compostos orgânicos, é um anodo do tipo DSA[®] (Dimensionally Stable Anode) de Ti / TiO₂ – RuO₂ na proporção de 70-30 mol %. O TiO₂ é um recurso promissor de radicais hidroxilas na desinfecção de água (CURTIS et al., 2002). Essa composição apresenta várias vantagens tais como:

boa resistência mecânica, estabilidade química em uma ampla faixa de pH, relação custo-benefício positiva e a possibilidade de ativação por luz ultravioleta.

A oxidação eletroquímica pode ocorrer por troca direta de elétrons entre os compostos orgânicos e a superfície do eletrodo ou, de forma direta, pela intermediação de espécies eletroativas oxidantes formadas no anodo (COMNINELLIS e PLATTNER, 1988; FÓTI et al., 1997). Esse processo eletroquímico de oxidação anódica envolve a formação de radicais hidroxilas ($\text{OH}\cdot$), espécie intermediária da reação de evolução de oxigênio, que adsorve fisicamente na superfície do eletrodo.

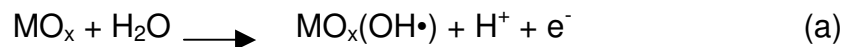
Quando a eletrólise é conduzida a potenciais tais que a evolução de oxigênio ocorra de forma simultânea, a oxidação indireta parece ser o principal processo de transferência de átomos de oxigênio para o material a ser oxidado (SAVALL, 1995). Na superfície de anodos revestidos com óxidos metálicos (MO_x), estes sítios ativos oxidantes podem se transformar em óxidos superiores, quimicamente adsorvidos, do tipo MO_{x+1} . Ambas as espécies são responsáveis pela oxidação de compostos orgânicos (COMNINELLIS e PLATTNER, 1998; SAVALL, 1995; FÓTI et al., 1997; CORREA-LOZANO et al., 1997).

O uso dos eletrodos de óxido na oxidação eletroquímica de compostos orgânicos permite ainda que a eletrólise possa ser assistida pela fotocatalise heterogênea quando a superfície do eletrodo apresenta fotoatividade (PELEGRINI et al., 1999; PELEGRINI et al., 2000; PELEGRINI et al., 2001). O processo eletroquímico foto-assistido, também chamado de fotoeletroquímico (PELEGRINI et al., 2000; PELEGRINI et al., 2001; ZIOLLI e JARDIM, 1998), consiste na

percolação da solução a ser tratada através de um reator eletrolítico onde o anodo, revestido de óxidos metálicos, permanece sob a incidência da radiação ultravioleta (UV). Essa combinação de processos tem mostrado um efeito sinérgico, onde as velocidades de degradação observadas são até uma ordem de grandeza maior, quando comparadas com a soma daquelas resultantes da aplicação dos processos individuais (PELEGRINI et al., 2001).

A radiação UV atua diretamente nos pares de bases do DNA do microrganismo, gerando dímeros de pirimidina formados entre moléculas adjacentes de pirimidina do mesmo elemento de DNA, podendo interromper tanto a transcrição quanto a replicação e bloquear o processo reprodutivo dos mesmos (LINDENAUER e DARBY, 1994). O comprimento de onda de maior eficiência germicida é de aproximadamente 254 nm (SOBOTKA, 1993). Porém, muitos microrganismos são capazes de repararem os efeitos dos danos causados pela luz UV é o chamado mecanismo de fotoreparação. Entretanto, apesar da presença de genes de reparo nos cistos e oocistos de *Giardia* e *Cryptosporidium*, não é o suficiente para que haja reprodução do organismo, não havendo a replicação do DNA, futuramente; pode ocorrer o reparo de pequenos danos, dependendo da magnitude da dose de UV recebida (ROCHELLE, 2004).

Na Figura 1 (A) são apresentas, de forma esquemática, as possíveis reações envolvidas na formação de radical hidroxila no processo fotoeletroquímico, onde a discussão é restrita ao meio ácido (PELEGRINI et al., 2001; BERTAZZOLI e PELEGRINI, 2002). Na eletrólise, a descarga das moléculas de água na superfície do anodo de óxido metálico, MO_x forma radicais hidroxila, de acordo com a equação (a):



Paralelamente, a incidência de radiação com energia $h\nu$, sobre o revestimento de óxido, promove elétrons da banda de valência para a banda de condução, propiciando a separação de cargas conforme a reação (b):



Sendo que h^+ representa uma lacuna que possibilita a descarga anódica da água, de acordo com o processo (c):



As reações (a) e (c) mostram que, no processo fotoeletroquímico, a formação de radicais hidroxilas ocorre de forma aditiva, o que explica as altas velocidades de degradação da matéria orgânica.

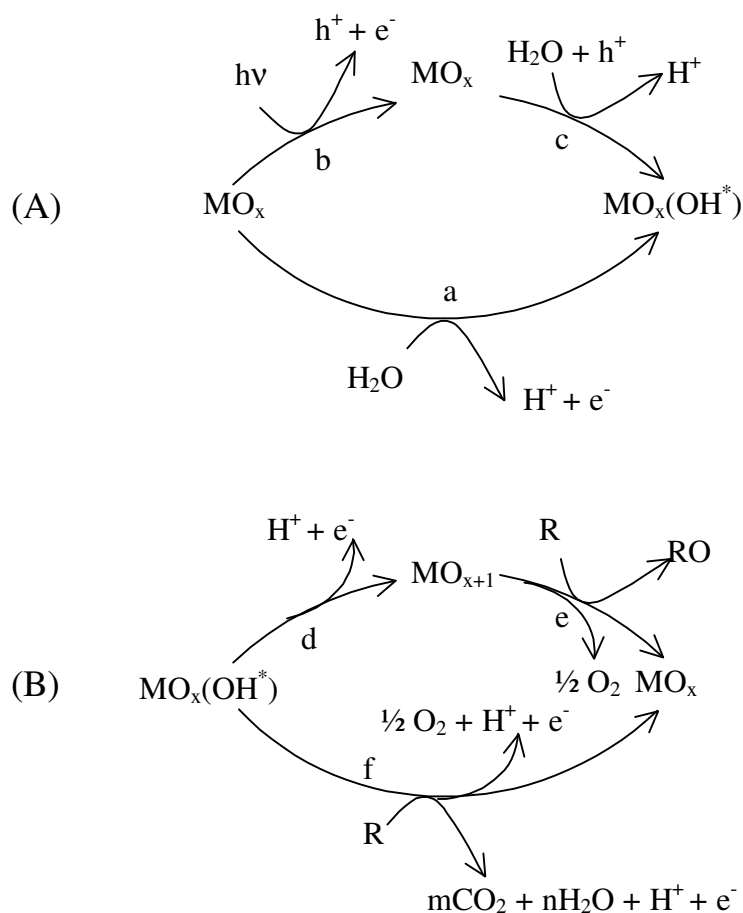
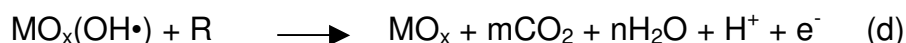
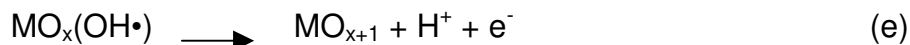


Figura 1. (A) Mecanismo de formação do radical hidroxila na superfície de anodos dimensionalmente estáveis: via descarga anódica da água (reação a); via descarga fotoeletroquímica da água (reações b-c); (B) Mecanismo de oxidação de orgânicos pelo radical hidroxila: via formação de óxidos superiores (reações d-e); via combustão direta (reação f) (BERTAZZOLI e PELEGRINI, 2002).

A partir da formação dos radicais hidroxilas, a oxidação de compostos ocorre por meio dos mecanismos discutidos na literatura (FÓTI et al., 1997), sendo que duas rotas são possíveis: combustão direta e oxidação gradativa. A figura 1 (B) mostra que os radicais hidroxilas podem oxidar diretamente os compostos orgânicos (R):



ou transformar-se em óxidos superiores que promovem a oxidação gradativa:



Conforme a figura 1 (B), a evolução de oxigênio concorre com os processos (e) e (f).

Atualmente, esse processo está sendo utilizado em diversas áreas de fabricação e está em crescente uso na área ambiental, representando formas alternativas de tratamento. A gama de aplicabilidade é grande, sendo possível remediar diversos tipos de efluentes de diferentes origens, tais como efluentes têxteis, de refinaria de petróleo, de indústria de papel e celulose, de indústria farmacêutica, chorume de lixo, entre outros (LIN e PENG, 1994; BIDOIA, 1998; NAUMCZYK, 1996; LANZA e BERTAZZOLI, 2002; MORAES e BERTAZZOLI, 2005; OSUGI et al., 2006).

Soluções contendo suspensões com microrganismos foram analisadas empregando-se o tratamento eletroquímico. Aproximadamente 40 espécies de microrganismos entre bactérias, vírus e algas podem ser efetivamente destruídos por tratamento eletroquímico (STONER et al., 1982; MATSUNAGA et al., 1984). Dentre elas estão os coliformes fecais, *Saccharomyces cerevisiae* e degradação de compostos xenobióticos pela bactéria *Enterobacter dissolvens* mediante o processo eletroquímico (PATERMARAKIS e FOUNTOUKIDIS 1990; SHE et al., 2006; LIANG et al., 2005; GUILLOU et al., 2003).

Quando potenciais são aplicados em células pode haver a destruição da membrana citoplasmática ou simplesmente aumentar a permeabilidade e diminuir a seletividade, fenômeno denominado eletroporação. A eletroporação pode ser reversível ou irreversível. Quando irreversível, há formação de rupturas na membrana, levando à morte da célula. Na eletroporação reversível, o rompimento da membrana celular é ínfimo e a permeabilidade da membrana é muito maior (LUBICK e JAYARAM, 1997; LEE e TAI, 1990).

A quantificação da viabilidade microbiana, em função do tempo de tratamento, mostrou que o processo eletroquímico permite a desinfecção e a esterilização de águas contaminadas (MAZZO et al., 2006; LANZA e BERTAZZOLI, 2002). O mecanismo proposto está relacionado à formação de espécies oxidantes, particularmente radicais hidroxila, na superfície do anodo de óxido.

A influência crescente de fatores como a globalização, a tecnologia moderna e as mudanças climáticas aumentou drasticamente as preocupações com surtos de doenças de veiculação hídrica causadas por parasitos. O clima

influencia no transporte e na disseminação de agentes infecciosos com o aumento da precipitação e da drenagem hídrica, além do efeito da temperatura na sobrevivência e replicação do patógeno. Pouca atenção com relação ao aquecimento global tem sido dada aos protozoários entéricos (vírus, bactérias e protozoários) como, por exemplo, a ocorrência de danos à lagoa de estabilização de esgoto, após inundação no Alaska, colocando a comunidade em risco de aquisição de *Salmonella*, *Shigella*, *Giardia* e *Cryptosporidium* (PARKINSON e BUTLER, 2005).

Assim, o gerador de dejetos deve estar envolvido na busca de soluções, refletindo sobre as questões relevantes da atualidade, o seu papel na sociedade e nas relações de respeito com o meio ambiente e com a humanidade. Há então uma necessidade de tratamento de esgotos hospitalares do ponto de vista da saúde pública, visto que esses são muitas vezes liberados diretamente em mananciais, poluindo o meio ambiente e atuando como disseminador de patógenos.

Dentre esses patógenos, *Cryptosporidium* sp. e *Giardia* sp. têm uma grande relevância considerando-se que a criptosporidiose já foi relatada em 90 países e seis continentes (FAYER et al., 2000).

O efluente hospitalar atua como fonte de contaminação uma vez que nele se concentra os dejetos dos indivíduos doentes que expressam morbidade variável. Para *Cryptosporidium* spp., por exemplo, são eliminados nas fezes de 10^9 a 10^{11} oocistos/semana (FAYER, 2004). A *Giardia* sp. tem uma distribuição geográfica global causando um número estimado de $2,8 \times 10^8$ casos por ano

(LANE E LLOYD, 2002) e é o parasito intestinal mais comum em humanos de países desenvolvidos.

No caso do presente estudo, frente aos resultados obtidos referentes à destruição de bactérias heterotróficas, coliformes fecais e estreptococos fecais após 10 minutos de exposição ao processo fotoeletroquímico (Projeto FAPESP)¹ tornou-se interessante avaliar a ação desse tratamento sobre os protozoários *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp.

¹ FAPESP, Projeto PIPE nº 02/02196-5, intitulado: Utilização da tecnologia fotoeletroquímica na inativação de organismos patogênicos em efluentes hospitalares, 2002.

3. OBJETIVOS

Objetivo Principal:

O objetivo do presente trabalho é avaliar a ação do processo fotoeletroquímico sobre cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp em amostras de efluente hospitalar, proveniente do Hospital das Clínicas da UNICAMP, Campinas, SP, visando a possível destruição destes patógenos.

Objetivos específicos:

1. Verificar a ocorrência de *Cryptosporidium* spp e *Giardia* spp, em amostras de esgoto de origem hospitalar (efluente) utilizando o método de centrífugo-concentração seguido de clarificação com éter e visualização por imunofluorescência direta, durante o período de um ano para avaliar a possível variação sazonal desses patógenos;
2. Avaliar a ocorrência de dano morfológico em cistos e oocistos presentes em amostras do efluente artificialmente contaminadas, quando submetidas às condições de tratamento fotoeletroquímico com tempo de exposição ao reator de 0, 30, 60 e 90 minutos (experimento em escala piloto);
3. Verificar a presença de ovos e larvas de helmintos no esgoto hospitalar empregando a técnica da NOM (Norma Oficial Mexicana).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de estudo e amostras colhidas

O efluente hospitalar a ser tratado pelo processo fotoeletroquímico, foi colhido no Hospital de Clínicas da Unicamp, Campinas, SP. O critério de escolha da amostra foi a alta taxa de patógenos liberados neste tipo de efluente. O ponto de coleta abrange aproximadamente 50 % do volume total do efluente do hospital, incluindo o do Centro de Moléstias Infecciosas.

O volume de 5 mL de amostra foi coletado em recipientes de plástico previamente descontaminados e tratados com solução de eluição contendo Tween 80 a 0,1 %, com auxílio de um pote coletor e funil. As coletas foram realizadas durante um ano (de agosto de 2005 à julho de 2006), quinzenalmente, no período matutino (entre 8:30 h e 9:30 h), em função do maior fluxo de efluente liberado, sempre no mesmo ponto da caixa coletora localizada próximo ao laboratório de protótipos da Faculdade de Engenharia Civil (fig.2). Logo em seguida a amostra era levada ao laboratório em caixa de isopor refrigerada com gelo para realização das análises.



Figura 2: Caixa coletora do efluente do Hospital de Clínicas da Unicamp.

4.2 Ocorrência natural de *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. e ovos de helmintos no efluente hospitalar.

No Laboratório de Protozoologia do Departamento de Parasitologia, do Instituto de Biologia da Unicamp, foram feitas análises parasitológicas para verificar a ocorrência e quantificar o número dos organismos em questão, eventualmente presentes nas amostras de esgoto hospitalar bruto.

4.2.1 Detecção dos protozoários parasitos

Para a detecção de parasitos nas amostras de esgoto bruto, empregou-se a metodologia de centrífugo-concentração seguida de clarificação com éter e, posteriormente, a visualização e enumeração de organismos foram efetuadas mediante a reação de imunofluorescência direta (RID), utilizando microscopia de epifluorescência e de contraste de fase (SANTOS et al., 2004).

4.2.1.1 Centrífugo-concentração seguida de clarificação com éter.

Nesse procedimento, as amostras coletadas foram submetidas ao processo de centrifugação com solução de eluição (contendo Tween 80 a 0,1 %). Em tubos de centrífuga de 15 mL, foi colocada uma alíquota de 5 mL da amostra, completados com solução de eluição (na proporção de 1:3). Em seguida, procedeu-se à centrifugação a $1500 \times g$, por 15 minutos. O sobrenadante foi retirado e o processo de centrifugação foi novamente repetido com água destilada.

Após o descarte do sobrenadante, ao sedimento resultante foram adicionados 5 ml de éter etílico previamente refrigerado com gelo, sendo em seguida, o tubo tampado com rolha plástica e agitado manual e vigorosamente por 30 segundos. O volume do tubo foi completado com água destilada e novamente centrifugado na mesma velocidade e tempo. Finalmente, o sedimento resultante foi ressuspenso até 1 mL, com água destilada, homogeneizado em vórtex e transferido para um tubo de microcentrífuga (SANTOS et al., 2004). Posteriormente, uma alíquota de 5 μ L do sedimento foi analisada por imunofluorescência direta após homogeneização completa no vórtex, durante dois minutos e inversão do tubo três vezes (MASSANET-NICOLAU, 2003; BONATTI et al., 2007).

4.2.1.2 Visualização e quantificação por meio da reação de imunofluorescência direta (RID).

As diversas alíquotas de 5 µL dos sedimentos resultantes após a centrífugo-concentração, foram analisadas empregando-se a reação de imunofluorescência direta (RID) com anticorpos monoclonais conjugados com o fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC-MAb) para a detecção de cistos e oocistos, utilizando o Kit Merifluor[®] para *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. (Meridian Bioscience Diagnostics, Cincinnati, Ohio) (CLANCY et al., 1999). O microscópio utilizado foi de imunofluorescência (Nikon 50i), com filtro de excitação na faixa de 450-490 nm e filtro de barreira, de 520 nm.

Na etapa de visualização, consideraram-se como critérios os seguintes parâmetros (USEPA, 2006):

- Fluorescência: verde-maçã brilhante, sendo mais intensa na parede do organismo formando um anel;
- Tamanho: de 8 a 15 µm para *Giardia* e de 3,0 a 8,5 µm para *Cryptosporidium*;
- Formato: de ovóide a esférico;
- Presença de axonemas em *Giardia* e sutura em *Cryptosporidium*;
- Na microscopia de contraste de fase (MCF): presença de corpos medianos, axonemas e número de núcleos em *Giardia* e presença de até 4 esporozoítos em *Cryptosporidium*. Pelo menos duas dessas estruturas devem ser observadas para confirmação no contraste de fase.

Para a estimativa do número de cistos e oocistos presentes em um litro de efluente, nas diversas preparações, considerou-se a seguinte equação (g):

$$X = \frac{n}{k} \times \frac{S}{A} \quad (g)$$

sendo,

X = concentração de oocistos ou cistos /L

n = número de oocistos ou cistos visualizados na lâmina

k = 5 (vol. de sedimento examinado = 5 µl)

S = volume do sedimento obtido (µl)

A = volume filtrado da amostra (L)

A coloração com DAPI tem sido muito discutida como utilização de teste de viabilidade (CLANCY et al., 2000). Ultimamente, esta técnica está sendo utilizada apenas como teste confirmatório para presença de *Cryptosporidium* e *Giardia*. Neste experimento, optou-se por não utilizar o DAPI, pois Chauret et al. (1999) afirmam que, quando o mesmo é empregado e as amostras contêm um grande número de partículas, podem ocorrer dificuldades na visualização e interferências na fluorescência do fundo.

4.2.2 Avaliação da Sensibilidade da metodologia de centrífugo-concentração e clarificação com éter (experimento–controle positivo).

Com a finalidade de avaliar a sensibilidade da metodologia de detecção dos protozoários neste estudo, foram realizados experimentos controle-positivo ($n = 3$). Para tanto, um litro do efluente foi contaminado artificialmente com uma

suspensão controle positivo (que acompanha o kit de RID), contendo um número conhecido de cistos e oocistos, previamente determinados mediante enumeração direta empregando a RID, sendo considerado o valor médio da contagem de oocistos presentes em três poços da lâmina de imunofluorescência. Após a inoculação de parasitos, as amostras foram processadas seguindo a metodologia utilizada para as amostras naturais (centrífugo-concentração e clarificação com éter). Em seguida, alíquotas de 5 µl do sedimento resultante do processamento foram examinadas por meio da RID.

Para estimar a porcentagem de recuperação de organismos, nos ensaios controle-positivos, foi utilizada a seguinte fórmula (h):

$$Y = \frac{r}{i} \times 100 \quad (h)$$

sendo,

Y = eficiência de recuperação

r = número de cistos e oocistos recuperados

i = número de cistos e oocistos inoculados

O limite mínimo de detecção (LMD) foi calculado mediante a fórmula (i):

$$LMD = \frac{DP \times 3,14}{V} \quad (i)$$

sendo,

LMD : Limite mínimo de detecção

DP: desvio padrão

3,14: número padronizado a partir do intervalo de confiança de 95 % do teste *t*.

V: volume da amostra (mL).

4.2.3 Detecção de helmintos mediante da metodologia da Norma Oficial Mexicana (NOM) (MÉXICO, 1996).

Empregou-se a técnica elaborada por Victorica et al. 2003; para isso, 10 amostras de 1 litro do efluente hospitalar bruto foram colhidas semanalmente, entre junho e agosto de 2006 e, no laboratório, deixadas sedimentar por 24 horas em um béquer. Metade do sobrenadante foi retirado e desprezado com pipeta e o restante deixado sedimentar por mais 24 horas. O restante do sobrenadante foi retirado e o sedimento foi transferido para 4 ou 5 tubos cônicos de centrífuga e centrifugado a $400 \times g$, por 3 minutos.

Após a remoção do sobrenadante dos tubos, o sedimento foi ressuspenso com 9 mL de sulfato de zinco (ZnSO_4) com gravidade específica de 1,3 e sujeito à nova centrifugação na mesma velocidade e tempo. O sedimento obtido foi transferido para um béquer, diluído com 40 mL de água destilada e submetido à sedimentação espontânea por mais 24 horas. O sedimento obtido foi transferido para 2 tubos de centrífuga e centrifugado a $480 \times g$ por 3 minutos. O sobrenadante foi retirado, o sedimento foi ressuspenso em 2,3 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4), a 0,1 N, em 33-35 % etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) e 1,5 ml de éter e centrifugado a $600 \times g$ por 3 minutos. Os sedimentos dos 2 tubos foram juntados e acrescentou-se uma

etapa de lavagem deste último sedimento com água destilada, para a remoção da solução álcool-ácida (NELSON et al., 2001). Este foi centrifugado a 600 x *g* por 3 minutos, retirado o sobrenadante e armazenado em um tubo de microcentrífuga.

Finalmente, o volume de 1 mL do sedimento foi colocado em uma placa de Petri com água de torneira filtrada e armazenado em estufa a 27°C (PESSÔA e MARTINS, 1978). Para a observação dos ovos e larvas eventualmente presentes nestas amostras, durante 15 dias, duas alíquotas de 6 µL foram analisadas em microscopia ótica utilizando o corante vital Azul Trypan (UDEH, 2003), sendo as preparações examinadas dentro de 3 minutos.

4.2.4 Medidas físico-químicas

O pH das amostras colhidas foi medido com peagâmetro (Quimis Q400A) com o propósito de estabelecer uma correlação com a presença de cistos e oocistos.

Foram realizadas 10 medidas da concentração de cloreto (Cl^-) do efluente hospitalar, utilizando-se o espectrofotômetro DR/2010 da marca HACH. O protocolo foi seguido de acordo com o produtor do aparelho. Para tal, a 25 mL da amostra de esgoto hospitalar foram adicionados 2 mL de tiocianato de mercúrio e 1 mL de íons ferro. O mesmo procedimento se faz para a solução de referência (branco), mas dessa vez com água Milli-Q no lugar da amostra. Agita-se o tubo e após 2 minutos de reação se faz a leitura no aparelho da marca HACH.

4.2.5 Análise dos dados de ocorrência natural dos protozoários

Foram calculadas as médias e os desvios padrões das concentrações dos protozoários encontrados naturalmente no efluente hospitalar e a correlação dessas concentrações com o pH das amostras coletadas durante um ano.

4.3 Ensaios com tratamento fotoeletroquímico

Para a realização destes ensaios, 1 L do efluente hospitalar bruto recebeu uma inoculação artificial de um número conhecido de cistos e oocistos e essas amostras passaram pelo processo fotoeletroquímico. Posteriormente, foram feitas análises parasitológicas para determinar os danos morfológicos na parede dos organismos estudados (Fig. 3).

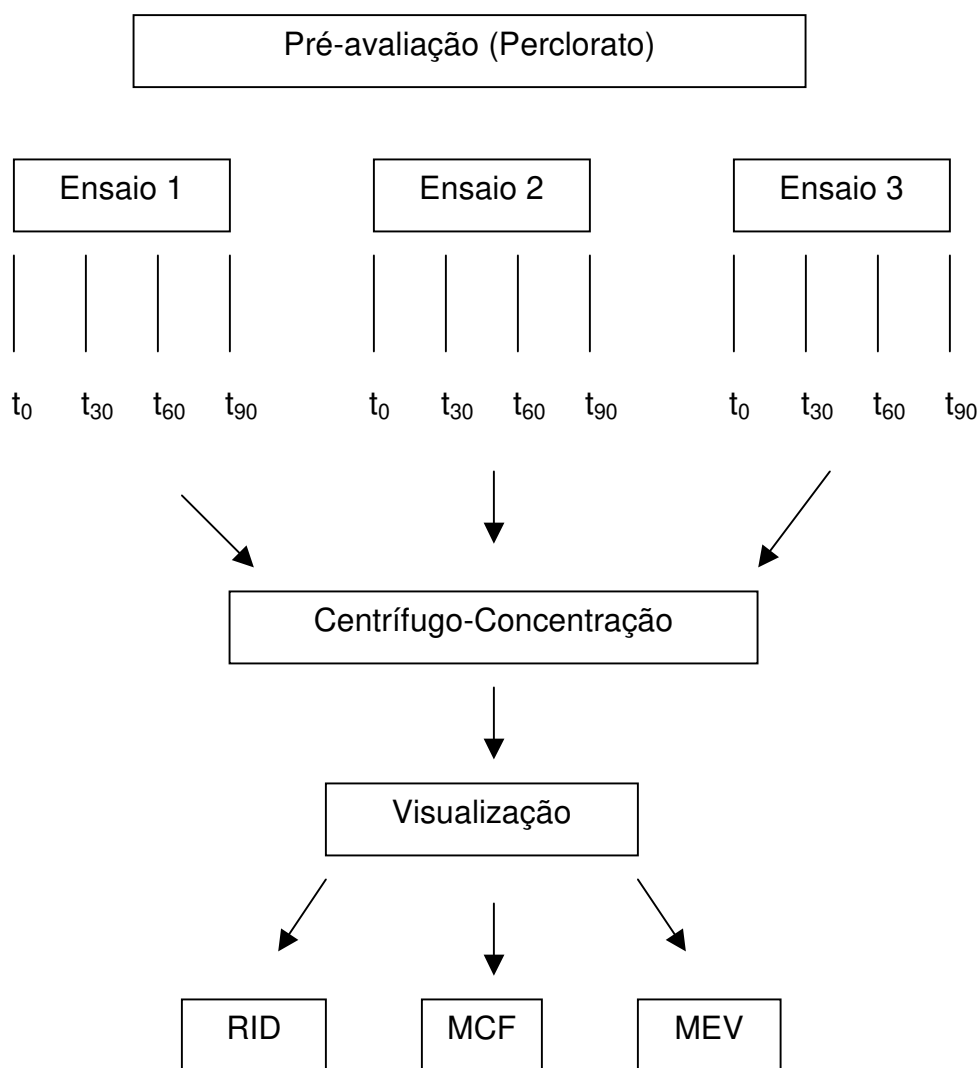


Figura 3: Organograma das etapas laboratoriais realizadas durante os ensaios de tratamento fotoeletroquímico.

4.3.1 Reator de bancada

O reator fotoeletroquímico foi montado em uma estrutura cilíndrica com uma camada dupla de vidro e inserido em um sistema de recirculação, contendo bomba hidráulica, mangueiras e torneira para coletas. O mesmo é composto por um eletrodo comercial de titânio, revestido com uma mistura de óxidos de titânio e rutênio na proporção de 70 TiO_2 /30 RuO_2 (Fig. 4 A e B).

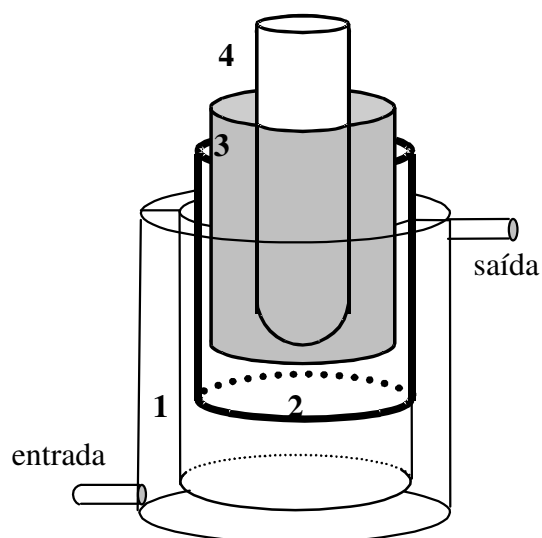
Embora o isômero mais fotoativo do dióxido de titânio seja a forma alotrópica anatase (PELEGRINI et al., 2000), devido ao processo térmico envolvido na preparação dos eletrodos de óxido, o dióxido de titânio apresenta-se na forma rutílica (ZIOLLI et al., 1998) que possui uma diferença de energia entre as bandas de valência e de condução maior que aquela observada para a fase anatase. No entanto, o dióxido de rutênio presente na composição do óxido parece desempenhar o papel de sorvedouro de elétrons, evitando a recombinação elétron/lacuna, além de reduzir a diferença de energia entre as bandas de valência e de condução.

Um tubo cilíndrico de titânio revestido internamente $\text{TiO}_2\text{-RuO}_2$ funciona como anodo dimensionalmente estável (DeNora do Brasil LTDA, DSA-CL2) de 170 cm^2 de área interna. O catodo é uma tela cilíndrica de titânio, que foi posicionada concentricamente ao anodo, a uma distância de três mm. O contato elétrico entre as extremidades do catodo é feito com fios de cobre. Dentro do catodo é inserido um tubo de quartzo, e dentro deste, uma lâmpada ultravioleta (Philips® HPL-N 125 W, $31.1\text{ J m}^2\text{ s}^{-1}$) com $\lambda_{\text{máx}} = 254\text{ nm}$.

Prevendo o aquecimento da solução durante o processamento, há circulação de água corrente à temperatura ambiente no espaço entre as camadas da cuba de vidro (Fig. 4 B).



A



B

Figura 4: (A) Reator fotoeletroquímico de bancada. (B) Esquema do reator: 1- sistema de refrigeração, 2- anodo 70 TiO_2 / 30 RuO_2 DSA[®], 3- catodo de tela de titânio, 4- tubo de quartzo.

4.3.2 Pré-avaliação do reator (ação dos radicais hidroxila).

Objetivando avaliar exclusivamente a ação dos radicais hidroxila, foi realizada uma pré-avaliação do reator, em triplicata. Para tal, foi utilizado um eletrólito suporte composto pela solução de perclorato de sódio à $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. À essa solução foram inoculados $3,00 \times 10^6$ a $3,42 \times 10^6$ oocistos e, de $5,44 \times 10^5$ a $7,80 \times 10^5$ cistos, provindos da suspensão controle positivo do Kit Merifluor[®] para

Cryptosporidium spp. e *Giardia* spp. (Meridian Bioscience Diagnostics, Cincinnati, Ohio). Posteriormente, toda a amostra preparada recebeu o tratamento fotoeletroquímico no reator com uma corrente constante de 14 mA cm^{-2} e tensão de 3,5 V, durante 60 minutos.

As amostras tratadas foram filtradas em membranas de ésteres mistos de celulose, com 47 mm de diâmetro e porosidade nominal de $3 \mu\text{m}$ (marca Millipore®), por meio de um sistema de filtração com bomba de pressão positiva e porta filtro da marca Gelman® (FRANCO et al., 2001; FRANCO et al., 2002).

Após a filtração, a membrana foi cuidadosamente retirada e colocada em uma placa plástica estéril para realizar a etapa de recuperação de cistos e oocistos presentes nas amostras. Para tanto, a superfície da membrana foi raspada por 10 minutos com alça plástica macia seguida de lavagens manuais (por 10 minutos) com solução de eluição (Tween 80, 0,1 %). Estas lavagens foram feitas alternadamente e o líquido resultante transferido para tubos cônicos e concentrado por centrifugação ($1.050 \times g$; 10 minutos). O sobrenadante foi aspirado e o sedimento resultante lavado em água destilada e novamente submetido à centrifugação, nas mesmas condições.

Após o descarte do sobrenadante, o sedimento desta segunda centrifugação, foi completado até o volume de 1 mL, transferido para tubos de microcentrifugação e mantidos sob refrigeração a 4°C.

O sedimento foi posteriormente avaliado empregando o teste de reação de imunofluorescência direta (RID).

4.3.3 Inoculação de parasitos

Com a finalidade de realizar os experimentos referentes ao tratamento fotoeletroquímico, as amostras de efluente previamente à passagem pelo reator, foram contaminadas artificialmente a partir de suspensões purificadas de organismos. Para os ensaios com *Cryptosporidium* foi utilizada uma suspensão de oocistos, adquiridos comercialmente da empresa Waterborne Inc., EUA, sendo a mesma mantida em solução tampão fosfato contendo antibióticos e 0,01% de Tween 20 e armazenada sob refrigeração. Previamente ao uso, a suspensão foi homogenizada mediante passagem pelo vórtex (marca Phoenix® AP56) durante três minutos, invertendo-se, a seguir, o frasco três vezes para a total homogeneização. Esta suspensão foi utilizada antes de três meses após a sua preparação, tempo estipulado para manter a qualidade do material.

A dose inoculada artificialmente nas amostras de efluente, foi calculada a partir das informações fornecidas pela empresa em questão. O número de parasitos constante do certificado emitido pela mesma era de 3×10^5 organismos.

Nos experimentos com *Giardia*, empregou-se uma suspensão purificada no Laboratório de Protozoologia do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da Unicamp, a partir de uma amostra fecal contendo cistos do protozoário, cedida pelo Laboratório de Parasitologia do Hospital de Clínicas da Universidade.

4.3.3.1. Preparo de suspensão purificada de cistos de *Giardia* spp.

Para a purificação dos cistos de *Giardia* spp., presentes em fezes humanas contaminadas, utilizou-se gradiente de solução de sacarose, de acordo com

protocolo de SMITH et al. (1989), sendo introduzidas modificações dos volumes referentes às soluções do gradiente de sacarose. Inicialmente, as fezes foram diluídas (1:10) com água destilada, peneiradas em malha com poro de 50 µm e lavadas com Tween 20 na concentração de 0,2 % w/v. Em um tubo cônico de centrífuga, foram adicionados cuidadosamente: 2 mL de solução de açúcar A (gr. sp. = 1,02); 5 mL da solução B (gr. sp. = 1,06); 2 mL da solução C (gr. sp. = 1,18) e, finalmente, 2 mL da suspensão fecal peneirada, sem que os gradientes de sacarose se misturassem. O tubo foi centrifugado a $400 \times g$, durante 10 minutos. Removeu-se a porção central (correspondente à gr. sp. 1,06), diluiu-se 1 vez com água destilada e centrifugou-se novamente com a mesma velocidade e tempo.

A seguir, foram feitas 3 lavagens com solução tampão fosfato estéril (STF). Posteriormente, os cistos purificados foram armazenados em STF e antibióticos: penicillina (100 U/mL), estreptomicina (0,1 mg/mL), gentamicina (0,1 mg/mL), além do antifúngico fungizona (0,5 mg/mL) (SMITH, 1989). A suspensão de cistos de *Giardia* foi utilizada antes de três meses após a sua preparação, tempo estipulado para manter a qualidade da mesma.

Com a finalidade de verificar o número de cistos presentes na suspensão purificada, esta solução-estoque foi submetida à Reação de Imunofluorescência Direta (RID) empregando anticorpo monoclonal presente no Kit Merifluor® para *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. (Meridian Bioscience Diagnostics, Cincinnati, Ohio), de acordo com as recomendações do fabricante e efetuou-se a enumeração de organismos a partir de 3 alíquotas de 5 µL, cuidadosamente distribuídas nos poços da lâmina de imunofluorescência. Levou-se em

consideração o valor médio das três contagens para a estimativa final do número de organismos presentes em 3 mL da suspensão purificada.

Efetuuou-se uma cuidadosa comparação morfológica com cistos e oocistos presentes nas suspensões purificadas e igualmente examinadas mediante a RID. Mais de 90 % dos cistos observados estavam compatíveis com aqueles dos experimentos controle-positivo, onde foi utilizada a suspensão do Kit Merifluor® para *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. (Meridian Bioscience Diagnostics, Cincinnati, Ohio).

4.3.4 Tratamento do esgoto hospitalar no reator fotoeletroquímico

Os ensaios empregando o reator fotoeletroquímico, de bancada, foram realizados separadamente para *Cryptosporidium* sp. e *Giardia* sp. Para ambos os protozoários, os testes foram efetuados empregando-se o volume de 1 L do efluente do esgoto do Hospital de Clínicas da UNICAMP.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata para confirmação dos resultados e executados separadamente, para *Cryptosporidium* e *Giardia*. No caso de *Cryptosporidium*, as amostras de efluente, previamente determinadas como negativas por meio de RID, foram contaminadas artificialmente com um número aproximado de $3,0 \times 10^5$ oocistos e, para *Giardia*, $9,2 \times 10^4$ cistos. A seguir, estas amostras receberam o tratamento fotoeletroquímico à uma corrente constante de 14 mA cm^{-2} . O potencial foi elevado a 12 V, um valor relativamente alto, devido à baixa condutividade média do efluente de $0,7 \text{ mS cm}^{-1}$ ($\pm 0,2$). A amostra não foi corrigida pela presença de cloreto.

Alíquotas de 5 mL foram colhidas nos intervalos de 0, 30, 60, 90 minutos de tratamento, para posterior análise parasitológica.

A escolha dos intervalos de tempo de tratamento (30, 60 e 90 minutos) foi fundamentada em experimentos prévios realizados (Projeto FAPESP nº 02/02196-5), quando se evidenciou a ocorrência de dano morfológico na parede dos protozoários submetidos ao tratamento fotoeletroquímico (FRANÇA et al., 2004). Também levou-se em consideração a resistente camada externa da parede destes protozoários parasitas (PETRY, 2004).

As amostras já tratadas foram, a seguir, submetidas às análises parasitológicas mediante a técnica de centrífugo-concentração seguida de clarificação com éter (SANTOS et al., 2004), como descrito no item 2.1.1.

4.3.4.1 Experimento-controle negativo do reator.

Foram realizados experimentos-controle negativos para se detectar possíveis contaminações durante as etapas do trabalho. Nesse caso, volumes de 1 litro de água destilada, sem contaminação artificial por cistos e oocistos, foram passadas pelo reator sem a ação do mesmo, apenas para verificar a possível contaminação do recipiente. Os experimentos-controle negativos foram realizados entre cada repetição dos ensaios de tratamento fotoeletroquímico, com a finalidade de comprovar a ausência de contaminação interexperimentos. Após esse procedimento alíquotas de 5 µL do sedimento resultante do processamento, também foram examinadas mediante a RID.

4.3.4.2 Avaliação de dano aos parasitos mediante evidência direta visual (RID e MCF)

Com o propósito de comprovar o possível efeito do tratamento fotoeletroquímico sobre a parede dos oocistos ou a sua destruição, foram empregadas a microscopia de imunofluorescência e a de contraste de fase, conforme descritas no item 2.1.2.

Para tanto, as diversas preparações referentes aos diferentes tempos de tratamento fotoeletroquímico foram analisadas comparativamente às lâminas dos ensaios controle-positivos, levando em consideração os critérios morfológicos previamente estabelecidos, de acordo com a USEPA (2006) e tomando por base dados da literatura sobre o efeito de ozônio e irradiação solar sobre cistos e oocistos (WIDMER et al., 2002; BRASSEUR et al., 1998; COGGINS e SCHAEFER III, 1984; SAUCH e BERMAN, 1991; McGUIGAN et al., 2006).

4.3.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras colhidas nos diferentes tempos do tratamento fotoeletroquímico também foram submetidas à visualização em microscopia eletrônica de varredura (BOZOLLA e RUSSELL, 1999), com a finalidade de documentar o aspecto da superfície dos cistos e oocistos, após passarem pelo reator. Para isso, elas foram concentradas e o precipitado correspondente aos diversos tempos de tratamento (0, 30, 60, 90 min) foi aderido a uma lamínula redonda com poli-L-Lisina por 1 hora. A essas lamínulas, foi acrescido o fixador glutaraldeído 2,5 % em um volume 10 vezes o volume da amostra por 1 hora. Após 3 lavagens, de 10 minutos cada, com solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹

(STF estéril) foi efetuada a pós-fixação com tetróxido de ósmio (OsO_4) 1 %, por 1 hora, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Após esta etapa e nova lavagem em solução tampão por 10 minutos, as lamínulas foram colocadas em uma estante-suporte e submetidas à desidratação em série, empregando etanol em concentrações crescentes: 30, 50, 70, 90 e 100%, sendo esta última repetida por 3 vezes, durante 10 minutos. As lamínulas foram secas em câmara de ponto crítico com dióxido de carbono efetuando-se a seguir, a montagem em suporte porta-amostras (Stub) com cola grafite e cobertas com camada fina de metal ouro-paládio no aparelho Sputter Coater (WIDMER et al., 2002; PETRY, 2004). As amostras foram visualizadas no microscópio eletrônico de varredura JEOL JMS-5800 LV.

Para a análise morfológica final, foi efetuada uma cuidadosa avaliação comparativa entre os cistos e oocistos presentes nas preparações referentes aos diferentes tempos de tratamento fotoeletroquímico e aqueles presentes no tempo zero, ou seja, que não haviam sofrido a ação do tratamento fotoeletroquímico. Na MEV, foram criadas categorias para interpretação do dano morfológico (ERLANDSEN et al., 1996; WIDMER et al., 2002; BRASSEUR et al., 1998; COGGINS, 1984).

Quando considerada a questão quantitativa, foi realizada uma estimativa a partir da contagem de organismos em 300 campos ao acaso na MEV, com o propósito de quantificar os cistos e oocistos que apresentavam dano, nos diferentes tempos de tratamento.

4.3.4.4 Cálculo da taxa de destruição dos protozoários

A taxa de destruição foi estipulada pelas diferenças percentuais entre os intervalos de tempo do tratamento fotoeletroquímico realizado com o esgoto hospitalar.

5. RESULTADOS

5.1 Ocorrência natural de *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. e ovos de helmintos em esgoto hospitalar bruto.

A pesquisa de ocorrência natural de cistos e oocistos no efluente hospitalar, realizada no período de agosto de 2005 a julho de 2006, mostrou predominância de cistos de *Giardia* spp. sobre os oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas amostras do esgoto bruto (Tabela 3).

5.1.1 Visualização e quantificação por meio da reação de imunofluorescência direta (RID).

Os cistos de *Giardia* apresentaram uma maior frequência quando comparados com os oocistos de *Cryptosporidium*. Somente uma amostra foi positiva para *Cryptosporidium* (amostra 5), no mês de outubro, enquanto que *Giardia* teve uma ocorrência de 58,4 % das amostras colhidas (14/24). As concentrações de cistos também atingiram valores altos variando de 10^4 a 10^6 cistos/L e revelando uma presença continuada em alguns períodos (de maio a julho de 2006) (Tabela 3).

Tabela 3: Estimativa da concentração de oocistos e cistos/L, média e desvio padrão (DP), pelo método de RID, em 12 meses de coleta do esgoto bruto do Hospital de Clínicas da Unicamp (periodicidade quinzenal).

Mês	Amostra	<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>Giardia</i> spp.	pH
Ago./2005	1	ND ^{*a}	$6,0 \times 10^6$	NE ^{*b}
	2	ND	$6,6 \times 10^4$	NE
Set.	3	ND	$4,0 \times 10^5$	NE
	4	ND	ND	7,36
Out.	5	$6,6 \times 10^4$ ^{*c}	$1,13 \times 10^6$	6,92
	6	ND	ND	6,75
Nov.	7	ND	ND	7,15
	8	ND	$6,6 \times 10^4$	7,38
Dez.	9	ND	ND	6,96
	10	ND	$6,6 \times 10^4$	7,02
Jan./2006	11	ND	ND	7,10
	12	ND	$4,0 \times 10^5$	7,20
Fev.	13	ND	ND	6,83
	14	ND	$1,3 \times 10^5$	7,22
Mar.	15	ND	ND	7,25
	16	ND	ND	6,73
Abr.	17	ND	ND	6,72
	18	ND	ND	7,20
Mai.	19	ND	$4,6 \times 10^5$	7,25
	20	ND	$6,6 \times 10^4$	7,12
Jun.	21	ND	$1,3 \times 10^5$	7,38
	22	ND	$6,6 \times 10^4$	7,11
Jul.	23	ND	$6,6 \times 10^4$	7,04
	24	ND	$6,6 \times 10^4$	7,00
Média		-	$6,5 \times 10^5$	-
DP		-	$1,5 \times 10^6$	-
Mediana		-	-	7,11

^{*a} ND: Não detectado

^{*b} NE: Não estabelecido

^{*c} : Apenas uma amostra positiva

5.1.2 Avaliação da Sensibilidade da metodologia de centrífugo-concentração e clarificação com éter (Experimento-controle positivo).

Depois de inoculados de 1.296 a 1.482 oocistos e de 408 a 468 cistos em uma amostra de esgoto hospitalar, a eficiência de recuperação média referente aos experimentos-controle positivos ($n = 3$) foi de 56,2 % ($\pm 34,6$) para *Cryptosporidium* spp. e 90,8 % ($\pm 35,0$) para *Giardia* spp. (Tabela 4). O LMD calculado para tais experimentos resultou em 21,8 oocistos/mL e 22,0 cistos/mL.

Tabela 4: Eficiência de recuperação do método de centrífugo-concentração seguida de clarificação com éter e limite mínimo de detecção (LMD).

Controle	Dose do inóculo (n^o)		Eficiência de recuperação (%)	
	oocistos	cistos	oocistos	cistos
1	1296	408	92,5	58,8
2	1482	468	40,4	85,4
3	1482	468	26,9	128,2
Média	-	-	56,2	90,8
DP	-	-	34,6	35,0
LMD	-	-	21,8 oocistos/mL	22,0 cistos/mL

5.1.3 Detecção de helmintos por meio da metodologia da Norma Oficial Mexicana (NOM).

Em relação aos helmintos, das 10 amostras colhidas e analisadas, apenas uma foi negativa (amostra 8) (Tabela 5). Todas as outras (90 % das amostras) apresentaram positividade com concentrações de $5,8 \times 10^4$ ovos/L e $4,0 \times 10^5$ larvas/L, sendo que as larvas e ovos não foram identificados quanto ao gênero,

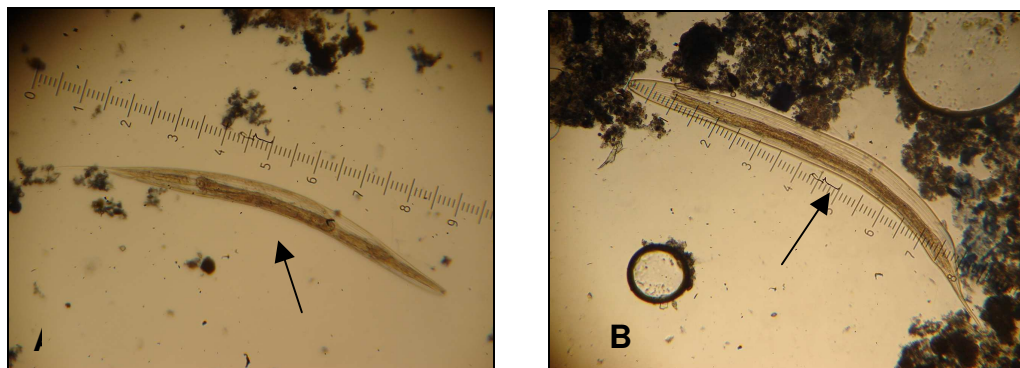
mas pertencem ao grupo dos nematóides (figs. 5 A e B). Os ovos observados nas amostras 4 e 5 (Tabela 5) eram similares à *Trichostrongylus* e *Hymenolepis*; apenas o da amostra 7 incorporou o corante Azul Trypan representando a sua inviabilidade, apesar de estar larvado (fig. 6).

Tabela 5: Número de ovos e larvas de helmintos encontrados em 10 amostras do esgoto hospitalar bruto mediante procedimento da Norma Oficial Mexicana (NOM, 1996).

Amostra (data)	Lâmina 1* ¹		Lâmina 2* ¹	
	ovo	larva	ovo	larva
1 (20/6/2006)	1	2	0	0
2 (26/6/2006)	0	3	2	5
3 (3/7/2006)	0	6	0	4
4 (10/7/2006)	1	5	0	3
5 (17/7/2006)	0	2	1	3
6 (24/7/2006)	1	2	0	0
7 (31/7/2006)	1* ²	4	0	1
8 (7/8/2006)	0	0	0	0
9 (14/8/2006)	0	0	0	4
10 (21/8/2006)	0	2	0	2

*¹: Soma das lâminas observadas durante 15 dias.

*²: ovo larvado



Figuras 5 A e B: Larvas de nematóides encontradas na amostra de esgoto hospitalar bruto do Hospital de Clínicas da Unicamp (aprox. 140 e 180 μm , respectivamente).



Figura 6: Ovo larvado da amostra 7 com incorporação do corante vital Azul Trypan encontrado no esgoto do Hospital de Clínicas da Unicamp (aprox. 70 μm de comprimento).

5.1.4 Medidas físico-químicas

Os valores de pH do esgoto hospitalar, variaram de 6,72 a 7,38 com uma mediana de 7,11 (Tabela 3).

As medidas de cloreto no esgoto hospitalar bruto tiveram uma média de 45,2 mg/L ($\pm 9,0$) (Tabela 6).

Tabela 6: Medidas de cloreto do esgoto hospitalar do Hospital de Clínicas da Unicamp.

Amostra	Cloreto (mg/L)
1	47,5
2	41,0
3	59,5
4	50,0
5	37,5
6	58,5
7	31,0
8	41,0
9	44,0
10	41,5
Média	45,2 ($\pm 9,0$)

5.2 Ensaio com tratamento fotoeletroquímico

A seguir são apresentados os resultados dos ensaios com o reator fotoeletroquímico, constituídos de uma pré-avaliação para verificar a eficiência do reator mediante a ação exclusivamente dos radicais hidroxila sobre os protozoários e, posteriormente, dos ensaios executados com o efluente hospitalar do Hospital de Clínicas da Unicamp contaminado artificialmente.

5.2.1 Pré-avaliação do reator (ação dos radicais hidroxila)

Os experimentos de pré-avaliação ($n = 3$) mostram uma tendência de destruição dos cistos e oocistos inoculados na solução de água destilada e

perclorato de sódio, após 60 minutos de tratamento (Tabela 7). Os experimentos realizados em triplicata apresentaram uma destruição de 95 %, 98 % e 96 % respectivamente para *Cryptosporidium*. Já para *Giardia* as taxas de destruição neste experimento de pré-avaliação foram de 51 %, 84 % e 31 %, respectivamente nos três ensaios (Tabela 7).

Tabela 7: Resultados dos ensaios (em triplicata) de 1 L de eletrólito suporte de perclorato de sódio, acrescido de cistos e oocistos, inoculados artificialmente e tratados com reator fotoeletroquímico por 60 minutos.

Amostra	Tratamento fotoeletroquímico (min.)	<i>Cryptosporidium</i> (oocistos/L)	<i>Giardia</i> (cistos/L)
1	0'	$3,0 \times 10^6$	$7,8 \times 10^5$
	60'	$1,5 \times 10^5$	$4,0 \times 10^5$
2	0'	$3,0 \times 10^6$	$7,8 \times 10^5$
	60'	$6,6 \times 10^4$	$1,3 \times 10^5$
3	0'	$3,4 \times 10^6$	$5,8 \times 10^5$
	60'	$1,3 \times 10^5$	$4,0 \times 10^5$
Média	0'	$2,8 \times 10^6$	$7,1 \times 10^5$
	60'	$4,1 \times 10^5$	$3,1 \times 10^5$

5.2.2 Inoculação de parasitos

Todos os ensaios onde o efluente foi inoculado experimentalmente com um número conhecido de cistos e oocistos foram satisfatórios uma vez que houve coerência entre o valor de oocistos inoculados (3×10^5) e o valor dos oocistos recuperados no tempo zero (sem ação do tratamento) (2×10^5). Os cistos (fig. 7) e oocistos inoculados (fig. 8) apresentavam características morfológicas compatíveis

com aqueles do experimento-controle positivo, certificando a qualidade do inóculo. Mais que 99 % dos cistos e oocistos presentes nos inóculos apresentavam fluorescência verde-maçã brilhante predominante na parede dos protozoários.

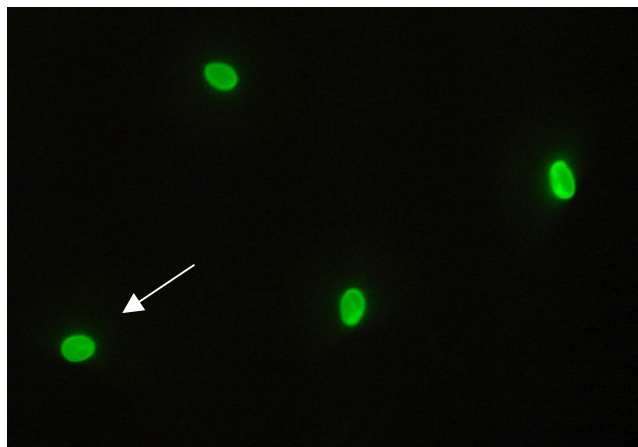


Figura 7: Cistos de *Giardia* do inóculo purificado, utilizados nos ensaios com tratamento fotoeletroquímico. Visualização por RID (400×).

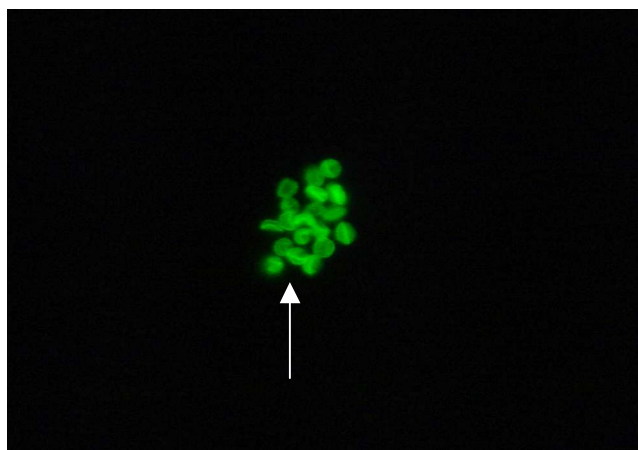


Figura 8: Oocistos de *Cryptosporidium* agregados, presentes na suspensão comercialmente adquirida da empresa Waterborne Inc. (600×).

5.2.3 Tratamento do esgoto hospitalar no reator fotoeletroquímico.

Os resultados dos ensaios realizados no reator fotoeletroquímico indicam que há uma redução na concentração de protozoários, de acordo com a progressão do tempo de tratamento (Tabela 8).

Nos tempos de tratamento de 0 a 30 minutos, tanto cistos de *Giardia* spp., quanto oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram detectados nas preparações, ao passo que após 60 minutos de tratamento fotoeletroquímico, os oocistos não foram detectados evidenciando a destruição desses organismos (Tabela 8).

Em relação à *Giardia* spp., tanto no t_0 quanto no t_{30} , os cistos estavam presentes, porém em apenas um dos ensaios (ensaio 3), cistos foram observados no tempo de 60 minutos de tratamento (Tabela 8). E finalmente, após 90 minutos de tratamento nenhum cisto foi detectado. Dessa forma, pode-se inferir que quanto maior o tempo de tratamento, maior é a taxa de destruição de cistos e oocistos.

Tabela 8: Estimativa do número de organismos/L detectados em diferentes tempos do tratamento fotoeletroquímico (0, 30, 60, 90 minutos), aplicados no efluente hospitalar bruto (HC/Unicamp), após contaminação experimental, em um reator fotoeletroquímico.

Ensaio	Tratamento fotoeletroquímico (min.)	Número de parasitos /L	
		<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>Giardia</i> spp.
1	AB ^{*1}	0	$2,0 \times 10^5$
	t ₀ [▲]	$2,0 \times 10^5$	$1,6 \times 10^6$
	t ₃₀	$2,0 \times 10^5$	$1,2 \times 10^6$
	t ₆₀	0	0
	t ₉₀	0	0
2	AB	0	0
	t ₀ [▲]	$2,0 \times 10^5$	$2,2 \times 10^6$
	t ₃₀	0	6×10^5
	t ₆₀	0	0
	t ₉₀	0	0
3	AB	0	0
	t ₀ [▲]	$2,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^6$
	t ₃₀	0	$2,0 \times 10^5$
	t ₆₀	0	$2,0 \times 10^5$
	t ₉₀	0	0

^{*1} AB: Amostra bruta

[▲]: Inóculo

Os resultados dos ensaios empregando o tratamento fotoeletroquímico mostraram comportamentos diferentes em relação à destruição de *Cryptosporidium* spp. e de *Giardia* spp. Para *Cryptosporidium* spp., a destruição foi visualmente de 100%, em dois ensaios, quando comparadas às densidades dos oocistos no t₀ e t₃₀, sendo que, no ensaio 1, a total destruição dos oocistos foi alcançada após 60 minutos de tratamento (fig. 9 e tabela 8).

Já para *Giardia* spp., no tempo de 30 minutos, observa-se valores intermediários da concentração dos cistos, levando à sua destruição somente após 60 (ensaios 1 e 2) ou 90 minutos de tratamento (ensaio 3), apresentando uma menor taxa de redução em um dos três ensaios (25 %, 73 % e 80 %) (Fig. 10). Tal evidência também foi corroborada nos ensaios qualitativos (vide item 5.2.3.2). Os resultados diferenciados podem ser atribuídos a outros interferentes presentes na amostra real.

As figuras 9 e 10 são referentes à tabela 8 e nelas são mostradas as tendências da redução das concentrações de protozoários, em 3 ensaios independentes, onde é possível observar que a destruição de cistos e oocistos é dependente do tempo de exposição.

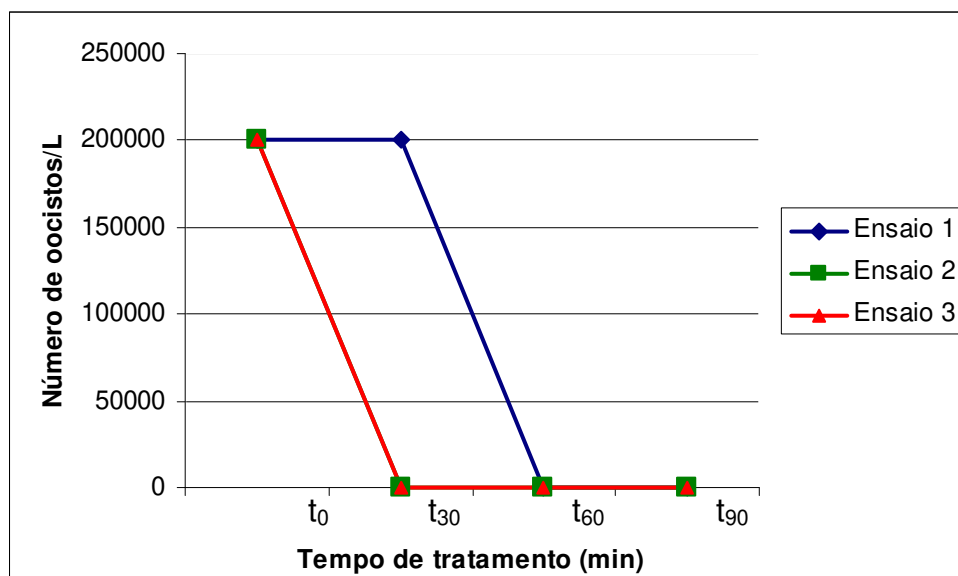


Figura 9: Destruição de oocistos visualizados em RID, no decorrer do tratamento fotoeletroquímico aplicado ao esgoto hospitalar do Hospital de Clínicas da Unicamp.

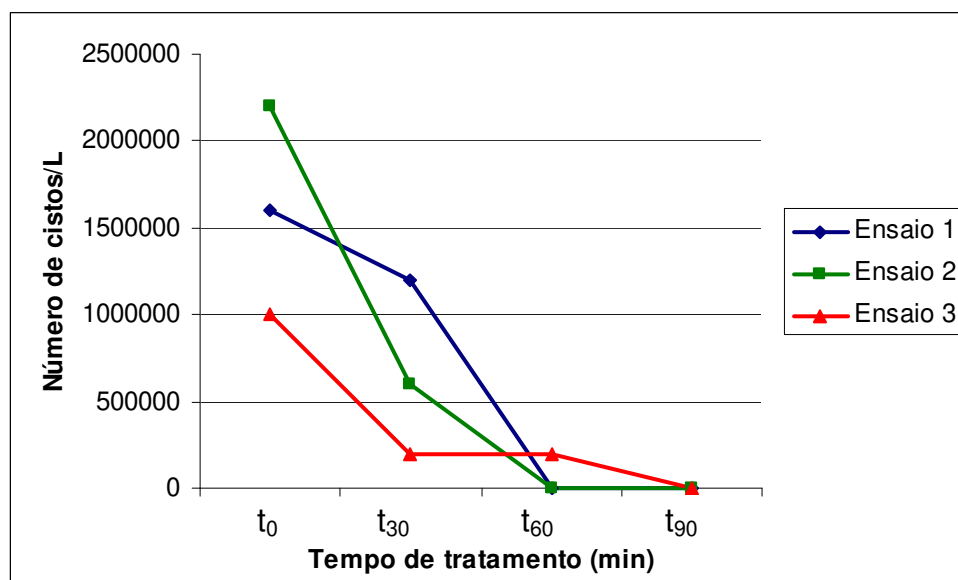


Figura 10: Destruição de cistos visualizados em RID, no decorrer do tratamento fotoeletroquímico aplicado ao esgoto hospitalar do Hospital de Clínicas da Unicamp.

5.2.3.1 Experimento-controle negativo do reator

Em todos os experimentos-controle negativos realizados ($n = 3$), cistos e oocistos não foram encontrados, comprovando a ausência de contaminação inter-ensaios.

5.2.3.2 Avaliação de dano aos parasitos mediante evidência direta visual (RID e MCF).

Foi possível verificar que cistos presentes nas amostras brutas não exibiam alterações morfológicas, apresentando superfície lisa quando observados na MEV (fig. 11), comprovando que a etapa de clarificação com éter não tem influência sobre os cistos e oocistos.

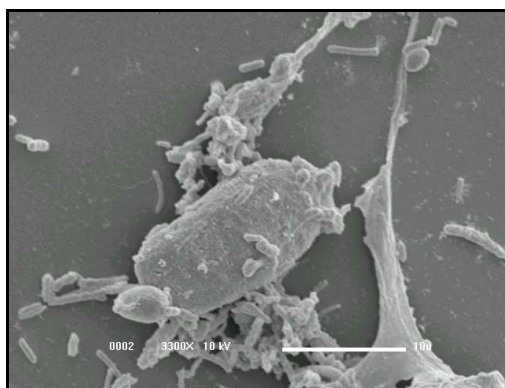


Figura 11: Cisto de *Giardia* spp. presente na amostra bruta (Tabela 8).

Quando considerados os diversos tempos de tratamento fotoeletroquímico foi possível observar que a maioria dos oocistos de *Cryptosporidium* no t_0 exibiu uma superfície regular com fluorescência mais forte na periferia formando um anel, formato arredondado, tamanho compatível (4 a 6 μm) e presença de sutura (prancha 1; fig. 1a).

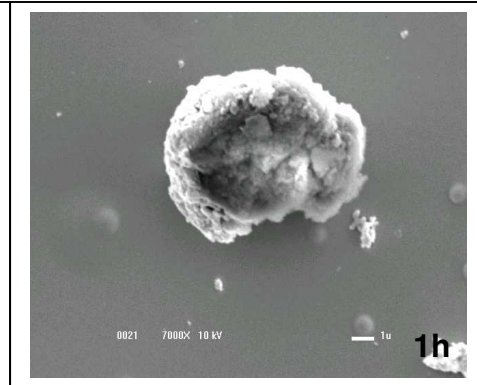
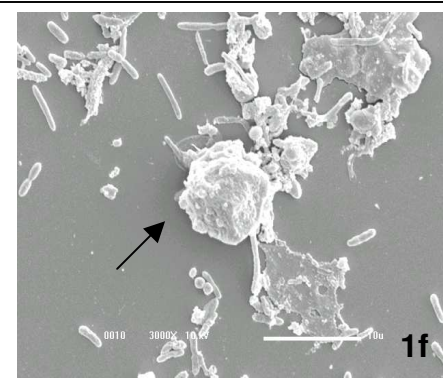
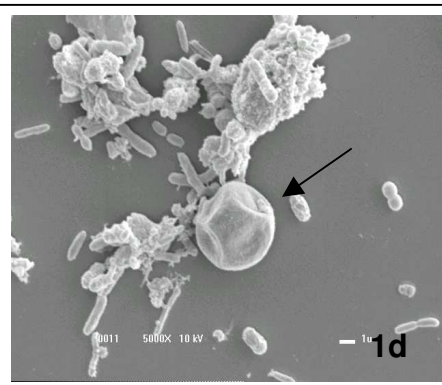
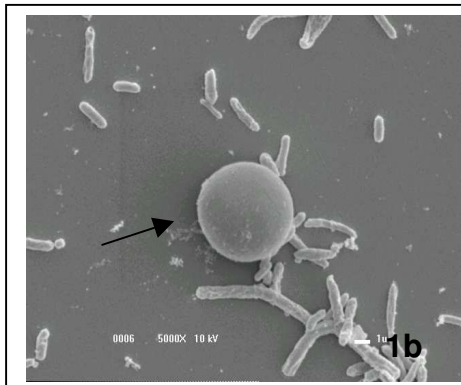
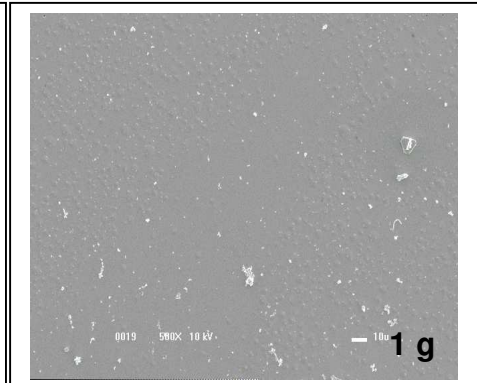
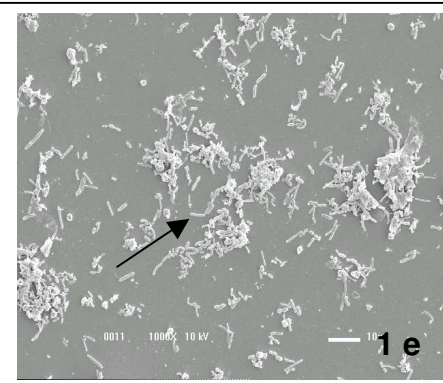
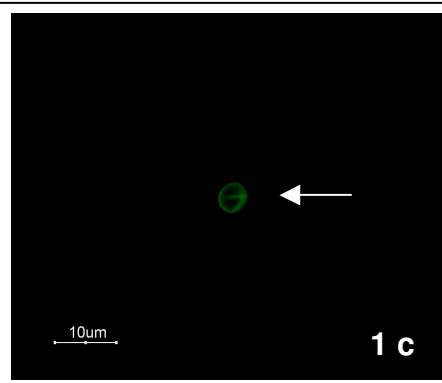
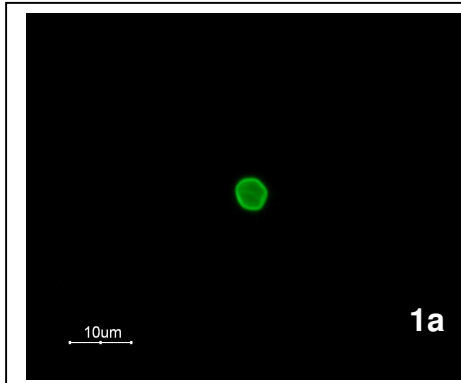
Prancha 1: *Cryptosporidium* spp. e aspecto do campo visualizado em MEV após tratamento fotoeletroquímico

0 min

30 min

60 min

90 min



Figuras: (1a) presença de sutura, no t_0 ; (1b) aspecto do oocisto em MEV, no t_0 ; (1c) diminuição da fluorescência, no t_{30} ; (1d) aspecto enrugado e murcho, no t_{30} ; (1e) campo em MEV, no t_{60} com presença de bactérias; (1f) compactação e deformidades na parede, no t_{60} ; (1g) campo em MEV sem sujidades, após 90 min de tratamento; (1h) rompimento do oocisto, no t_{90} .

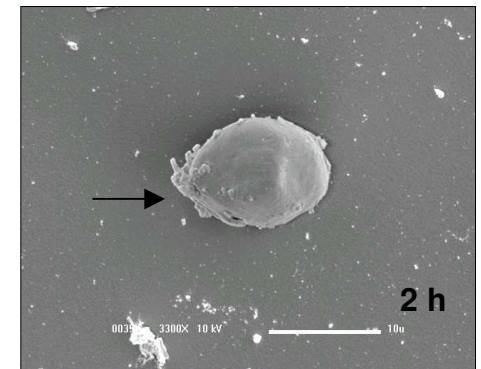
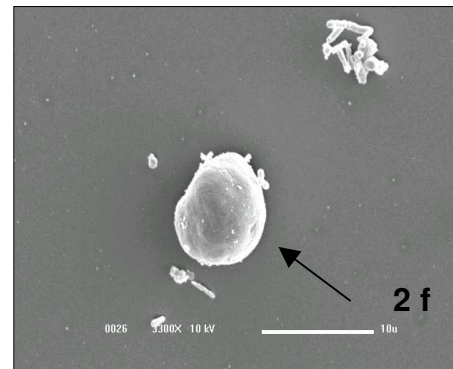
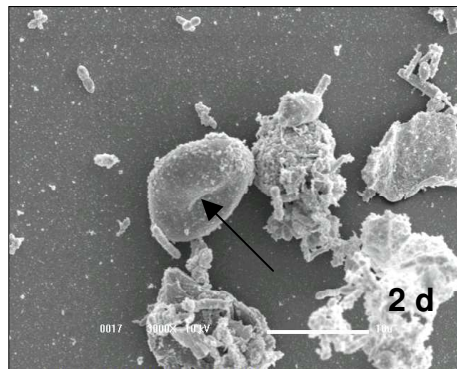
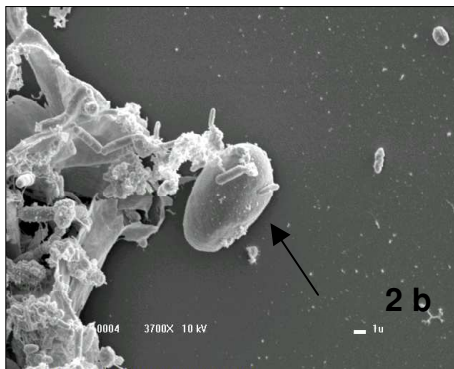
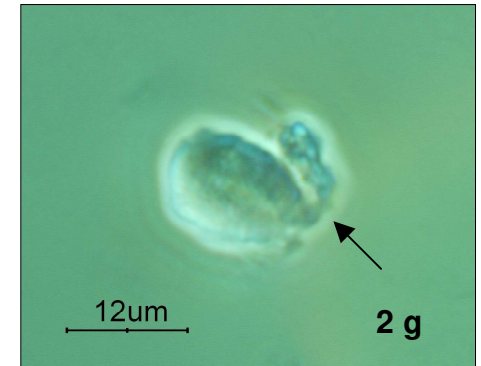
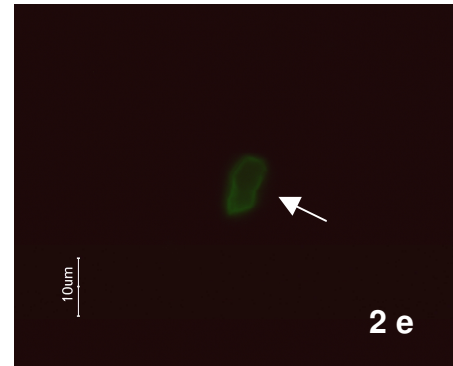
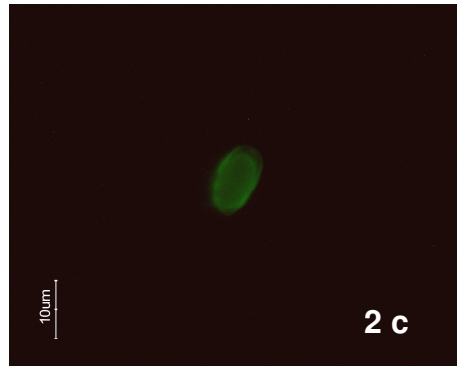
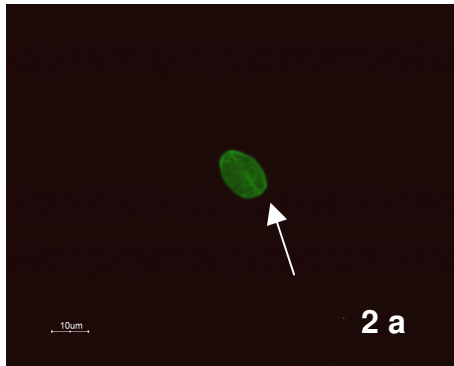
PRANCHA 2: *Giardia* spp. após tratamento fotoeletroquímico

0 min

30 min

60 min

90 min



Figuras (2a) presença de axonema, no t_0 ; (2b) aspecto do cisto em MEV, no t_0 ; (2c) perda da fluorescência, aspecto “não brilhante”, no t_{30} ; (2d) presença de deformidade na superfície, no t_{30} ; (2e) diminuição da fluorescência e irregularidade na parede, no t_{60} ; (2f) presença de poros na superfície, no t_{60} ; (2g) rompimento da parede com extravasamento do citoplasma, no t_{90} ; (2h) presença de irregularidades na superfície do cisto, no t_{90} .

No tempo de 30 minutos de tratamento fotoeletroquímico, observou-se marcante diminuição da fluorescência (prancha 1; fig. 1c) sendo que a maioria dos oocistos já não estava mais presente nas visualizações com RID no t_{60} (prancha 1; fig. 1e).

Finalmente, com 90 minutos de tratamento oocistos não foram observados nas preparações, evidenciando a total destruição dessas formas de resistência. Concomitantemente, constatou-se a ausência de partículas sólidas durante a observação na MEV (prancha 1; fig. 1g).

Em relação aos cistos de *Giardia* spp., na amostra que não recebeu tratamento fotoeletroquímico (t_0) (prancha 2 ;fig. 2a), os cistos apresentavam um padrão normal de fluorescência verde-maçã brilhante, tipicamente concentrada na parede cística, formando um anel, sendo visíveis também os axonemas.

Quando considerado o t_{30} , os cistos exibiam a fluorescência com intensidade mais baixa (prancha 2; fig. 2c) quando comparada com os experimentos-controle positivos (fig. 7) e também em relação àqueles presentes no t_0 .

Após 60 minutos de tratamento, no t_{60} , essa queda da intensidade da fluorescência foi bastante acentuada e foi possível observar deformidades na parede cística tais como protuberâncias e reentrâncias (prancha 2, fig. 2e).

Finalmente, após 90 minutos de tratamento, na maioria das preparações não foram encontrados cistos na RID, mas em uma ocasião, quando empregada a microscopia de contraste de fase, apenas uma forma do protozoário foi encontrada sendo possível comprovar o extravasamento do citoplasma (prancha 2; fig. 2g) deste cisto.

5.2.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A observação dos cistos e oocistos na MEV foi cuidadosamente analisada de forma individual e comparativamente aos protozoários visualizados nas amostras brutas e t_0 . Desta forma, tornou-se possível afirmar que a exposição desses ao tratamento fotoeletroquímico induziu alterações morfológicas na parede dos protozoários as quais foram mais pronunciadas de acordo com o aumento do tempo de exposição ao tratamento.

Nas micrografias de MEV, foi possível detectar sujidades junto aos cistos e oocistos decorrentes da amostra do efluente hospitalar, entre elas, bactérias foram ocasionalmente observadas aderidas à parede das formas parasitárias (prancha 2; fig 2b). Entretanto, com o aumento do tempo de tratamento evidenciou-se uma redução significativa de bactérias (prancha 2; figs. 2d, 2f e 2h).

No t_0 (sem tratamento), os oocistos observados apresentavam superfície regular, íntegros, com formato consistentemente esférico, sem protuberâncias, quinas ou arestas (prancha 1; fig. 1b).

Após 30 minutos de tratamento, no t_{30} , os oocistos apresentavam um formato irregular, sendo visíveis reentrâncias na superfície, exibindo um aspecto murcho e encolhido (prancha 1; fig. 1d). Essas alterações tornaram-se acentuadas após 60 minutos de tratamento, quando a maioria dos oocistos estava danificada e com a parede completamente rugosa e irregular (prancha 1; fig. 1f). Já no t_{90} , os oocistos se encontravam completamente rompidos (prancha 1; fig. 1h).

Quando considerados os ensaios com *Giardia* spp., no t_0 , os cistos apresentavam formato elíptico com as extremidades arredondadas a levemente pontiagudas (prancha 2; fig. 2b) e superfície aparentemente lisa. No t_{30} , os cistos

exibiam deformidades, muitas vezes formando um sulco na parede (prancha 2; fig. 2d). Após 60 minutos de tratamento, tornou-se possível observar a presença de pequenos poros na superfície dos parasitos (prancha 2; fig. 2f).

No tempo de 90 minutos de tratamento, a maioria dos cistos observados, apresentava-se com o formato característico, porém exibia uma deformação em uma das extremidades (prancha 2; fig. 2h).

Quando considerada a estimativa de cistos e oocistos que apresentavam danos, observou-se que, apenas com a circulação das amostras no reator (t_0), 100 % das formas estavam íntegras. Após 30 minutos de tratamento, 57 % dos oocistos exibiam alguma deterioração e após os tempos de 60 e 90 minutos, 100 % deles estavam danificados. Para os cistos de *Giardia* spp., após 30 minutos de tratamento, 55 % estavam danificados e consequentemente esse valor aumentou para 71 e 80 %, em 60 e 90 minutos, respectivamente, sendo nitidamente observados poros.

Desta forma, a análise quantitativa da morfologia dos cistos suporta a interpretação da análise por MEV e claramente reflete que o dano à parede e à estrutura do protozoário, induzida pelo tratamento fotoeletroquímico, aumenta com o tempo de exposição. Adicionalmente, o ensaio controle com o eletrólito suporte de perclorato de sódio, incluído no desígnio experimental deste estudo como uma etapa pré-avaliatória, mostrou uma tendência de redução na concentração de organismos e, embora de difícil visualização pela RID, foi possível observar a ocorrência de alterações estruturais como, por exemplo, cistos que tiveram seu conteúdo extravasado (prancha 2; fig. 2g).

6. DISCUSSÃO

O efluente hospitalar, na maioria das vezes, é despejado diretamente nos mananciais, sem tratamento, o que compromete a qualidade do corpo hídrico, causando um impacto ao ambiente e à saúde pública. Ao mesmo tempo, a partir desses mananciais é feita a captação de água para o abastecimento humano, ocasionando assim um círculo vicioso (SMITH et al., 2006).

O Hospital de Clínicas da Unicamp é considerado um hospital de referência no Brasil; comporta 450 leitos e tem uma circulação de 500 mil pacientes por ano. Tem capacidade para cerca de 1000 atendimentos ambulatoriais e de emergência por dia, além de uma média de 40 cirurgias diárias. Outros indicadores evidenciam a importância do Hospital de Clínicas, tais como a circulação de 10 mil pessoas por dia, a realização de cerca de 5 mil exames laboratoriais diários, entre outros (UNICAMP, 2007). Entretanto, é um grande gerador de resíduos líquidos não tratados e, até o presente momento, o lançamento destes resíduos é feito *in natura* no Ribeirão das Pedras, no distrito de Barão Geraldo, que posteriormente se junta com o Rio Anhumas e Rio Atibaia, respectivamente.

No Brasil, a legislação é seguida pelas resoluções do CONAMA e aquela que dispõe sobre o tratamento e a disposição final dos resíduos dos serviços de saúde é a resolução 358 de 2005 (Anexo 1). Nela, “os efluentes provindos de sistemas de saúde que contêm resíduos do Grupo A4, constantes no Anexo I desta resolução, podem ser encaminhados sem tratamento prévio para local devidamente licenciado para a disposição final de resíduos dos serviços de saúde. Fica a critério dos órgãos ambientais estaduais e municipais a exigência do

tratamento prévio, considerando os critérios, especificidades e condições ambientais locais”.

Segundo o artigo 28 desta Resolução, os geradores dos resíduos dos serviços de saúde e os órgãos municipais de limpeza urbana poderão, a critério do órgão ambiental competente, receber prazo de até dois anos, contados a partir da vigência desta Resolução (04 de maio de 2005), para se adequarem às exigências nela prevista. O não cumprimento do disposto nesta Resolução sujeitará os infratores às penalidades e sanções previstas na legislação pertinente, em especial na Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998, e no seu Decreto regulamentador.

Enquanto para os Resíduos Sólidos de Serviço de Saúde (RSSS) as normas estipulam uma rigorosa classificação, acondicionamento, coleta e tratamento (SCHNEIDER et al., 2004), para efluentes líquidos contendo patógenos de pacientes infectados, fármacos não metabolizados além de produtos químicos de limpeza, não se presencia tal rigorosidade para recebimento de tratamento (KÜMMERER, 2001; EMMANUEL et al., 2005).

6.1 Ocorrência natural de *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. e ovos de helmintos no efluente hospitalar.

O efluente hospitalar apresenta uma elevada carga de patógenos que são eliminados nas fezes e urina dos pacientes, além dos resíduos de drogas não metabolizados (KÜMMERER, 2001; CHITNIS et al., 2004; EMMANUEL et al., 2005). Essas condições inerentes ao efluente hospitalar o caracterizam por

apresentar um alto teor de partículas, de lipídeos e de matéria orgânica que podem exercer influência direta sobre a sensibilidade dos métodos de detecção de patógenos que por sua vez, possuem sensibilidades muito variáveis (FRICKER e CRABB, 1998).

A técnica selecionada neste estudo é justificada pela necessidade da retirada do excesso de lipídeos das amostras com a finalidade de facilitar a visualização dos organismos nas lâminas. A técnica de centrífugo-concentração, descrita por Robertson et al. 2000 foi adaptada por Santos et al. 2004 quanto ao volume e tempo de centrifugação. No presente estudo, outras modificações foram adicionadas como uma etapa de lavagem da amostra com solução de eluição (Tween 80 à 0,1 %) e as homogeneizações foram feitas em agitador de tubos (vórtex), o que contribuiu para aumentar a desagregação de cistos e oocistos das partículas e sujidades. A avaliação da sensibilidade da metodologia de centrífugo-concentração e clarificação com éter (experimento–controle positivo, item 5.1.2) apresentou uma eficiência de recuperação com valores elevados de 56,2 % para *Cryptosporidium* spp. e 90,8 % para *Giardia* spp., embora a reprodutibilidade alcançada requeira mais ensaios visando uma otimização futura (Tabela 4).

É importante ressaltar que a ausência de padronização de uma técnica específica para esgoto requer selecionar uma que seja adequada. A técnica empregada neste estudo tem vantagens por ser simples, robusta, de fácil manuseio e baixo custo.

A metodologia de centrífugo-concentração seguida de clarificação com éter exibiu uma taxa de recuperação maior quando comparada à de flutuação em sacarose para *Giardia* spp. embora não tenha havido diferença significativa entre

as duas técnicas para *Cryptosporidium* spp., de acordo com Robertson et al. (2000).

McCuin e Clancy (2005) encontraram uma variação muito ampla de recuperação com taxas de 0,9 % a 71,0 % em esgoto bruto, utilizando a tecnologia de separação imunomagnética (IMS). Com essa mesma técnica, Massanet-Nicolau (2003), investigou lodo de esgoto que exibiu uma concentração de 43,7 % para *Cryptosporidium* spp. e 50,8 % para *Giardia* spp. A efetividade do IMS depende da maximização da captura dos oocistos, da dissociação entre o oocisto e o anticorpo, e da composição físico-química da matriz da amostra. Para o efluente hospitalar, a purificação das partículas alvo por IMS possivelmente não é uma metodologia adequada devido à presença de cátions divalentes (COOK et al., 2006), o que prejudica a afinidade da ligação antígeno-anticorpo, além de ser uma técnica de alto custo.

Em ensaios controle, sensibilidades superiores a 100 % podem ocorrer devido à variabilidade em função da enumeração do inóculo. Fatores biológicos da suspensão purificada de oocistos, como o tempo de armazenamento e a origem, influenciam a qualidade dos oocistos, além do manuseio do material nos procedimentos prévios (LINDQUIST et al., 1999). Outra causa de variabilidade é a agregação, um dos principais fatores que contribui para esses valores superiores a 100%. Além disso, no caso deste estudo, os resíduos de fármacos presentes nesse tipo de efluente podem interferir na estabilidade de ligações antígeno-anticorpo e a presença de partículas podem favorecer o obscurecimento das formas parasitárias, sendo elementos geradores de interferências, acarretando menores taxas de recuperação (CARRARO et al., 2000).

Na amostra de esgoto hospitalar, o método de centrífugo-concentração seguido de clarificação com éter, alcançou 100 % de detecção, quando estavam presentes 21,8 oocistos/mL e 22,0 cistos /mL. Ou seja, o valor do limite mínimo de detecção (LMD) mostra que a técnica é eficaz para obtenção de positividade quando se tem no mínimo essas taxas, portanto, valores zero podem indicar a não ausência dos patógenos em questão (WEBER et al., 1991).

No presente estudo não foi utilizado o corante DAPI para a confirmação do achado das formas parasitárias, pois, segundo Chauret (1999), este corante aumenta a fluorescência de fundo da lâmina, dificultando a detecção dos cistos e oocistos. Além disso, o DAPI sofre interferências quando há presença de íons na amostra como é o caso do efluente hospitalar que apresenta resíduos de drogas podendo gerar a cristalização do corante (SMITH et al., 2005). Altas concentrações de DAPI e longos tempos de exposição ao corante são recomendados para amostras contendo detritos e partículas minerais e mesmo assim pode ocorrer falha na inclusão do corante (KEPNER e PRATT, 1994). É importante ressaltar que, atualmente, a coloração com DAPI é empregada como um teste confirmatório da morfologia, devido à sua afinidade com o material nuclear. No entanto, não deve ser aplicado para a determinação de células mortas e vivas principalmente porque o DNA, presente no núcleo das células, retém suas propriedades de coloração mesmo em células mortas, inativas (KEPNER e PRATT, 1994).

Por esse motivo, corantes vitais como o DAPI, podem subestimar a inativação quando comparados com a infectividade animal (McGUIGAN et al.,

2006). No Reino Unido, amostras de água bruta foram analisadas com o emprego de DAPI e dessas, 56,5 % das positivas apresentavam oocistos que exibiam pelo menos um núcleo, enquanto que apenas 32,8 % das amostras continham oocistos com quatro núcleos. Além disso, 40,0 % dos oocistos observados estavam vazios, e por sua vez, não poderiam ser detectados por outras técnicas como PCR ou FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*) (SMITH et al., 2002), o que justifica o uso da microscopia de contraste de fase para a confirmação de organismos fluorescentes na tonalidade verde-maçã brilhante, como empregado neste estudo.

O monitoramento estipulado quinzenal do efluente do Hospital de Clínicas realizado neste estudo revelou elevadas concentrações de cistos de *Giardia* spp. ($3,8 \times 10^5$ cistos /L), com mais da metade das amostras positivas (14/24), o que confirma o caráter endêmico da giardiose na região de Campinas e no Estado de São Paulo (FRANCO et al., 2001; FARIAS et al., 2002).

Para *Cryptosporidium* spp., essa taxa foi de 4,1 % (1/24), pois somente uma amostra foi positiva, entretanto, com uma significativa concentração de oocistos (66.000 oocistos/L).

O fato de apenas uma amostra apresentar positividade para *Cryptosporidium* spp. pode ser explicado pelas características de superfície dos oocistos, que por sua vez, influenciam na agregação à partículas dificultando a recuperação dessas formas na fase líquida. Os oocistos são colóides biológicos esféricos com uma superfície composta por uma complexa matriz de glicoproteínas. O oocisto possui uma carga superficial negativa sob condições ambientais típicas, provavelmente devido à presença de grupos carboxilato,

carboxílico e fosfato em sua superfície. Essa carga superficial negativa aumenta as forças eletrostáticas repulsivas com partículas da mesma carga e isso impede a adesão dos oocistos ao sedimento, diminuindo a sua remoção por sedimentação (SEARCY et al., 2005).

Outros fatores que exercem grande influência na presença e nas taxas de recuperação são o pH e as forças iônicas do meio (DROZD e SCHWARTSBROD, 1996), que no caso do efluente hospitalar, estão relacionadas com a presença de fármacos e drogas não metabolizadas pelos pacientes (KÜMMERER, 2001; FERRARI et al., 2003).

De fato, a única amostra positiva para *Cryptosporidium* spp. ocorreu quando o pH era 6,92, um valor relativamente baixo em comparação com as outras medidas obtidas ao longo do estudo (Tabela 3). A recuperação dos oocistos é superior quando o pH é mais ácido. Um estudo de detecção de *Cryptosporidium* em hortaliças e frutas vermelhas (“berries”) verificou que a recuperação dessas formas era maior quando o pH estava na faixa de 5,5 (COOK et al., 2006). Existe uma evidência que a agregação dos oocistos a outras partículas é pH-dependente, pois este modifica a natureza hidrofóbica e eletrostática da superfície do oocisto (DROZD e SCHWARTZBROD, 1996).

Os valores de pH encontrados nas amostras do presente estudo, variaram de 6,75 a 7,38, com uma mediana de 7,11 e coincidem com dados da literatura cujo valor de pH para efluente hospitalar é de 6 a 9 (WEN et al., 2004).

Embora não tenha sido encontrada correlação entre a concentração de oocistos de *Cryptosporidium* e pH ($r = 0,064$), outros trabalhos relatam correlação significativa entre estes parâmetros, ou seja, a detecção de oocistos aumenta

quando o pH diminui (BONADONNA et al., 2002; COOK et al., 2006). Esses achados discrepantes se devem, provavelmente, à presença de resíduos de fármacos não metabolizados ou outros componentes químicos como íons, característicos dessa matriz (esgoto hospitalar). Entre esses componentes químicos, deve-se salientar os resíduos derivados do soro fisiológico amplamente utilizado no âmbito hospitalar.

Ressalte-se que as amostras que tiveram resultados negativos poderiam apresentar concentrações de organismos abaixo do LMD determinado neste estudo (21.800 oocistos/L).

As precipitações também exibem um papel fundamental no aumento momentâneo da concentração de oocistos, ou seja, na intermitência da contaminação, favorecendo a dispersão de patógenos (BROOKES et al., 2004). Neste estudo, dados meteorológicos registraram um aumento das precipitações nos dias que antecederam a coleta da amostra onde foi flagrada a presença de *Cryptosporidium* spp. (ANEXO 2).

Nos meses chuvosos e quentes há uma maior incidência dos casos de diarreia e também maior exposição ao protozoário por atividades de recreação. O órgão de vigilância de doenças de veiculação hídrica, iniciada em 1988 nos EUA, fez uma análise de tendências em relação aos surtos de gastroenterites evidenciando que os surtos de criptosporidiose estavam associados à água de recreação durante o verão (CDC, 2005). Ressalte-se que o padrão sazonal da criptosporidiose é bimodal, com picos no verão e final do outono, no caso da infecção por *Cryptosporidium hominis* (SMITH et al., 2006; CACCIÓ et al., 2005).

Tempestades são importantes na contaminação dos mananciais pela dispersão desses protozoários, o que gera um problema na qualidade da água da captação (DILLINGHAM et al., 2002). Após grandes tempestades oocistos de *Cryptosporidium* foram encontrados na água de rio, em Nova York (XIAO et al., 2000).

Acrescente-se ainda que oocistos de *Cryptosporidium* spp. exibem baixa hidrofobicidade e este é um parâmetro que, quando correlacionado com as características químicas e a estrutura do parasito, tem uma influência significativa nos mecanismos de adesão com partículas suspensas (DROZD e SCHWARTSBROD, 1996; DAI et al, 2004; HSU e HUANG, 2002).

Por sua vez, os cistos de *Giardia* spp. apresentam uma acentuada característica hidrofóbica tornando extremamente difícil a sua recuperação no meio líquido (DAI et al., 2004), por se agregarem em outras partículas e serem mascarados na visualização com RID. Por esse motivo, neste estudo, introduziu-se a agitação no vórtex com a solução de eluição contendo um surfactante para promover a desagregação de partículas, aumentando assim as chances de detecção do protozoário. Além disso, o maior tamanho dos cistos comparativamente aos oocistos, é um fator facilitador na etapa de visualização. Mas, ressalte-se o caráter endêmico da giardiose na região de Campinas e Estado de São Paulo (FRANCO et al., 2001; FARIAS et al., 2002).

Para os cistos de *Giardia* spp., constata-se uma falta de variação sazonal, apesar desta protozoose ocorrer freqüentemente nos meses do inverno (FRASER et al., 1997). É de extrema importância, do ponto de vista de saúde pública, que neste trabalho documentou-se uma maior presença e freqüência de *Giardia* spp.

no esgoto durante os meses de maio a agosto (Tabela 3), inverno no Brasil, o que indica uma possível sazonalidade da infecção humana. Este é um aspecto que deve ser melhor elucidado. As implicações em saúde pública são reforçadas, considerando que a sobrevivência do microrganismo no ambiente é alta, podendo atingir 24 dias a uma temperatura de 20°C (GAJADHAR e ALLEN 2004) e pode ser ainda maior quando presente em água fria (ROSE et al., 2002), além disso, a dose infectante para *Giardia* spp. é de 10 cistos ou menos (RENDTORFF, 1954). Considera-se também que há uma tendência de predomínio da giardiose sobre as outras parasitoses (FERREIRA et al., 2000).

Até o presente momento, não foram encontrados dados na literatura mundial sobre a presença desses protozoários em esgoto hospitalar, porém eles são relatados em amostras de esgoto doméstico (XIAO, 2001; CANTUSIO NETO et al., 2006). Até onde o nosso conhecimento permite chegar, esse é o primeiro trabalho onde é estudada a presença desses protozoários em esgoto hospitalar. Foi realizada uma cuidadosa busca em bases de dados para a confirmação.²

Os achados desta pesquisa são coerentes com dados da literatura, visto que os valores encontrados em efluentes domésticos estão na ordem de 10^4 oocistos/L e 10^5 cistos/L, na cidade de Campinas, SP (SANTOS et al., 2004) e em Belo Horizonte, MG, Vieira et al. (2000), encontraram *Cryptosporidium* spp. com concentrações de 10^2 a 10^4 oocistos/L e para *Giardia* spp., uma faixa de 10^3 a 10^5 cistos/L. No caso deste estudo, os valores encontrados (10^3 oocistos/L e 10^5 cistos/L) não são surpreendentes por tratar-se de esgoto hospitalar onde se espera grande ocorrência de patógenos, devido ao fluxo de indivíduos

² Science Direct, Web of Science, Scielo, Scopus, ProBE, BioMed Central e Pub Med.

sintomáticos, no caso de *Cryptosporidium* e com sintomas variáveis, em relação à *Giardia*. Cistos e oocistos são eliminados nas fezes em concentrações de 10^9 à 10^{10} parasitos/g de fezes (FAYER et al., 2004).

Os patógenos ganham entrada nas comunidades a partir de resíduos de hospitais, casas, escolas e creches e a concentração desses patógenos no esgoto está diretamente relacionada com a incidência de infecções entéricas dentro da comunidade (GERBA e SMITH, 2005).

A prevenção da criptosporidiose envolve a eliminação ou redução das formas infectantes no ambiente (FAYER et al., 1997). Uma vez que o esgoto do Hospital de Clínicas é lançado sem tratamento no Ribeirão das Pedras e posteriormente no Atibaia, principal manancial que abastece Campinas torna-se evidente que a presença e o lançamento desses patógenos nas águas da microbacia do Atibaia podem representar um risco futuro quanto à ocorrência da criptosporidiose e da giardiose nas cidades vizinhas que margeiam e utilizam essas águas. Na altura da cidade de Americana, por exemplo, existe o Reservatório de Salto Grande, utilizado para recreação (LOPES et al., 2004).

De fato, a presença destes protozoários já foi registrada no Rio Atibaia, onde, no primeiro ponto de coleta (a montante da captação), foram encontradas 52 % de amostras positivas para *Giardia* em uma concentração de 25,12 cistos/L. No segundo ponto de coleta e a jusante do despejo do efluente do Ribeirão Pinheiros (antes da captação), 76 % das amostras foram positivas numa concentração de 64,16 cistos/L. Para *Cryptosporidium*, a única amostra positiva detectada foi colhida após o despejo do Ribeirão Pinheiros com a concentração de 20 oocistos/L (OLIVEIRA, 2005). O ponto de captação de água nesta bacia

hidrográfica foi considerado crítico uma vez que foram relatadas positivities com altas concentrações de *Giardia* atingindo 521 cistos/L (HACHICH et al., 2004).

Efluentes de esgoto e o despejo de esgoto *in natura* são os principais fatores de degradação de mananciais em nível mundial e são considerados como a maior fonte poluidora (GERBA e SMITH, 2005). A situação é mais preocupante visto que a água é captada a partir do manancial contaminado. Vale ressaltar que a concentração desses patógenos em esgotos, que posteriormente podem ser lançados em corpos d'água, é diretamente influenciada pela prevalência das parasitoses causadas pelos protozoários patogênicos na comunidades, não somente indivíduos sintomáticos, mas também aqueles assintomáticos (ROBERTSON, 2006). Por exemplo, no caso de infecção por *Giardia* em geral, somente os indivíduos sintomáticos são submetidos ao tratamento de modo que os portadores assintomáticos apresentam grande significado para a saúde pública por atuarem como fonte de cistos (ORTEGA e ADAM, 1997).

Na Inglaterra e País de Gales, o fornecimento de água para hospitais públicos é promovido por pequenos sistemas privados e foram responsáveis por 28 % dos surtos de criptosporidiose, com uma taxa de incidência anual de 1830 a cada 1 milhão, enquanto que, no sistema público, essa taxa foi de 53 em 1 milhão, no período de 1992-2003. Isso mostra que pessoas que freqüentam esses hospitais estão sendo colocadas em risco, pois não há um tratamento adequado, evidenciado pela presença de *Campylobacter* spp. na água tratada pelos sistemas privados e contribuindo para 14,0 % dos surtos (SMITH et al., 2006).

Pelo menos 325 surtos foram associados à água e surtos de doenças parasitárias causados por protozoários em nível mundial. Os surtos que

aconteceram na América do Norte e Europa contribuíram para 93,0 % de todos os relatos e cerca de 2/3 destes surtos ocorreram na América do Norte. Mais que 30 % de todos os surtos foram documentados na Europa, com o Reino Unido sendo responsável por 24,0 % deles, cosmopolitamente. *Giardia* e *Cryptosporidium* ocasionaram a maioria dos surtos, atingindo 40,6 % e 50,8 %, respectivamente (KARANIS et al., 2007).

Em outros países, as águas superficiais também são contaminadas a partir de esgotos. No Lago Michigan e Baía de Chesapeake, EUA, foram relatadas três espécies de *Cryptosporidium*: *C. parvum* genótipo bovino, *C. hominis* e *C. andersoni* (XIAO et al., 2001).

Oocistos de *Cryptosporidium* estão presentes em descargas de efluentes e podem, potencialmente, levar à contaminação de água potável (CLANCY e MCCUIN, 2003). O próprio surto ocorrido em Milwaukee em 1993, tinha como causa uma falha operacional no sistema de tratamento de água. Uma concentração de 0,13 oocistos/L foi detectada na água de abastecimento da cidade. Esse evento afetou cerca de 403.000 pessoas (MACKENZIE et al., 1994; FOX e LYTLE, 1996) e o principal agente etiológico detectado foi *Cryptosporidium hominis* (PENG et al., 1997). O subgenótipo Ib, posteriormente observado nas amostras referentes a esse surto, exibe acentuada virulência o que explica o grande número de pessoas infectadas naquela ocasião. Esses achados ilustram a complexa epidemiologia de *Cryptosporidium*: a presença deste protozoário no esgoto indica que há uma transmissão estável da criptosporidiose, mesmo na ausência da ocorrência de um novo surto em Milwaukee (ZHOU et al., 2003).

A despeito dos avanços da tecnologia de tratamento de água, pode-se concluir que a falta de acesso à água potável não é um problema restrito aos países em desenvolvimento, pois significantes surtos de doenças de veiculação hídrica ocorreram na América do Norte e Europa nos últimos 10-15 anos (SMITH et al., 2006).

É importante salientar que o esgoto bruto tem sido apontado como uma potencial fonte de contaminação tanto para protozoários quanto para helmintos (BOUHOUM e SWARTZBROD, 1998). Os helmintos possuem características tais como: baixa dose infectante, distribuição cosmopolita e seus ovos são altamente resistentes às condições ambientais (ARAKI, 2000) o que gera preocupações quando esgotos brutos são lançados em corpos d'água sem tratamento algum.

No caso deste estudo, a metodologia utilizada para análise de helmintos em amostras ambientais foi a NOM, em vigor desde 1997. Ela estabelece o limite de ovos de helmintos que podem estar presentes em esgoto, porém, não prevê a avaliação da viabilidade desses ovos.

Em 1999, a USEPA promulgou regulamentações para detectar e enumerar ovos de helmintos viáveis em estações de tratamento de esgoto, porém neste estudo, optou-se por não utilizar essa metodologia pelo excessivo número de etapas laboratoriais. No entanto, a metodologia da USEPA requer incubação do sedimento final durante três semanas para avaliação da viabilidade. O método da NOM não contempla tal etapa, que é de importância fundamental na epidemiologia de infecções parasitárias (VICTORICA e GALVÁN, 2003; BONATTI, 2007). Desta forma, nesta investigação foi acrescido ao método da NOM, o passo de incubação do material em placas de Petri com o objetivo de avaliar o potencial

de viabilidade dos ovos de helmintos. Esta análise também foi confirmada pelo uso do corante Azul Trypan. Este corante foi empregado pela facilidade e rapidez na realização do teste. É pouco provável que a análise de viabilidade tenha sido subestimada, pois a visualização foi feita no intervalo de 3 a 5 minutos (ALTMAN et al., 1993).

Críticas à metodologia do NOM abrangem discussões quanto à viabilidade dos ovos de helmintos quando em contato com solução ácool-ácida (ácido sulfúrico e etanol) (NELSON e DARBY, 2001). Por este motivo, neste estudo, foram introduzidas, ao protocolo original, outras modificações como a adição de uma etapa de lavagem do material com água destilada tendo como finalidade a remoção desses reagentes que poderiam reduzir a viabilidade.

Os ovos de helmintos apresentam um tamanho grande, quando comparados aos cistos e oocistos dos protozoários e, por esse motivo, a maioria é retida durante o processo de tratamento de esgoto nas ETE. O lodo de esgoto gerado pelas ETE tem sido utilizado como fertilizante agrícola, porém a concentração de helmintos é elevada. Para reverter a situação, a resolução do CONAMA 375 de 2006 “estabelece critérios e procedimentos para o uso, em áreas agrícolas, de lodo de esgoto gerado em estação de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados, visando benefícios à agricultura e evitando riscos à saúde pública e ao ambiente”.

No presente estudo, 90 % (9/10) das amostras de esgoto apresentavam positividade para helmintos (médias de $5,8 \times 10^4$ ovos/L e $4,0 \times 10^5$ larvas/L) indicando uma alta frequência desses parasitos no esgoto hospitalar.

O Brasil está alocado no grupo dos locais onde as parasitoses intestinais ainda afetam uma parcela expressiva da população: 39 % dos brasileiros apresentam-se infectados. Especificamente no Estado de São Paulo, observou-se uma diminuição na prevalência das enteroparasitoses, nos últimos 30 anos, mas mesmo as regiões do Estado com índices significativos de desenvolvimento acusam taxas de positividade ao redor de 30 %. É importante ressaltar que, no Brasil, existem marcantes desigualdades regionais quanto à infra-estrutura de abastecimento de água e serviços de esgotamento sanitário, e a Região Sudeste, onde está inserido o Estado de São Paulo, apresenta os melhores índices: 70,5 % dos domicílios são atendidos por rede de distribuição de água e 53,0 %, por redes de esgoto, segundo o IBGE.

Estudos realizados com águas de reuso, visando a irrigação agrícola mostram que, mesmo após tratamento, o efluente de esgoto estava contaminado, sendo detectadas concentrações de 7 a 160 ovos de helmintos por litro em uma plantação de tomates, no Marrocos (AYRES et al., 1992). Em Marrakesh, 73 % das crianças expostas ao esgoto bruto, estavam infectadas com um ou mais helmintos (BOUHOUM e SWARTZBROD, 1998). Em um tratamento de lagoas de estabilização, a concentração de helmintos reduziu de 60 % a 90 %, para *Ancylostoma* sp. e *Ascaris* sp., respectivamente (VALBUENA et al., 2002).

No Brasil, ovos de helmintos também foram relatados em efluente secundário, com uma concentração média de 72 ovos/L revelando que a filtração não foi suficiente para removê-los (TOSETTO, 2005).

Em suma, os resultados obtidos com relação à ocorrência natural de *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. e helmintos, sugerem que as formas de resistência desses parasitos estão presentes em altas concentrações no esgoto do Hospital de Clínicas da Unicamp. Isso gera um forte impacto em saúde pública, visto que são despejados *in natura* em mananciais. Além disso, até o momento, não há dados para a questão da presença de protozoários em esgoto hospitalar o que confirma o pioneirismo deste trabalho.

6.2 Ensaios com tratamento fotoeletroquímico

Devido ao amplo uso de antibióticos e a emergência de linhagens mais resistentes e mais virulentas de microrganismos, existe uma necessidade de desenvolver tecnologias alternativas de tratamento de esgoto hospitalar (CHITNIS et al., 2004).

A tecnologia fotoeletroquímica é considerada de grande valia visto que os produtos finais de oxidação da matéria orgânica são espécies inócuas como CO₂, água e íons inorgânicos. Ela apresenta vantagens como boa resistência mecânica, a possibilidade de ativação por luz ultravioleta, não exige a adição de qualquer reagente químico oxidante ou tratamento biológico; tem uma cinética mais rápida que os tratamentos biológicos e ocupa um espaço físico reduzido (BERTAZZOLI e PELEGRINI 2002).

O processo fotoeletroquímico é o conjunto da eletroquímica com a fotocatalise. Ele consiste na percolação da solução a ser tratada por meio de um reator eletrolítico cujo anodo, revestido com óxidos metálicos, permanece sob a

incidência da radiação UV. Essa combinação de processos, simultaneamente aplicados, apresenta um efeito sinérgico onde as taxa de eficiência de degradação observadas são até uma ordem de grandeza maior quando comparadas à soma dos resultados dos dois processos realizados individualmente (BERTAZZOLI e PELEGRINI, 2002). Com a fotocatalise, foi observada uma taxa de 20 % de destruição da concentração inicial (50 mg L^{-1}) de uma solução de fenol preparada em laboratório. Aplicando-se o processo eletroquímico, essa taxa foi de 30 % de redução e, utilizando-se a tecnologia fotoeletroquímica, a eficiência do tratamento mostrou uma taxa de 85 % de redução, confirmando que a combinação dos dois processos é mais eficiente (PELEGRINI et al., 2001). Devido a esse fato, no presente estudo, foi selecionado o processo fotoeletroquímico para verificação do dano estrutural dos protozoários avaliados.

Os radicais hidroxila formados são extremamente reativos quando em contato com compostos orgânicos, sendo considerados potentes oxidantes. Devido ao seu alto nível de reatividade, eles têm uma vida curta. Quando partículas de TiO_2 irradiadas estão em contato direto com microrganismos, a superfície microbiana é o primeiro alvo do ataque oxidativo. O fosfolípido polinsaturado é um componente integral de membranas celulares e a susceptibilidade desse composto tem sido bem documentada (MANESS et al., 1999).

A morte de células microbianas presentes em água, quando em contato com TiO_2 catalisado com luz ultravioleta foi relatada por Matsunaga et al. (1985). Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisadores elaborou uma membrana de acetilcelulose coberta com TiO_2 em pó, onde células de *E.coli* encontravam-se

mortas após passarem por essa membrana. A reação fotoquímica também causou ruptura na membrana de *Streptococcus sobrinus*, evidenciada pela falta de íons K⁺ intracelular (SAITO et al., 1992).

Evidência direta de dano na camada externa da membrana de *E.coli* foi fornecida com a comprovação de que um componente dessa camada, a endotoxina, estava destruída sob as condições fotocatalíticas com TiO₂ (SUNADA et al., 1998).

Também, documentou-se que alterações na estrutura da membrana, causadas pela oxidação lipídica são capazes de gerar trocas de configuração de proteínas e de mediadores de elétrons da membrana (MANESS et al., 1999).

6.2.1 O tratamento do esgoto hospitalar no reator fotoeletroquímico

A suspensão de cistos purificados feita no Laboratório de Protozoologia do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da Unicamp, estava com boa qualidade, visto que os cistos apresentavam suas características morfológicas evidentes e nítidas à RID, seguindo critérios internacionais rigorosos (USEPA, 2006). Essa análise foi realizada cuidadosamente para assegurar que o inóculo estivesse em boas condições visando garantir a qualidade dos ensaios. Entretanto, a suspensão de oocistos de *Cryptosporidium* spp. adquirida comercialmente para a realização dos ensaios, sofreu agregações dificultando a enumeração dos mesmos e interferindo nos procedimentos quantitativos. Na tentativa de contornar a situação de agregação de oocistos, foram feitas várias

lavagens com Tween 20 (0,1 %) e repetidas pipetagens do material para garantir a qualidade do inóculo, de acordo com instruções recebidas da empresa Waterborne Inc. Após esses procedimentos, o inóculo apresentou boas condições.

Não houve contaminação inter-ensaios, como evidenciado pelos resultados referentes ao controle negativo do reator, onde nenhum oocisto foi encontrado.

Os testes iniciais (pré-avaliação) realizados com o perclorato de sódio mostraram os primeiros indícios da destruição dos parasitos pelo radical hidroxila com a evidência de dano morfológico e sem interferências de outros componentes, pois o perclorato de sódio é um eletrólito suporte inerte, necessário para dar condutividade ao meio. Ele não é oxidado a outros produtos por estar na sua maior valência, portanto, não havia outras substâncias que pudessem interferir no processo; desta forma, é possível afirmar que a ação de destruição dos microrganismos presentes era única e exclusivamente devida aos radicais hidroxila formados na superfície do eletrodo. O fato deste experimento não ter removido 100 % dos protozoários pode estar relacionado com a falta de cloreto que, como já foi dito, potencializou a ação dos radicais hidroxila nos experimentos com a amostra de esgoto bruto. Outro fator é o tempo de tratamento estipulado de 60 minutos apenas, por se tratar de um experimento de simulação (pré-avaliação). Os cistos e oocistos inoculados nesse eletrólito suporte estavam armazenados em formalina, porém, a integridade desses protozoários foi confirmada pela visualização dos mesmos, em RID, antes de receberem o tratamento fotoeletroquímico.

Considerando-se as diferentes etapas do processo de tratamento de esgoto, a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. foi verificada em diversos trabalhos (ROBERTSON, 2000; FARIAS et al., 2002; CLANCY e McCUIN, 2003). Os tratamentos convencionais exibem valores que não chegam a 100% de remoção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp.

Em um processo de tratamento por lodo ativado, realizado em escala piloto, com 3 horas de aeração do lodo e 40 minutos de sedimentação, a remoção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. foi de 80,0 % a 84,0 % (MATURAMA et al., 1992). Para o mesmo tipo de tratamento, as taxas de remoção variam de 77,5 % para oocistos e 74,0 % para cistos na avaliação de uma ETE (CARRARO et al., 2001). Payment et al. (2001) relataram uma taxa de remoção de cistos de *Giardia* spp. de 79,0 %, enquanto que Bukhari et al. (1997) ao avaliarem 3 estações de tratamento, obtiveram taxas de remoção de cistos, variando de 26,0 % a 71,0 %.

Na Inglaterra, a redução foi de 93,8 % para cistos e 54,0 % para oocistos e mesmo após receber tratamento aeróbio, o efluente apresentou positividade de 25,5 % e 57,4 % para cistos e oocistos, respectivamente. Tal fato mostra que a redução das formas de resistência não é total o que indica uma contaminação do curso d'água com oocistos potencialmente infectantes (BUKHARI et al., 1997). É importante ressaltar que, do ponto vista de saúde pública, é problemática a presença de relatos de oocistos infectantes em amostras de efluente após receber tratamento terciário (QUINTERO-BETANCOURT et al., 2003). Isso justifica a busca por outros tipos de tratamento, principalmente em sistemas pequenos, como é o caso de hospitais.

No presente estudo, não houve disparidade entre o número de organismos inoculados e aquele detectado no tempo zero de tratamento (sem a ação do tratamento) o que exprime uma coerência dos dados obtidos. Os valores referentes ao número de organismos detectados ao longo do tratamento (t_{30} , t_{60} , t_{90}) mostram uma diminuição nas concentrações das formas parasitárias comparativamente às do tempo inicial (t_0), revelando a destruição gradativa dos cistos e oocistos (Tabela 8).

A destruição de *Cryptosporidium* spp. foi mais acentuada em comparação à de *Giardia* spp., ou seja, houve um comportamento diferente entre esses protozoários, conforme evidenciado pelos achados quantitativos (figs. 9 e 10).

Deve-se considerar que oocistos apresentam grande resistência oriunda da acentuada capacidade de compressibilidade (os oocistos são capazes de suportar traumas mecânicos) e da complexa composição bioquímica e estrutural de sua parede, conferindo-lhe impermeabilidade pela presença de quitina (GRIMASON et al., 1990; FAYER, 1994; FAYER e NERAD, 1996; FUJINO et al., 2002).

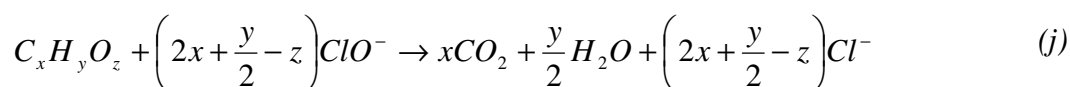
Os resultados destes ensaios sugerem uma maior resistência do protozoário *Giardia* aos processos do tratamento fotoeletroquímico. Dada a similaridade entre os oocistos e cistos quanto à organização estrutural da parede celular, torna-se difícil explicar este comportamento frente ao tratamento utilizado neste estudo. No entanto, Bonatti (2007) também observou uma acentuada resistência dos cistos de *Giardia* após 45 dias de exposição dos mesmos à luz solar, sem detectar danos significativos à parede celular do protozoário. Assim, é

importante ressaltar que, os vários dados existentes na literatura indicando uma menor resistência de *Giardia* aos desinfetantes químicos, comparativamente aos oocistos de *Cryptosporidium*, tenham sido erroneamente avaliados em função da metodologia escolhida para determinar a inativação. Hoje, é bem estabelecido que, apenas os métodos de cultivo celular e de infectividade animal são adequados para tal avaliação, pois outros protocolos como excitação e corantes vitais, superestimam a inativação dos protozoários (FINCH e BELOSEVIC, 2002).

Por outro lado, é possível que fatores inerentes à amostra de esgoto hospitalar, podem ter exercido um efeito potencializador do tratamento fotoeletroquímico o que explicaria a discrepância para um dos ensaios (taxa de destruição de 25 %, contra 73 % e 80 %). Este é um aspecto que deve ser melhor investigado em futuros estudos, sob condições controladas.

Essa destruição dos organismos nos ensaios realizados com o efluente hospitalar bruto foi mais súbita em comparação com as concentrações dos parasitos nos ensaios feitos com o eletrólito suporte (pré-avaliação) durante a etapa inicial do estudo. A presença do cloreto no efluente bruto desencadeou uma potencialização da ação de mecanismo do reator, gerando efeito sinérgico associado com a eletrólise, dos radicais hidroxila com a formação de ácido hipocloroso, proveniente do cloreto naturalmente presente no esgoto.

O cloreto se transforma em ácido hipocloroso sob a ação da eletrólise e, posteriormente, em hipoclorito. Este oxidante reage com a matéria orgânica conforme a equação (j):



A presença da alta concentração de íons cloreto (Cl^-) no efluente hospitalar se deve, possivelmente, pela sua abundância na urina e em soro fisiológico (NaCl), muito utilizado em hospitais. A diferença entre as taxas de redução observadas nos ensaios de *Giardia* (25 %, 73 % e 80 %) pode ser explicada pela variação da concentração desses componentes inerentes ao esgoto hospitalar, uma vez que as amostras utilizadas nesses ensaios foram colhidas em diferentes dias.

Nota-se que no intervalo de tempo seguinte (de t_{30} a t_{60}), a concentração de *Cryptosporidium* spp. chega zero, atingindo visualmente 100 % de destruição dos oocistos, enquanto que *Giardia* spp. atinge essa taxa no intervalo de t_{60} a t_{90} (figs. 9 e 10).

A tecnologia de tratamento aplicada neste estudo difere do tratamento com luz UV, onde o efeito mais importante da exposição de um organismo a essa irradiação é o dano no DNA; assim, os organismos permanecem presentes, sem apresentar evidência de danos externos. A irradiação UV não causa a destruição direta de *Giardia* e *Cryptosporidium*, os cistos e oocistos excistam, liberando trofozoítos ou esporozoítos vivos, mas nem todos são capazes de se reproduzir devido ao dano ocorrido na molécula do DNA. *Cryptosporidium* apresenta genes de reparo, mas, mesmo assim, não são recuperados os níveis de infectividade pré-tratamento, pois enzimas necessárias à replicação do protozoário, são irreversivelmente afetadas pela luz UV (ROCHELLE et al., 2005).

Para *Giardia*, pelo habitat do cisto ser o lúmen intestinal, pois este patógeno não é invasivo, o único método capaz de gerar resultados confiáveis é o

teste de infectividade em animais (bioensaio). Então, os dados existentes sobre a grande susceptibilidade de *Giardia* à luz UV (CLANCY et al., 2000) devem ser re-analisados sob essa premissa.

O mecanismo de ação da tecnologia eletroquímica, assim como a do ozônio, é a destruição dos organismos pela oxidação da matéria orgânica. O alvo preferencial afetado pelo agente oxidante é a parede dos organismos gerando a destruição dos mesmos pela desestabilização das moléculas que a compõe (MANESS et al., 1999). Formas do protozoário que sobrevivem ao tratamento por ozônio podem, ou não, manter sua capacidade infectante, dependendo do grau de dano à membrana celular. Portanto, a avaliação quantitativa deve ser feita antes e depois do tratamento para certificação da redução do número de organismos ou de sua total destruição.

Por último, em relação à metodologia empregada neste estudo para a avaliação de dano, em processos onde há perda da integridade da parede, a citometria de fluxo não é um método adequado para a enumeração dos organismos, pois danos gerados à membrana celular e, por extensão, aos epítomos da parede dos cistos e oocistos influenciam, de maneira prejudicial, as ligações de antígeno-anticorpo, gerando sinais negativos durante a leitura (VESEY et al., 1993b).

No caso deste estudo, a combinação de três ferramentas de visualização (RID, MCF e MEV) tornou mais confiável os dados obtidos, permitindo documentar, por exemplo, situações como a presença de poros (prancha 2, fig.

2f), o extravasamento do citoplasma do protozoário (prancha 2, fig. 2g) e o rompimento da parede celular (prancha 1, fig. 1h).

6.2.1.1 Avaliação do dano morfológico e estrutural (RID, MCF e MEV).

Os achados desta investigação, com relação à avaliação morfológica e estrutural demonstram, de forma inequívoca, que cistos de *Giardia* presentes nas amostras brutas apresentavam boas condições como atestado pela aparência lisa da superfície dos cistos e ausência de poros, formato consistentemente ovalado e tamanho compatível (fig. 11) (COGGINS e SCHAEFER III, 1984), sem demonstrar dano quando presentes no esgoto. Revelavam integridade da membrana sendo que essas confirmações foram feitas a partir da visualização e análise de 300 campos em MEV. Ainda, exibiam forte fluorescência verde-maçã brilhante na RID, sendo confirmada presença de estruturas como axonemas e núcleos com a utilização da microscopia de contraste de fase; desta forma, comprova-se que o dano documentado durante o tratamento fotoeletroquímico não era causado pelos impactos mecânicos e demais fatores possivelmente inerentes à amostra bruta, mas sim à ação do tratamento.

É pouco provável que a metodologia de concentração dos organismos (incluindo a etapa de passagem pelo éter) utilizada para a detecção e enumeração dos organismos tenha exercido influência nas deformações dos protozoários observadas ao longo do tratamento no reator fotoeletroquímico. Como evidenciado mediante a visualização de cistos e oocistos na MEV a partir de uma análise cuidadosa (prancha 1; fig. 1b e prancha 2; fig. 2b), quando presentes nas amostras brutas, as formas dos protozoários não apresentavam aparente

polaridade da parede, nem qualquer ponto óbvio de fraqueza estrutural, indicando que a destruição dos cistos e oocistos tenha ocorrido pela ação dos radicais hidroxila, nas etapas posteriores. O mesmo se aplica às micrografias da RID, onde os cistos e oocistos apresentavam o característico anel com predomínio da fluorescência verde-maçã brilhante e intensa na membrana, não exibindo alterações da forma e tamanho.

Também se descarta a possibilidade de ocorrência de qualquer dano mecânico em função da circulação da amostra no reator, pois as bactérias, por serem microrganismos mais frágeis, foram visualizadas no t_0 , ainda intactas (prancha 1; fig.1b).

Essas características continuaram a ser observadas no t_0 ; nessa análise, as formas eram facilmente visualizadas nas preparações, distinguíveis pelo seu padrão normal de fluorescência, durante a leitura da RID. Esses achados forneceram uma segunda confirmação em relação à qualidade do inóculo utilizado nos diversos ensaios.

A primeira evidência de dano surgiu após 30 minutos de tratamento, onde os cistos e oocistos passaram a exibir um aspecto apagado, gerado pela queda da intensidade de fluorescência tornando a visualização mais laboriosa e requerendo cautela na observação. Neste caso, provavelmente, os epítomos presentes na superfície podem ter sido afetados pelos radicais hidroxila, prejudicando a ligação antígeno-anticorpo durante a RID. Na análise correspondente da MEV, foi possível constatar alterações morfológicas dos oocistos, os quais revelaram reentrâncias na superfície, apresentando assim um aspecto murcho (prancha 1; fig. 1d). Neste

mesmo tempo de tratamento e de forma comparativa, os cistos de *Giardia* spp. observados pela MEV, apresentavam um menor grau de deformidades na parede, apenas sinalizando o início de sua deterioração (prancha 2; fig. 2d).

O dano da parede do oocisto de *Cryptosporidium parvum* também foi relatado e presença de dobras gerando uma acentuada alteração da forma do protozoário após 10 h de desinfecção solar (SODIS) (McGUIGAN et al., 2006).

A alteração na fluorescência de cistos de *Giardia lamblia* também pôde ser verificada após tratamento com cloro. Quando comparados com o padrão normal verde-maçã brilhante, a coloração desses cistos era desigual e em tonalidade verde-amarelada evidenciando a destruição morfológica que é proporcional à elevação da concentração do cloro. Além disso, quanto maior o tempo de exposição a esse oxidante, mais difícil tornava-se a visualização das características morfológicas utilizadas para a confirmação de identificação de cistos de *Giardia* sp. (núcleos, axonemas e corpos medianos) (SAUCH e BERMAN, 1991).

Nesta investigação, após 60 minutos de tratamento fotoeletroquímico, 100 % dos oocistos já se encontravam completamente danificados, apresentando um formato irregular, exibindo a superfície completamente descaracterizada, nitidamente enrugada e com a presença de reentrâncias (prancha 1, fig. 1f). Esses achados corroboram os dados de Curtis et al. (2002) onde a reação fotocatalise heterogênea foi capaz de danificar oocistos de *Cryptosporidium*.

Quando expostos à agentes oxidantes como permanganato de potássio a 2,5 %, modificações na estrutura da parede de oocistos de *Cryptosporidium parvum* foram observadas sendo evidentes granulações intensas na mesma. No

caso da exposição ao hipoclorito de sódio a 2 %, estes demonstravam formato irregular, com proeminências, arestas e quinas (BRASSEUR et al., 1998).

Quanto aos cistos de *Giardia* spp. tratados por 60 minutos, no presente estudo, além da diminuição da fluorescência, a parede destes organismos apresentava irregularidades como extremidades pontiagudas, quando observadas na RID (prancha 2; fig. 2e) o que tornou a visualização mais árdua. Na preparação equivalente da MEV, foi possível documentar a presença de poros na superfície dos cistos, elevando o grau de deformação (prancha 2; fig. 2f).

Nos ensaios realizados com *Cryptosporidium* spp., houve total destruição da membrana dos oocistos após 90 minutos de tratamento. Isso impossibilitou a visualização de oocistos na RID, pois esses já não estavam mais presentes, sendo observados nas preparações numerosos fragmentos diminutos com fluorescência verde-maçã brilhante. A análise correspondente, feita em MEV, comprovou o rompimento completo da parede dos oocistos (prancha 1, fig. 1h). Esse severo dano observado na MEV, na parede dos oocistos, vem confirmar a hipótese de que os oocistos expostos ao tratamento fotoeletroquímico por 90 minutos tenham se rompido, ocasionando a liberação dos esporozoítos. Ressalte-se que o tempo de sobrevivência dos esporozoítos no ambiente externo ao oocisto é de 45 minutos, se não penetrarem na célula hospedeira (SMITH et al., 2005). O rompimento da membrana favorece a chance de entrada do material oxidante e um contato deste com os esporozoítos, expressando uma ação direta sobre os mesmos. Além disso, a excitação poderia ser favorecida pela presença do hipoclorito gerado durante a eletrólise, sabendo-se que a concentração de íons cloreto é alta.

Com relação aos cistos de *Giardia*, estes também não foram encontrados no t_{90} nas visualizações de RID, porém, verificou-se a extrusão de citoplasma, confirmada pela microscopia de contraste de fase, o que comprova a destruição dos cistos (prancha 2; fig. 2g). Nesse mesmo tempo de tratamento, o fundo das preparações, na MEV, encontrava-se com aspecto limpo, uma vez que as bactérias já haviam sido destruídas considerando-se a sua menor resistência, comparativamente aos protozoários (prancha 1; fig. 1g).

O dano observado nos cistos e oocistos, após receberem o tratamento fotoeletroquímico, se deu pela ação dos radicais hidroxila, formados durante o processo o que pôde ser confirmado pelo experimento realizado com o eletrólito suporte de perclorato de sódio (Tabela 7). Esse experimento evidenciou que apenas a ação dos radicais hidroxila contribuiu para a redução do número e geração de dano morfológico de cistos e oocistos durante o tratamento, ou seja, não houve interferência de outras substâncias, dado o uso neste ensaio, do eletrólito suporte (pré-avaliação do reator).

Uma das ocorrências possíveis, quando se trabalha com o efluente hospitalar bruto, em condições naturais é a presença de íons cloreto devido aos processos de sanitização com hipoclorito das instalações hospitalares e devido à presença de resíduos de urina e soro fisiológico. As altas concentrações de cloreto, documentado no esgoto hospitalar do Hospital de Clínicas (média de 45 mg/L), podem potencializar a ação oxidativa. No anodo, o cloreto é oxidado para cloro que, em meio aquoso, permanece como hipoclorito ou ácido hipocloroso com conhecida ação oxidante. Nesta situação, o efeito oxidativo dos radicais hidroxila é

potencializado pela presença destes compostos. Ressalte-se que o hipoclorito de sódio pode causar perfurações ou remoção da camada externa da parede do oocisto (REDUCKER et al., 1985).

A composição da parede do oocisto é estabelecida por três camadas distintas compostas por material filamentoso, fibrilar e elétron-denso. Ainda, há a presença de estruturas particuladas e glicoproteína filamentosa (PETRY, 2004). É sabido que tecnologias de foto-oxidação exógena usualmente matam os microrganismos pela perturbação de regiões elétron-densas (tipicamente presentes em membranas) na superfície da célula alvo (MANESS et al., 1999; CURTIS et al., 2002). Tal fato comprova a ação dos radicais hidroxila sobre as membranas dos parasitos.

Matsunaga et al. (1985) defendem a idéia de que a oxidação direta da coenzima-A intracelular à sua forma dimérica, foi a causa do decréscimo da atividade respiratória, que por sua vez, levou à morte celular de bactérias (*Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces cerevesiae* e *Escherichia coli*). Eles ainda reportaram que o grau de morte celular era inversamente proporcional à espessura e complexidade da parede da célula.

Os cistos de *Giardia* apresentam parede com duas camadas, uma filamentosa e outra membranosa, com a porção exterior composta predominantemente de uma glicoproteína (galactosamina) (ERLANDSEN et al., 1996) e, é provável que os filamentos sejam compostos de um complexo de carboidratos e proteínas (MANNING et al., 1992). Tanto os cistos quanto os

oocistos apresentam quitina na sua composição o que lhes confere um alto grau de impermeabilidade, tornando-os mais resistentes (ZUCKERMAN et al., 2000).

Assim como a tecnologia eletroquímica, o ozônio é um tratamento que degrada a proteína da parede e conseqüentemente os trofozoítos e esporozoítos presentes internamente. Este gás não penetra profundamente nos cistos e oocistos, por esse motivo, não afeta o DNA e o RNA, mas induz uma alteração morfológica na parede do protozoário, tornando-os enrugados e apresentando contornos irregulares (WIDMER et al., 2002).

O processo fotoeletroquímico oxida moléculas orgânicas, entre elas, os lipídeos, a partir da geração de radicais hidroxila, alterando também a estrutura de membranas que, por sua vez, gera trocas da configuração de proteínas e de mediadores de elétrons da membrana (MANESS et al., 1999).

É de extrema importância ressaltar que Graczyk et al. (2007) e Bednarska et al. (2007) afirmam que os oocistos viáveis corados com FISH e RID eram predominantemente intactos, revelando um pequeno espaço entre a parede e as estruturas internas e, na maioria deles, os esporozoítos eram visíveis. Já os oocistos “inviáveis”, como determinados por FISH, com freqüência apresentavam danos claramente discerníveis à sua parede.

No presente estudo, relata-se pela primeira vez a ocorrência natural de protozoários patogênicos em amostras de esgoto hospitalar e a presença desses, por si só, já representa grande risco à saúde pública. Na necessidade de busca de soluções para o problema, o tratamento fotoeletroquímico apresenta-se como uma alternativa promissora, pois houve uma comprovação da ação dos radicais

hidroxila sobre as bactérias (Projeto FAPESP nº 02/02196-5). Diante deste cenário, era necessário averiguar se uma ação similar ocorria em relação à *Cryptosporidium* e *Giardia*, protozoários de reconhecida resistência à desinfecção química e persistência ambiental. Os resultados alcançados neste estudo demonstram a destruição de cistos e oocistos após 90 minutos de tratamento (figs. 9 e 10). No entanto, documentou-se, em ensaios independentes, a ocorrência de uma pequena parcela de organismos que mostravam alterações morfológicas, nos tempos de 30 e 60 minutos. Futuros estudos podem ser conduzidos com a finalidade de otimizar o tempo de tratamento em função da avaliação da capacidade infectante de cistos e oocistos, neste intervalo de tempo.

É preciso ressaltar que a infectividade animal é considerada uma técnica cara e de difícil execução e, pode mostrar resultados variáveis em função da resposta de cada animal infectado (CURTIS et al., 2002). Também não há, até o momento, protocolos padronizados para tal técnica (CLANCY et al., 2000), cada laboratório adotando uma metodologia própria, desde a sanitização do inóculo até a dose infectante a ser utilizada no bioensaio. Para que esses resultados possam ser comparados, há a necessidade de padronização dos protocolos.

A ampla presença dos protozoários em ecossistemas aquáticos torna imperativo o desenvolvimento de melhores estratégias de prevenção visando garantir a qualidade da água e dos alimentos, em nível global. Também para implementar e assegurar a vigilância em saúde pública, há uma clara necessidade de métodos de detecção padronizados que possam ser aplicados às amostras ambientais em situações diversas (KARANIS et al., 2007).

Os protozoários e helmintos estão presentes em altas concentrações no esgoto hospitalar do Hospital de Clínicas de Campinas que, sendo lançado *in natura* na microbacia do Rio Atibaia da região metropolitana de Campinas, representa uma séria ameaça à saúde humana, principalmente para os indivíduos menos favorecidos imunologicamente. Na busca de soluções para o problema, a tecnologia fotoeletroquímica mostrou ser uma alternativa viável, por gerar dano à parede celular dos patógenos *Cryptosporidium* e *Giardia*, mediante a desestabilização da membrana celular e, o tempo de tratamento de 90 minutos, quando nas preparações analisadas combinando-se três diferentes ferramentas, comprovou-se a destruição desses patógenos.

7. CONCLUSÕES

1. A presença dos protozoários *Cryptosporidium* e *Giardia* foi documentada nas amostras do esgoto bruto do Hospital das Clínicas da Unicamp – Campinas, com 4,1 % e 58,3 % das amostras positivas, respectivamente.
2. As concentrações de cistos e oocistos foram variáveis ao longo do período de estudo, sendo observada a média de $2,7 \times 10^3$ oocistos/L e $3,8 \times 10^5$ cistos/L.
3. Somente uma amostra do esgoto hospitalar foi positiva para *Cryptosporidium* e considerando-se um valor de pH 6,92.
4. Foi possível verificar a elevada presença de helmintos, com 90 % das amostras apresentando positividade e concentração de $5,8 \times 10^4$ ovos/L e $4,0 \times 10^5$ larvas/L mediante o emprego da técnica NOM.
5. A metodologia de centrífugo-concentração seguida de clarificação com éter foi adequada para a pesquisa de protozoários no esgoto hospitalar bruto, gerando uma eficiência de recuperação de 56,2 % para *Cryptosporidium* e 90,8 % para *Giardia*, e limites mínimos de detecção de 21,8 oocistos/mL e 22,0 cistos /mL.
6. Os dados físico-químicos revelaram uma concentração média de 45,2 mg/L de íons cloreto no efluente hospitalar bruto e variações de pH de 6,72 a 7,38.
7. O tratamento fotoeletroquímico mostrou uma redução na concentração dos protozoários nos tempos de 30 e 60 minutos e após 90 minutos, nenhum cisto ou oocisto foi detectado em ensaios independentes.

8. Foi possível constatar danos morfológicos nas superfícies dos cistos e oocistos após o tratamento fotoeletroquímico.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI, S.A.; HILL, D.L. *Giardia intestinalis*. **Curr. Opinion in Infect. Dis.** **16**:453-460, 2003.
- ALTMAN, S.; RANDERS, L.; RAO, G. Comparison of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations. **Biotechnol. Prog.** **9**: 671-679, 1993.
- AMAR, C.F.L.; DEAR, P.J.; PADRAZA-DÍAZ, S.; LOOKER, N.; LINNANE, E.; MCLAUCHLIN, J. Sensitive PCR-restriction fragment length polymorphism assay for detection and genotyping of *Giardia duodenalis* in human feces. **J. Clin. Microbiol.** **40**: 446-452, 2002.
- ARAKI, S.; GONZÁLES, J.M.; LUIS, E.; BÉCARES, E. Viability of nematode eggs in high rate algal ponds: the effect of physico-chemical conditions. **Wat. Sci. and Technol.** **42 (10)**: 371-374, 2000.
- ARROWOOD, M.J. Diagnosis *In*: FAYER, R. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. pg. 43, CRC Press, Boca Raton, Fla, 1997.
- ASSALIN, M.R. Aplicação da fotólise e fotocatalise heterogênea na desinfecção de águas contaminadas com *E.coli*. **Dissertação de Mestrado** – Faculdade de Engenharia Civil – Unicamp, 2001.
- AYRES, R.M.; STOTT, R.; MARA, D.D.; LEE, D.L. Wastewater reuse in agriculture and the risk of intestinal nematode infection. **Parasitol. Today** **8(1)**: 32-35, 1992.
- BARR, S.C.; BOWMAN, D.D.; FRONGILLO, M.F.; JOSEPH, S.L.; Efficacy of a drug combination of praziquantel, pyrantel pamoate and febanel against giardiasis in dogs. **Am. J. Vet. Res.** **59**: 1134-1136, 1998.
- BEDNARSKA, M.; BAJER, A.; SINSKI, E.; GIROUARD, A.S.; TAMANG, L.; GRACZYK, T.K. Fluorescent in situ hybridization as a tool to retrospectively identify *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in samples from terrestrial mammalian wildlife. **Parasitol. Res.** **100**: 455-460, 2007.

- BELLAMY, J.E.C. Quality assurance considerations for detection of waterborne zoonotic parasites using *Cryptosporidium* oocysts detection as the main example. **Vet. Parasitol.** **126**: 235-248, 2004.
- BELOSEVIC, M.; GUY, R.A.; TAGHI-KILANI, R.; NEUMANN, N.F.; GYÜRÉK, L.L.; LIYANAGE, L.R.J.; MILLARD, P.J.; FINCH, G.R. Nucleic acid strains as indicators of *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. **Intern. J. of Parasitol.** **27(7)**: 787-798, 1997.
- BERTAZZOLI, R.; PELEGRINI, R.; Descoloração e degradação de poluentes orgânicos em soluções aquosas através do processo fotoeletroquímico **Química Nova** **25 (3)**: 477-482, 2002.
- BIDOIA, E.D.; MARCONATO, J.C.; ROCHA-FILHO, R.C. Electrolytic treatment of wastewater from a fowl slaughterhouse using cast-iron electrodes **Bul. of Electrochemistry** **14 (6)**: 2208-230, 1998.
- BONADONNA, L.; BRIANCESCO, R.; OTTAVIANI, M.; VESCHETTI, E. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts in sewage effluents and correlation with microbial, chemical and physical water variables. **Env. Monit. and Assessment** **75**: 241-252, 2002.
- BONATTI, T,R; FRANCO, R.M.B.; CANTUSIO NETO, R.; Comparison of two methodologies for detection of *Giardia* spp. cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts in activated sludge samples from a sewage treatment plant in the city of Campinas, São Paulo State, Brazil. **J. of Wat. And Health** *In press*, 2007.
- BONATTI, T.R. Ocorrência de cistos de *Giardia* spp., oocistos de *Cryptosporidium* spp. e ovos de helmintos as família Ascarididae em amostras de lodo de esgoto. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Biologia, Unicamp, 2007.
- BOUHOUM, K.; SCHWARTZBROD, J. Epidemiological study of intestinal helminthiasis in a Marrakech raw sewage spreading zone **Zentralblatt Fur Hygiene Und Umweltmedizin** **200 (5-6)**: 553-561, 1998.

- BOZZOLA, J.J.; RUSSELL, L.D. Electron Microscopy: Principles and technics for biologists. 4^a ed. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury Massachusets, pg. 49-71, 1999.
- BRANCO, N. Avaliação da presença de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em águas minerais naturais de nascentes enteroparasitoses em duas comunidades rurais da cidade de Campos do Jordão, SP, Brasil. **Dissertação de Mestrado**, Instituto de Biologia, Unicamp, 2006.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE - Portaria 518 de 25 de Março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências.
- BRASSEUR, P.; UGEN, C.; MORENO-SABATER, A.; FAVENNEC, L.; BALLEET, J.J. Viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts in natural waters. **Folia Parasitol.** **45**: 113-116, 1998.
- BROOKES, J.D.; ANTENUCCI, J.; HIPSEY, M.; BURCH, M.D.; ASHBOLT, N.J.; FERGUSON, C. Fate and transport of pathogens in lakes and reservoirs. **Env. Intern.** **30**: 741-759, 2004.
- BUKHARI, Z.; SMITH, H.V.; SYKES, 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 treatment plant in England. **Wat. Sci. Technol.** **35 (11-12)**: 385-390, 1997.
- BUKHARI, Z.; McCUIN, R.M.; FRICKER, C.R.; CLANCY, J.L. Immunomagnetic separation of *Cryptosporidium parvum* from source water samples of various turbidities. **Appl. Env. Microbiol.** **64(11)**: 4495-4499, 1998.
- BUSS, P.M. Promoção da saúde e qualidade de vida. **Ciência e Saúde Coletiva** **5(1)**: 163-177, 2000.
- CACCIÓ, S.M.; DE GIACOMO, M.; POZIO, E. Sequence analysis of the beta-giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction

- fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. **Int. J. Parasitol.** **32**: 1023-1030, 2002.
- CACCIÓ, S.M.; THOMPSON, R.C.A.; McLAUCHLIN, J.; SMITH, H.V. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. **TRENDS in Parasitol.** **21 (9)**: 430-437, 2005.
- CANTUSIO NETO, R. Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em diferentes pontos do processo de tratamento de água, em Campinas, São Paulo, Brasil. **Dissertação de mestrado** Instituto de Biologia Unicamp, 2004.
- CANTUSIO NETO, R.; SANTOS, L.U.; FRANCO, R.M.B. Evaluation of activated sludge treatment and the efficiency of the disinfection of *Giardia* species cysts and *Cryptosporidium* oocysts by UV at a sludge treatment plant in Campinas, south-east Brazil. **Wat. Sci. Technol.** **54 (3)**: 89-94, 2006.
- CARBALLA, M; OMIL, F.; LEMA J.M.; LLOMPARTE, M.; GARCÍAS-JARES, C.; RODRÍGUEZ, I.; GÓMEZ, M.; TERMES, T. Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. **Wat. Res.** **38**: 2918-2926, 2004.
- CAROLLO, M.C.C. Caracterização molecular de *Cryptosporidium* spp. e *Cyclospora* spp. **Tese de Doutorado**. Instituto de Ciências Biomédicas. USP. 2006.
- CARRARO, E.; FEA, E.; GILLI, G. Impact of wastewater treatment plant on *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts occurring on a surface water. **Wat. Sci. Technol.** **41(7)**: 31-37, 2000.
- CARVALHO-ALMEIDA, T.T; PINTO, P.L.; QUADROS, C.M.; TORRES, D.M.; KANAMURA, H.Y.; CASIMIRO, A.M. Detection of *Cryptosporidium* sp. in non diarrheal faeces from children, in a day care center in the city of São Paulo, Brazil. **Rev. Instit. Med. Trop. São Paulo.** **48(1)**: 27-32, 2006.

- CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Cryptosporidiosis Surveillance - United States 1999–2002 and Giardiasis Surveillance - United States, 1998–2002. In: Surveillance Summaries, **MMWR 2005:54 (No. SS-1)**, January 28, 2005.
- CETESB Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental <www.cetesb.sp.gov.br> Acesso em 30 de abril de 2006.
- CHAURET, C.; SPRINGTHORPE, S.; SATTAR, S. Fate of *Cryptosporidium* oocysts, *Giardia* cysts and microbial indicators during wastewater treatment and anaerobic sludge digestion. **Can. J. Microbiol.** **45**: 257 – 262, 1999.
- CHITNIS, V.; CHITNIS, S.; VAIDYA, K.; RAVIKANT, S.; PATIL, S.; CHITNIS, D.S. Bacterial population changes in hospital effluent treatment plant in central India. **Wat. Res.** **38**: 441-447, 2004.
- CHOI, M.H.; HONG, S.T.; CHAI, J.Y.; PARK, W.Y.; YU, J.R. In vitro culture of *Cryptosporidium muris* in a human stomach adenocarcinoma cell line. **Korean J. Parasitol.** **42(1)**: 27-34, 2004.
- CLANCY, J.L.; BUKHARI, Z.; MCCUIN, R.M., RANDI, M.; MATHESON, Z.; FRICKER, C.R. USEPA method 1622. **J.A.W.W.A.** **91 (9)**: 60-68, 1999.
- CLANCY, J.L.; BUCKHARI, Z.; STERLING, C.R.; MARSHALL, M.M.; KORICH, D.G.; SCHAEFER III, F.W.; ROSEN, J. Cell culture method not yet viable. **J.A.W.W.A.** **92(4)**: 4-6, 2000.
- CLANCY, J.L.; McCUIN, R.M. Occurrence of *Cryptosporidium parvum* in wastewaters in the US. **A.W.W.A. WQTC Conference**, 2003.
- COFIE, O.O.; AGBOTTAH, S.; STRAUSS, M.; ESSEKU, H.; MONTANGERO, A.; AWUAH, E.; KONE, D. Solid-liquid separation of fecal sludge using drying beds in Ghana: implications for nutrient recycling in urban agriculture. **Wat. Res.** **40**: 75-82, 2006.
- COGGINS, J.R.; SCHAEFER III, F.W. *Giardia muris*: scanning electron microscopy of *in vitro* excystation. **Experim. Parasitol.** **57**: 62-67, 1984.

- COMNINELLIS, CH.; PLATTNER, E. Electrochemical waste-water treatment **Chimia** **42 (7-8)**: 250-252, 1988.
- 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. **Int. J. of Food Microbiol.** **109 (3)**: 215-221, 2006.
- CORREA-LOZANO, B.; COMNINELLIS, CH.; de BATTISTI, A. Sevice life of Ti/SnO₂-Sb₂O₅ anodes. **J. Appl. Electrochem.** **27(8)**: 970-974, 1997.
- COX, M.J.; ELWIN, K.; MASSAD, E.; AZEVEDO, R.S. Age-specific soroprevalence to an immunodominant *Cryptosporidium* sporozoite antigen in a Brazilian population. **Epidemiol. and Infec.** **133(5)**: 951-956, 2005.
- CRAUN, G.F. Waterborne giardiasis. In: MEYER, E.A. (Ed.) Giardiasis. 1^a ed. Amsterdam: Elsevier **3 (5)**: 267-293, 1990.
- CRAUN, G. F.; HUBBS, S. A.; FROST, F.; CALDERON, R. L.; VIA, S. H. Waterborne outbreaks of cryptosporidiosis. **J.A.W.W.A.** **90(9)**: 81-91, 1998.
- CROMPTON, D.W.T. How much ascariasis is there in the world? **J. of Parasitol.** **85**: 397 – 403, 1999.
- CURTIS, T.P.; WALKER, G.; DOWLING, B.M.; CHRISTENSEN, P.A. Fate of *Cryptosporidium* oocysts in an immobilised titanium dioxide reactor with eletric field enhancement. **Wat. Res.** **36 (9)**: 2410-3, 2002.
- DAI, X.; BOLL, J.; HAYES, M.E.; ASTON, D.E. Adhesion of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* to solid surfaces: the role of surfaces charge and hydrophobicity. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces** **34**:259-263, 2004.

- DAUGHTON, C.; TERNES, T.A. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents or subtle change? **Env. Health Perspect.** **107**: 907-938, 1999.
- DIAS, R.M.D.S.; PINTO, W.P.; CHIEFFI, P.P. Enteroparasitoses em pacientes acometidos pela Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS/HIV). **Rev. do Inst. Adolfo Lutz** **48**: 63-67, 1988.
- DILLINGHAM, R.A.; LIMA, A.A; GUERRANT, R.L. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. **Microbes and Infec.** **4**: 1059-1066, 2002.
- DROZD, C.; SCHWARTZBROD, J. Hydrophobic and electrostatic cell surfaces properties of *Cryptosporidium parvum*. **Appl. Env. Microbiol.** **62** (4): 1227-1232, 1996.
- EISENBERG, J.N. SETO, E.Y.; COLFORD, J.M.Jr.; OLIVIERI, A.; SPEAR, R.C.; An analysis of the Milwaukee cryptosporidiosis outbreak based on a dynamic model of the infection process. **Epidemiology** **9**: 255-263, 1998.
- EINSINK, J.H.; HOEK, W.V.D.; AMERASINGHE, F.P. *Giardia duodenalis* infection and wastewater irrigation in Pakistan. **Trans. of the Royal Soc. of Top. Med. and Hyg.** **100**: 538-542, 2006.
- EMMANUEL, E.; PERRODIN, Y.; KECK, G.; BLANCHARD, J.M.; VERMANDE, P. Ecotoxicological risk assessment of hospital wastewater: a proposed framework for raw effluents discharging into urban sewer network. **J. Haz. Mat.** **A117**: 1-11, 2005.
- ERLANDSEN, S.L.; BEMRICK, W.J.; PAWLEY, J. High resolution electron microscopy evidence for the filamentous structure of the cyst wall in *Giardia muris* and *Giardia duodenalis*. **J. Parasitol.** **75**: 787-797, 1989.
- ERLANDSEN, S.L.; MACECHKO, P.T.; VAN KEULEN, H. JARROLL, E.L. Formation of the *Giardia* cyst wall: studies on extracellular assembly using immunogold labeling and high resolution field emission SEM. **J. Euk. Microbiol.** **43(5)**: 416-429, 1996.

- FAPESP, Projeto PIPE nº 02/02196-5, intitulado: Utilização da tecnologia fotoeletroquímica na inativação de organismos patogênicos em efluentes hospitalares, 2002.
- FARIAS, E.W.C.; GAMBA, R.C.; PELLIZARI, H.V. Detection of *Cryptosporidium* spp. in raw and creek water in the city of São Paulo, Brazil. **Braz. J. Microbiol.** **33**: 41-43, 2002.
- FAYER, R. Effect of high temperatures on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water. **Appl. Env. Microbiol.** 60(8): 2732-2735, 1994.
- FAYER, R.; NERAD, T. Effects of low temperatures on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Appl. Environ. Microbiol.** **62** (4): 1431-1433, 1996.
- FAYER, R. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. pg. 43, CRC Press, Boca Raton, Fla, 1997.
- FAYER, R.; TROUT, J.M.; JENKINS, M.C. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water in environmental temperatures. **J. Parasitol.** **84**: 1165-1169, 1998.
- FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S.J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **Int. J. Parasitol.** **30**: 1305-1322, 2000.
- FAYER, R.; DUBEY, J.P.; LINDSY, D.S. Zoonotic protozoa: from land to sea. **TRENDS in Parasitol.** **20(11)**: 531-536, 2004.
- FELTUS, D.C.; GIDDINGS, C.W.; SCHNECK, B.L.; MONSON, T.; WARSHAUER, D.; McEVOY, J. Evidence supporting zoonotic transmission of *Cryptosporidium* spp. in Wisconsin. **J. Clin. Microbiol.** **44(12)**: 4303-4308, 2006.
- FERRARI, B.; PAXÉUS, N.; GIUDICE, R.L.; POLLIO, A.; GARRIC, J. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid and diclofenac. **Ecotoxicol. Environ. Safety.** **55**: 359-370, 2003.

- FERREIRA, M.U.; FERREIRA, C.S.; MONTEIRO, C.A. Tendência secular das parasitoses intestinais na infância na cidade de São Paulo (1984-1996). **Rev. de Saúde Pública.** **34 (6):** 73:82, 2000.
- FINCH, G.R.; BELOSEVIC, M. Controlling *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in drinking water by microbial reduction process. **J. Environ. Sci.** **1:** 17-31, 2002.
- I FÓRUM DE DISCUSSÃO DO EIXO SÃO PAULO - RIO DE JANEIRO SOBRE A EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *CRYPTOSPORIDIUM*, SANASA, Campinas, 2006.
- FÓTI, G.; GANDINI, D.; COMNINELLIS, C., Anodic oxidation of organics on thermally prepared oxide electrodes. **Current topics Electrochem.** **5:** 71-91, 1997.
- FOX, K.R.; LYTLE, D.A. Milwaukee's crypto outbreak: Investigation and recommendations. **J.A.W.W.A.** **88 (9):** 87-94, 1996.
- FRANÇA, R.B.; BRATFICH, O.J.; BERTAZZOLI, R.; FRANCO, R.M.B. O tratamento eletroquímico na desinfecção de efluentes hospitalares visando o controle de *Cryptosporidium* spp e *Giardia* spp. In: CD-ROM do **I Simpósio Internacional em Protozoários Patogênicos Emergentes e II Congresso da Sociedade Paulista de Parasitologia: meio ambiente, saneamento e impactos na saúde.** Campinas, 2004.
- 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 . **Rev. Inst. Med. Trop.** **43 (2):** 109-111, 2001.
- FRANCO, R.M.B.; CANTUSIO NETO, R. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in bottled mineral water commercialized in the city of Campinas, State of São Paulo, Brazil. **Mem. do Inst. Oswaldo Cruz** **97:** 205-207, 2002.

- FRASER, D.; DAGAN, R.; NAGGAN, L.; GREENE, V.; EL-ON, J.; ABU-RBIAH, Y.; DECKELBAUM, R.J. Natural history of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium* infections in a cohort of Israel Bedouin infants: a study of a population in transition. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **57 (5)**: 544-549, 1997.
- FRICKER, C.R.; CRABB, J. Waterborne cryptosporidiosis: detection methods and treatment options. **Adv. Parasitol.** **40**: 241-278, 1998.
- FUJINO, T. MATSUI, T.; KOBAYASHI, F.; HARUKI, K.; YOSHINO, Y.; KAJIMA, J.; TSUJI, M. The effect of heating against *Cryptosporidium* oocysts. **J. Vet. Med. Sci.** **64**: 199-200, 2002.
- GAJADHAR, A.A.; ALLEN, J.R. Factors contributing to the public health and economic importance of waterborne zoonotic parasites. **J. Vet. Parasitol.** **126**: 3-4, 2004.
- GARCIA, L.S.; BREWER, T.C.; BRUCKNER, D.A. Fluorescence detection of *Cryptosporidium* oocysts in human fecal specimens by using monoclonal antibodies. **J. Clin. Microbiol.** **25(1)**: 119-121, 1987.
- GASSER, R.B.; O'DONOGHUE, P. Isolation, propagation and characterization of *Cryptosporidium*. **Int. J. of Parasitol.** **29**: 1379-1413, 1999.
- GERBA, C.P.; SMITH JR., J. Sources of pathogenic microorganisms and their fate during land application of wastes. **J. Env. Qual.** **34**: 42-48, 2005.
- GOLDSTEIN, S.T.; JURANEK, D.D.; RAVENHOLT, O.; HIGHTOWER, A.W.; MARTIN, D.G.; MESNIK, J.L. Cryptosporidiosis: an outbreak associated with drinking water despite state-of-the-art water treatment. **Ann. Intern. Med.** **124**: 459, 1996.
- GOMÉZ-COUSO, H.; FREIRE-SANTOS, F.; MARTÍNEZ-URTAZA, J.; GARCÍA-MARTÍN, O.; ARÉZ-MAZÁS, M.E. Contamination of bivalves mollusks by *Cryptosporidium*: the need for new quality control standards. **Intern. J. of Food Microbiol.** **87**: 97-105, 2003.

- GRACZYK, T. K.; LEWIS, E.J.; GLASS, G.; DASILVA, A.J.; TAMANG, L.; GIROUARD, A.S.; CURRIERO, F.C. Quantitative assessment of viable *Cryptosporidium parvum* load in commercial oysters (*Crassostrea virginica*) in Chesapeake Bay. **Parasitol. Res.** **100**:447-253, 2007.
- GRIFFITHS, J.K. Human cryptosporidiosis: epidemiology, transmission, clinical disease, treatment and diagnosis. **Adv. Parasitol.** **40**: 37- 85, 1998.
- GRIMASON, A.M., SMITH, H.V.; SMITH,P.G.; JACKSON, M.E.; GIRDWOOD, R.W.A. Waterborne cryptosporidiosis and environmental health. **Environ. Health**, 228-233, 1990.
- GUILLOU, S.; BESNARD, V.; MURR, N.E.; FEDERIGHI, M. Viability of *Saccaromyces cerevisiae* cells exposed to low-amperage electrolysis as assessed by staining procedure and ATP content. **Intern. J. of Food Microbiol.** **88**: 85-89, 2003.
- 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. **Wat. Sci. Technol.** **50 (1)**: 239-245, 2004.
- HOMAN, W.; GORKOM, T.; KAN, Y.Y.; HEPENER, J. Characterization of *Cryptosporidium parvum* in human and animal feces by single-tube nested polymerase chain reaction and restriction analysis **Parasitol. Res.** **85**: 707-712, 1999.
- HSU, B.M.; HUANG, C. Influence of ionic strength and pH on hidrophobicity and zeta potencial of *Giardia* and *Cryptosporidium*. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. and Eng. Aspects.** **201**:201-206, 2002.
- HUNTER, P.R.; THOMPSON, R.C.A. The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium* **Int. J. for Parasitol.** **35**: 1181-1190, 2005.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. **Atlas de Saneamento**, Rio de Janeiro, 2002.

- ILHA, M.S.O.; NUNES, S.S.; SALERMO, L.S. Programa de conservação de água em hospitais: estudo de caso do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas. **Ambiente Construído** **6(1)**: 91-97, 2006.
- JENKINS, M.; TROUT, J.M.; HIGGINS, J.; DORSCH, M.; VEAL, D.; FAYER, R. Comparison of tests for viable and infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Parasitol. Res.** **89**: 1-5, 2003.
- JIMÉNEZ, B.; MAYA, C.; SÁNCHEZ, E.; ROMERO, A.; LIRA, L.; BARRIOS, J.A. Comparison of the quantity and quality of the microbiological content of sludge in countries with low and high content of pathogens. **Wat. Sci. and Technol.** **46(10)**: 17-24, 2002.
- JIMÉNEZ-CISNEROS, B.E.; MAYA-RENDÓN, C.; SALGADO-VELÁZQUEZ, G. The elimination of helminth ova, fecal coliforms, *Salmonella* and protozoan cysts by various physicochemical processes in wastewater and sludge. **Wat. Sci. and Technol.** **43(10)**: 179-182, 2001.
- KEPNER, R.L.; PRATT, J.R. Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental-samples - past and present. **Microbiol. Rev.** **58 (4)**: 603-615, 1994.
- KOSEK, M.; ALCANTARA, C.; LIMA, A.A.M.; GUERRANT, R.L. Cryptosporidiosis: an update. **Infec. Dis.** **1**: 262-269, 2001.
- KARANIS, P.; KOURENTI, C.; SMITH, H. Waterborne transmission of protozoan parasites: A worldwide review of outbreaks and lessons learnt. **J. of Wat. and Health** **5(1)**: 1-38, 2007.
- KÜMMERER, K. Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources – a review. **Chemosphere** **45**:957-969, 2001.
- LANE, S.; LLOYD, D. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia* **Critical Rev. in Microbiol.** **28 (2)**: 123-147, 2002.

- LANFREDI-RANGEL, A.; KATTENBACH, W.M.; DINIZ JR, J.A.; SOUZA, W. Trophozoites of *Giardia lamblia* may have a Golgi-like structure. **FEMS Microbiol. Lett.** **181(2)**: 245-251, 1999.
- LANZA, M.R.; BERTAZZOLI, R. Cyanide oxidation from wastewater in a flow electrochemical reactor **Indust. & Eng. Chem. Res.** **41 (1)**: 22-26, 2002.
- LAZAROVA, V.; SAVOYE, P.; JANEX, M.L.; BEATCHLEY III, E.R.; POMMEPUY, M. Advanced wastewater disinfection technologies: state of art and perspectives. **Wat. Sci. and Technol.** **40 (4-5)**: 203-213, 1999.
- LEE, S.W.; TAI, Y.C. A micro cell lysis device. **Sensors and Actuators** **73**: 74-79, 1999.
- LEVINE, N.D. Taxonomy and review of the coccidian genus *Cryptosporidium* (Protozoa, Apicomplexa) **J. Protoz.** **31(1)**: 94-98, 1984.
- LIANG, W.; QU, J.; CHEN, L.; LIU, H.; LEI, P. Inactivation of *Microcystis aeruginosa* continuous electrochemical cycling process in tube using Ti/RuO₂ electrodes. **Environ. Sci. Technol.** **39**: 4633-4639, 2005.
- LINDENAUER, K.G.; DARBY, J.L. Ultraviolet disinfection of waste-water – Effect of dose on subsequent photoreactivation. **Wat. Res.** **28(4)**: 805-817, 1994.
- LISHMAN, L.; SMYTH, S.A.; SERAFIN, K.; KLEYWEGT, S.; TOITO, J. PEART, T.; LEE, B.; SERVOS, M.; BELAND, M.; SETO, P. Occurrence and reductions of pharmaceuticals and personal care products and estrogens by municipal water treatment plants in Ontario, Canada. **Sci. of the Total Environ.** **367**: 544-558, 2006.
- LIN, S.H.; PENG, C.F. Treatment of textile wastewater by electrochemical method **Wat. Res.** **28(2)**: 277-282, 1994.
- LINDQUIST, A.; DUFOUR, A.P.; WYMER, L.J.; SCHAEFER III, F.W. Criteria for evaluation of proposed protozoan detection methods. **J. Microbiol. Methods** **37**:33-43, 1999.

- 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 no Reservatório de Salto Grande *In: Reservatório de Salto Grande [Americana]: Caracterização, impactos e propostas de manejo. São Carlos, RIMA editora, 2004.*
- LUBICKI, P.; JAYARAM, S. High voltage pulse application for the destruction of the Gram-negative bacterium *Yersinia enterocolitica*. **Bioelectrochem. and Bioenerg. 43:** 135-141, 1997.
- MACKENZIE, W.R.; HOXIE, N.J.; PROCTOR, M.E.; GRADUS M.S.; BLAIR, K.A.; PETERSON, D.E.; KAZMIERKZAC, J.J.; ADDISS, D.G.; FOX, K.R.; ROSE, J.B.; DAVIS, J.P. A Massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. **N. Engl. J. Med. 331:**161-167, 1994.
- MANESS, P.C.; SMOLINSKI, S.; BLAKE, D.M.; HUANG, Z.; WOLFRUM, E.J.; JACOBY, W.A. Bactericidal activity of photocatalytic TiO₂ reaction: toward an understanding of its killing mechanism. **Appl. Env. Microbiol. 65(9):** 4094-4098, 1999.
- MANNING, P.; ERLANDSEN, S.L.; JARROLL, E.L. Carbohydrate and amino acid analysis of *Giardia muris* cysts. **J. of Protoz. 39:**290-296, 1992.
- MARTI, M; LI, Y.; SCHRANER, E.M.; WILD, P.; KOHLER, P.; HEHL, A.B. The secretory apparatus oh an ancient eukaryotic: protein sorting to separate export pathways occurs before formation of transient Golgi-like compartments. **Moll. Biol. Cell. 14:** 1433-1447, 2003.
- MASSANET-NICOLAU, J. New method using sedimentation and immunomagnetic separation for isolation and enumeration of *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia lamblia* cists. **Appl. Envir. Microb. 69 (11):** 6758-6761, 2003.
- MATSUNAGA, T.; NAMBA, Y.; NAKAJIMA, T. Electrochemical sterilization of microbial cells. **Bioelectrochem. and Bioenerg. 13:** 393-400, 1984.

- MATSUNAGA, T.; TOMADA, R.; NAKAJIMA, T.; WAKE, H. Photochemical sterilization of microbial cells by semiconductor powders. **FEMS Microbiol. Lett.** **29**: 211-214, 1985.
- MATURAMA, V.M.I.; ARES-MAZÁS, M.E.; DURAN-OREIRO, D.; LONRENZO-LORENZO, M.J. Efficacy of activated sludge in removing *Cryptosporidium parvum* oocysts from sewage. **Appl. Environ. Microbiol.** **58** (11): 3514-3516, 1992.
- MAZZO, T.M.; SACZK, A.A.; UMBUZEIRO, G.A.; ZANONI, M.V.B. Analysis of aromatic amines in surface waters receiving wastewater from a textile industry by liquid chromatographic with electrochemical detection. **Annalytical Lett.** **39** (14): 2671-2685, 2006.
- McCUIN, R.M.; CLANCY, J.L. Methods for the recovery, isolation and detection of *Cryptosporidium* oocysts in wastewaters. **J. Microbiol. Meth.** **63**(1):73-88, 2005.
- McGUIGAN, K.G.; MÉNDEZ-HERMIDA, F.; ARES-MAZÁS, E.; KEHOE, S.C.; BOYLE, M.; SICHEL, C.; FERNÁNDEZ-IBÁÑEZ, P.; MEYER, B.P.; RAMALINGHAM, S.; MEUER, E.A. Batch solar disinfection inactivates oocysts of *Cryptosporidium parvum* and cysts of *Giardia muris* in drinking water. **J. Appl. Microbiol.** **101**: 453-463, 2006.
- McLAUCHLIN, J. PEDRAZA-DIAZ, S.; AMAR-HOETZENEDER, Z. NICHOLS, G.L. Genetic characterization of *Cryptosporidium* strains from 218 patients with diarrhea diagnosed as having sporadic cryptosporidiosis **J. Clin. Microbiol.** **37**:3153-3158, 1999.
- MEAD, J.R. Cryptosporidiosis and the challenges of chemotherapy. **Drug Resistance Updates** **5**: 47-57, 2002.
- MEDEIROS, M.I.C.; NEME, S.N.; SILVA, P.; CAPUANO, D.M.; ERRERA, M.C.; FERNANDES, S.A.; DO VALE, G.R.; DE AVILA, F.A. Etiology of acute diarrhea among diagnosed as having sporadic cryptosporidiosis. **J. Clin. Microbiol.** **37**: 3153-3158, 1999.

- MEISEL, J.L.; PERERA, D.R.; MELIGRO, C.; RUBIN, C.E. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. **Gastroenterology** **70**:1156-1160, 1976.
- MÉXICO – Norma Oficial Mexicana (NOM-001-Ecol.) Técnica para la determinación y cuantificación de huevos de helmintos. Disponível em: www.una.com.mx/content/sanidad/001ecol.pdf , 1996.
- MORAES, P.B.; BERTAZZOLI, R. Electro-degradation of landfill leachate in a flow electrochemical reactor **Chemosphere** **58(1)**: 41-46, 2005.
- MORGAN, U.M.; SARGENT, K.D.; DEPLAZES, P.; FORBES, D.A.; SPANO, F. HERTZBERG, H.; ELLIOT, A.; THOMPSON, R.C.A. Molecular characterization of *Cryptosporidium* from various hosts **Parasitol.** **117**: 31-37, 1998.
- MORGAN-RYAN, U.M. FALL, A.; WARD, L.; HIJJAWI, N.; SULAIMAN, I.; FAYER, F.; THOMPSON, R.C.A.; OLSON, M.; LALA, L.; XIAO, L. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from Homo sapiens **J. Eukariotic. Microbiol.** **49**: 433-440, 2002.
- MUNIZ, P.T.; FERREIRA, M.U.; FERREIRA, C.S.; CONDE, W.L.; MONTEIRO, C.A. Intestinal parasitic infections in young children in São Paulo, Brazil: prevalences, temporal trends and associations with physical growth **Ann. Trop. Med. Parasitol.** **96(5)**: 503-512, 2002.
- NAUMCZYK, J. SZPYRKOWICZ, L.; ZILIO-GRANDI, F. Electrochemical treatment of textile wastewater **Wat. Sci. Technol.** **34(11)**: 17-24, 1996.
- NEUMANN, N.F.; GYÜRÉK, L.L.; FINCH, G.R.; BELOSEVIC, M. Intact *Cryptosporidium parvum* oocysts isolated after in vitro excystation are infectious to neonatal mice. **FEMS Microbiol. Lett.** **183**: 331-336, 2000.
- NELSON, K.L.; DARBY, J.L. Inactivation of viable *Ascaris* eggs by reagents during enumeration **Appl. Environ. Microb.** **67 (12)**: 5453 – 5459, 2001.

- NIME, F.A.; BUREK, J.D.; PAGE, D.L.; et al. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium* **Gastroenterology** **70**: 592-598, 1976.
- NITHIUTHAI, S.; ANANTAPHRUTI, M.T.; WAIKAGUL, J.; GAJADHAR, A. Waterborne zoonotic helminthiasis. **Vet. Parasitol.** **126**: 167-193, 2004.
- O'CONNOR, G.A.; ELLIOTT, H.A.; BASTA, N.T.; BASTIAN, R.K.; PIERZYNSKI, G.M.; SIMS, R.C.; SMITH JR., J.E. Sustainable land application: an overview **J. Environ. Qual.** **34**:7-17, 2005.
- 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. Unicamp, 2005.
- ONDA, K.; NAAKMURA, Y.; TAKATOH, C.; MIYA, A.; KATSU, Y. The behavior of estrogenic substances in the biological treatment process of sewage. **Wat. Sci. and Technol.** **47(9)**: 109-116, 2003.
- OPAS - **Organização Pan-americana da Saúde** Centro Pan-Americano de Engenharia Sanitária e Ciências do Ambiente. Guia para manejo interno de resíduos sólidos em estabelecimentos de saúde. Tradução de Carol Castilho Arguello. Brasília, 1997.
- ORTEGA, Y.R.; ADAM, R.D. *Giardia*: overview and update. **Clin. Infect. Dis.** **25 (3)**: 545-549, 1997.
- OSUGI, M.E.; UMBUZEIRO, G.A.; DE CASTRO, F.J.V.; ZANONI, M.V.B. Photoelectrocatalytic oxidation of remazol turquoise blue and toxicological assessment of its oxidation products. **J. Haz. Mat. B** **137**: 871-877, 2006.
- PARKINSON, A.J.; BUTLER, J.C. Potencial impacts of climate change on infectious diseases in the arctic. **Int. J. of Circumpolar Health** **64(5)**: 478-485, 2005.
- PATERMARAKIS, G.; FOUNTOUKIDIS, E. Disinfection of water by electrochemical treatment. **Wat. Res.** **24(12)**:1491-1496, 1990.

- PAULINO, R.C.; CASTRO, E.S.; THOMAZ-SOCCOL, V. Tratamento anaeróbio de esgoto e sua eficiência na redução da viabilidade de ovos de helmintos. **Rev. da Soc. Bras. de Med. Trop.** **34(5)**: 421-428, 2001.
- PAYMENT, P.; PLANTE, R.; CEJKA, P. Removal of indicator bacteria, human enteric viruses, *Giardia* cysts, *Cryptosporidium* oocysts at a large wastewater primary treatment facility. **Can. J. Microbiol.** **47**: 188-193, 2001.
- PELEGRINI, R.; PERALTA-ZAMORA, P. ANDRADE, A. R.; REYES, J.; DURAN, N. Eletrochemically assisted photocatalytic degradation of reactive dyes. **Appl. Cat. B Environ.** **22 (2)**: 83- 90, 1999.
- PELEGRINI, R.; REYES, J.; DURAN, N.; PERALTA-ZAMORA, P.; ANDRADE, A. R. Photoelectrochemical degradation of lignin **J Appl. Electrochem.** **30**: 953-958, 2000.
- PELEGRINI, R.; FREIRE, R. S.; DURAN, N.; BERTAZZOLI, R. Photo-assisted electrochemical degradation of organic pollutants on a DAS type oxide electrode. **Environ. Sci. Tech.** **35**: 2849-2853, 2001.
- PENG, M.M.; XIAO, L.; FREEMAN, A.R.; ARROWOOD, M.J.; ESCALANTE, A.A.; WELTMAN, A.C.; ONG, C.S.L.; MAC KENZIE, W.R.; LAL, A.A.; BEARD, C.B. Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: evidence of two distinct human transmission cycles. **Emerg. Infect. Dis.** **30 (4)**: 567-573, 1997.
- PENG, W.; XIANMIN, Z.; CROMPTON, D.W.T. Ascariasis in China. **Adv. in Parasitol.** **41**: 110-148, 1998.
- PESSÔA, S.B. e MARTINS, A.V. Parasitologia Médica. Guanabara Koogan. 10ªed., 1978.
- PETRY, F. Structural analysis of *Cryptosporidium parvum*. **Microscopy and Microanalysis** **10**: 586-601, 2004.
- PHILIPPI JR, A. Saneamento, Saúde e Ambiente – Fundamentos para um desenvolvimento sustentável. Ed Manole, Barueri, SP, 2005.

- PRADO, M.S.; STRINA, A.; BARRETO, M.L.; OLIVEIRA-ASSIS, A.M.; PAZ, L.M.; CAIRNCROSS, S. Risk factors for infection with *Giardia duodenalis* in pre-school children in the city of Salvador, Brazil. **Epidemiol. Infect.** **131**: 899-906, 2003.
- PRADO, M.S.; CAIRNCROSS, S.; STRINA, A.; BARRETO, M.L.; OLIVEIRA-ASSIS, A.M.; REGO, S. Asymptomatic giardiasis and growth in young children; a longitudinal study in Salvador, Brazil. **Parasitol.** **131**: 52-56, 2005.
- QUINTERO-BETANCOURT, W.; GENNACARO, A.L.; SCOTT, T.M.; ROSE, J.B. Assessment of methods for detection of infectious *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in reclaimed effluents. **Appl. Environ. Microbiol.** 69(9): 5380-5388, 2003.
- RAMIREZ, N.E; WARD, L.A.; SREEVATSAN, S. A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. **Microbs. Infect.** **6**: 773-785, 2004.
- READ, C.; WALTERS, J.; ROBERTSON, I.D.; THOMPSON, R.C.A. Correlation between genotypes of *Giardia duodenalis* and diarrhea **Int. J. of Parasitol.** **32**: 229-231, 2001.
- REBOUÇAS, A.C.; BRAGA, B.; TUNDISI, J.G. Águas doces do Brasil: capital ecológico, uso e conservação. 2ª Edição. São Paulo, Escrituras editora, 2002.
- RENDTORFF, R.C. The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. II. *Giardia lamblia* cysts given in capsules. **Am. J. Hyg.** **59**:209–220,1954.
- REDUKER, D.W.; SPEER, C.A.; BLIXT, J.A. Ultrastructural changes in the oocyst wall during excystation of *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa; Eucoccidiorida). **Can. J. of Zool.** **63**: 1892-1895, 1985.
- RICHARDSON, A.J.; FRANKENBERG, R.A.; BUCK, A.C.; SELKON, J.B.; COLBOURNE, J.S.; PARSON, J.W.; MAYONWHITE, R.T. An outbreak of

- waterborne cryptosporidiosis in Swindon and Oxfordshire. **Epidemiol. Infect.** **107**: 485-495, 1991.
- ROBERTSON, L.J.; PATON, C.A.; CAMPBELL, A.T.; SMITH, P.G.; JACKSON, M.H.; GILMOUR, R.A.; BLACK, S.E.; STEVENSON, D.A.; SMITH, H.V. *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts at sewage treatment works in Scotland, UK. **Wat. Res.** **34(8)**: 2310-2322, 2000.
- ROBERTSON, L.J.; FORBERG, HERMANSEN, L.; GJERDE, B.K.; ALVSÅG, J.O.; LANGE LAND, N. *Cryptosporidium parvum* infections in Bergen, Norway, during an extensive outbreak of waterborne giardiasis in autumn and winter. **Appl. Env. Microbiol.** **72(3)**: 2218-2220, 2006.
- ROCHELLE, P.A.; FALLAR, D.; MARCHALL, M.M.; MONTELONE, B.A.; UPTON, S.J.; WOODS, K. Irreversible UV inactivation of *Cryptosporidium* spp. Despite the presence of UV repair genes. **J.Euk. Microbiol.** **51(5)**: 553-562, 2004.
- ROCHELLE, P.A.; UPTON, S.J.; MONTELONE, B.A.; WOODS, K. The response of *Cryptosporidium parvum* to UV light. **TRENDS in Parasitol.** **21(2)**: 81-87, 2005.
- ROMPRÉ, A.; SERVAIS, P.; BAUDART, J.; ROUBIN, M.R.; LAURENT, P. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. **J. Microbiol. Meth.** **49**: 31-54, 2002.
- ROSE, J.B.; HUFFMAN, D.E.; GENNACCARO, A. Risk and control of waterborne cryptosporidiosis. **FEMS. Microbiol. Rev.** **26**: 113-123, 2002.
- ROSSIGNOL JA, AYOUB A, AYERS MS. Treatment of diarrhea caused by *Cryptosporidium parvum*: a prospective randomized, double-blind, placebo-controlled study of nitazoxanide. **J. Infect. Dis.** **184**:103–106, 2001.
- RUECKER, N.J.; BOUNSOMBATH, N.; WALLIS, P.; ONG, C.S.L.; ISAAC-RENTON, J.L.; NEUMANN, N.F. Molecular forensic profiling of

- Cryptosporidium* species and genotypes in raw water. **Appl. Env. Microbiol.** **71(12)**: 8991-8994, 2005.
- SAITO, T.; IWASE, T.; MORIOKA, T. Mode of photocatalytic bactericidal action of powdered semiconductor TiO₂ on mutans streptococci. **J. Photobiol. B. Biol.** **14**: 369-379, 1992.
- SALERMO, L.S. Aplicação de ferramentas da mentalidade enxuta e da manutenção autônoma aos serviços de manutenção dos sistemas prediais de água. **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de Eng. Civil, arquitetura e Urbanismo. Unicamp, 2005.
- SANTOS, L.U.; BONATTI, T.R.; CANTUSIO NETO, R.; FRANCO, R.M.B., Occurrence of *Giardia* cists and *Cryptosporidium* oocysts activated sludge samples in Campinas, SP, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo** **46(6)**: 309-313, 2004.
- SAUCH, J.; BERMAN, D. Immunofluorescence and morphology of *Giardia lamblia* cysts exposed to chlorine. **Appl. Environ. Microbiol.** **57 (5)**: 1573-1575, 1991.
- SAVALL, A. Electrochemical treatment of industrial organic effluents. **Chimia** **49 (1-2)**: 23- 27, 1995.
- SAVIOLI, L.; SMITH, H.; THOMPSON, A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join “Neglected Diseases Initiative”. **TRENDS in Parasitol.** **22**: 203-208, 2006.
- SCHNEIDER, E.V.; EMMERICH, R.C.; DUARTE, V.C.; ORLANDIN, S.M. Manual de gerenciamento de resíduos sólidos em serviço de saúde. 2ªed. Caxias do Sul, RS: Educ, 2004.
- SEARCY, K.E.; PACKMAN, A.I.; ATWILL, E.R.; HARTER, T. Association of *Cryptosporidium parvum* with suspended particles: impact on oocyst sedimentation. **Appl. Environ. Microbiol.** **71(2)**: 1072-1078, 2005.
- SHAPHERD, K.M.; WYN-JONES, A.P. An evaluation of methods for the simultaneous detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water. **Appl. Env. Micrbiol.** **62 (4)**: 1317-1322, 1996.

- SHE, P.; SONG, B.; XING, X.H.; VAN LOOSDRECHT, M.; LIU, Z. Electrolytic stimulation of bacteria *Enterobacter dissolvens* by a direct current. **Biochem. Eng. J.** **28**: 23-29, 2006.
- SINGER, P.C. Formation and control of disinfection by-products in drinking water. **A.W.W.A.** Denver, 424 p., 1999.
- ŠLAPETA, J. *Cryptosporidium* species found in cattle: a proposal for a new species. **TRENDS in Parasitol.** **22(10)**: 469-474, 2006.
- ŠLAPETA, J. Response to Xiao *et al.*: Further debate on the description of *Cryptosporidium pestis*. **TRENDS in Parasitol.** **23 (2)**: 42-43, 2007.
- SLIFKO, T. FRIEDMAN, D.; ROSE, J.B.; JAKUBOWSKY, W. An *in vitro* method for detecting infectious *Cryptosporidium* oocysts with cell culture. **Appl. Env. Microbiol.** **63**: 3669-3675, 1997.
- SLIFKO, T.R., SMITH, H.V., ROSE, J.B. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. **Int. J. Parasitol.** **30**: 1379-1393, 2000.
- SMITH, A.L.; SMITH, H.V. A comparison of fluorescein diacetate and propidium iodide staining and *in vitro* excystation for determining *Giardia intestinalis* cyst viability. **Parasitology** **99**:329-331, 1989.
- SMITH H.V. Detection of parasites in the environment. **Parasitol.** **117**: S113 - S141, 1998.
- SMITH, H.V.; CAMPBELL, B.M.; PATON, C.A.; NICHOLS, R.A.B. Significance of enhanced morphological detection of *Cryptosporidium* oocysts in water concentrates determined by using 4',6'-diamidino-2-phenylindole and immunofluorescence microscopy. **Appl. Env. Microbiol.** **68(10)**: 5198-5201, 2002.
- SMITH, H.V.; NICHOLS, R.A.B.; GRIMASON, A.M. *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of matter **TRENDS in Parasitol.** **21 (3)**: 133-142, 2005.

- SMITH, A.; REACHER, M.; SMERDON, W.; ADAK, G.K.; NICHOLS, G.; CHALMERS, R.M. Outbreak of waterborne infectious intestinal disease in England and Wales, 1992-2003. **Epidemiol. Infect.** **134** (1): 1-9, 2006.
- SOBOTKA, J. The efficiency of water treatment and disinfection by means of ultraviolet radiation. **Wat. Sci. Technol.** **27** (3-4): 343-346, 1993.
- SODRÉ, F.C.; FRANCO, R.M.B. Novos aspectos sobre um tema conhecido: *Cryptosporidium*. **Rev. Bras. An. Clín.** **33**(2): 97-107, 2001.
- SOLO-GABRIELE, H.; NEUMEISTER, S. US outbreaks of cryptosporidiosis. **J.A.W.W.A.** **88** (9):76-86, 1996.
- STONER, G.E.; CAHEN JR., G.L. The mechanism of low frequency a.c. electrochemical disinfection. **J. Electroanal. Chem.** **141**: 229-243, 1982.
- SUNADA, K.; KIKUCHI, Y.; HASHIMOTO, K.; FUJISHIMA, A. Bactericidal and detoxification effects of TiO₂ thin film photocatalysts. **Env. Sci. Technol.** **32**: 726-728, 1998.
- SUNNOTEL, O.; LOWERY, C.J.; MOORE, J.E.; DOOLEY, J.S.G.; XIAO, L.; MILLAR, B.C.; ROONEY, P.J.; SNELLING, W.J. *Cryptosporidium* **Lett. in Appl. Microbiol.** **43**: 7-16, 2006.
- SURESH, K.; SMITH, H.V.; TAN, T.C. Viable *Blastocystis* cysts in Scottish and Malasian sewage samples. **Appl. Env. Microbiol.** **71**(9): 5619-5620, 2005.
- TANRIVERDI, S.; MARCOVICS, A.; ARSLAN, M.O.; ITIK, A.; SHKAP, V.; WIDMER, G. Emergence of distinct genotypes of *Cryptosporidium parvum* in structured host populations. **Appl. Env. Microbiol.** **72**(4): 2507-2513, 2006.
- THOMPSON, R.C.A. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. **Int. J. Parasitol.** **30**: 1250-1267, 2000.

- THOMPSON, A. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. **Vet. Parasitol.** **126**: 15-35, 2004.
- TOMBES, A.S.; LANDFRIED, S.S.; WILLIAMS, L.D. Surface morphology of *Giardia* cysts recovered from a variety of hosts *In*: "Waterborne transmission of giardiasis" (W. Jakubowsky and J.C. Hoff) USEPA, 1979.
- TOSETTO, M.S. Tratamento terciário de esgoto sanitário para fins de reuso urbano. **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo, Unicamp, 2005.
- TOVAR, J.; LÉON-AVILA, G.; SÁNCHEZ, L.B.; SUTAK, R.; TACHEZY, J.; VAN DER GIEZEN, M.; HERNÁNDEZ, M.; MÜLLER, M.; LUCOCQ, J.M. Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. **Nature** **426**: 172-176, 2003.
- TRAUB, R.J.; MONIS, P.; ROBERTSON, I.; IRWIN, P.; MENCKE, N.; THOMPSON, R.C.A. Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same community **Parasitol.** **128**: 253-262, 2004.
- TSAI, C.T.; LAI, J.S.; LIN, S.T. Quantification of pathogenic microorganisms in the sludge from treated hospital wastewater **J. Appl. Microbiol.** **85**: 171-176, 1998.
- TSAI, C.T.; LIN, S.T. Desinfection of hospital waste sludge using hypochlorite and chlorine dioxide **J. Appl. Microbiol.** **86**: 827-833, 1999.
- TZIPORI, S.; CAMPBELL, I. Prevalence of *Cryptosporidium* antibodies in 10 animal species. **J. Clin. Microbiol.** **14**: 455-456, 1998.
- TZIPORI, S.; WARD, H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. **Microbes and Infect.** **4**: 1047-1058, 2002.
- UDEH, P.J.; JOHN, G.; VEENSTRA, J.N. Field inactivation of oocysts exposed to agricultural land. **Wat. , Air and Soil Pollut.** **142**: 211-228, 2003.

- UNESCO United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization
Disponível em: <www.unesco.org/water/wwap> Acesso em junho de 2003.
- UNICAMP Universidade Estadual de Campinas. Disponível em:
<www.hc.unicamp.br/servicos/estatistica> Acesso em abril de 2005.
- UNICAMP Universidade Estadual de Campinas. Disponível em:
<www.hc.unicamp.br/institucional/institucional.shtml> Acesso em março de 2007.
- UNICEF – Fundo das Nações Unidas para a Infância. Disponível em:
<www.unicef.org/brazil> Acesso em Maio de 2006.
- USEPA – United States Environmental Protection Agency – Disponível em:
<www.epa.gov/ogwdw/lt2/training/module-microscopy> Acesso em agosto de 2006.
- VALBUENA, D.; DIAZ-SUAREZ, O.; BOTERO-LEDESMA, L.; CHENG, N.G. Detection of intestinal helminthes and contamination-indicator bacteria in treated and untreated wastewater. **Interciencia** **27 (12)**: 710-714, 2002.
- VESEY, G.; SLADE, J.S.; BYRNE, M.; SHEPHERD, H.; FRICKER, C.R. A new method for the concentration of *Cryptosporidium* oocysts from water. **J. Appl. Bacteriol.** **75**: 82-86, 1993 a.
- VESEY, G.; SLADE, J.S.; BYRNE, M.; SHEPHERD, H.; DENNIS, P.J.L.; FRICKER, C.R. Routine monitoring of *Cryptosporidium* oocysts in water using flow cytometry. **J. Appl. Bacteriol.** **75**: 75-87, 1993 b.
- VICTORICA, J.; GALVÁN, M. Preliminary testing of a rapid coupled methodology for quantitation/viability determination of helminths eggs in raw and treated water **Wat. Res.** **37**: 1278-1287, 2003.
- VIEIRA, M.B.C.M. Verificação da ocorrência de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* e indicadores bacterianos nos esgotos sanitários da bacia do Ribeirão Arrudas, Belo Horizonte-MG. In: IX Silubesa – Simpósio Luso-Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2000.

- WHITE, A.C.; FLANIGAN, Cryptosporidiosis **Cur. Treatment Options in Infect. Dis.** 5: 301-306, 2003.
- WIDMER, G.; TZIPORI, S.; FITCHTENBAUM,C.J.; GRIFFITHS, J.K. Genotypic and phenotypic characterization of *Cryptosporidium parvum* isolates from people with AIDS **J. Infec. Dis.** **178**: 834-840, 1998.
- WIDMER, G.; CLANCY, T.; WARD, H.D.; MILLER, D.; BATZER, G.M.; PEARSON, C.B.; BUKHARI, Z. Structural and biochemical alterations in *Giardia lamblia* cists exposed to ozone. **J. Parasitol.** **88 (6)**: 1100-1106, 2002.
- WEN, X; DING, H.; HUANG, X.; LIU, R. Treatment of hospital wastewater using a submerged membrane bioreactor. **Process Biochem.** **39**: 1427-1431, 2004.
- WEBER, R.; BRYAN, R.T.; BISHOP, H.S.; WAHLQUIST, S.P.; SULLIVAN, J.J.; JURANEK, D.D. Threshold of detection of *Cryptosporidium* oocysts in human stool specimens: evidence for low sensitivity of current diagnostic methods. **J. Clin. Microbiol.** **29 (7)**: 1323-1327, 1991.
- XIAO, L.; ALDERISIO, K.; LIMOR, J.; ROYER, M.; LAL, L. Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a small sub-unit rRNA-based diagnostic and genotyping tool. **Appl. Env. Microbiol.** **66**: 5492-5498, 2000.
- XIAO, L.; SINGH, A.; LIMOR, J.; GRACZYK, T.K.; GRADUS, S.; LAL, A. Molecular characterization of *Cryptosporidium* oocysts in samples of raw surface water and wastewater. **Appl. Env. Microbiol.** **67(3)**: 1097-1101, 2001.
- XIAO, L.; FAYER, R.; RYAN, U.; UPTON, S.J. *Cryptosporidium* Taxonomy: recent advances and implications for public health. **Clin. Microbiol. Rev.** **17 (1)**: 72 – 97, 2004.
- XIAO, L.; FAYER, R.; RYAN, U.; UPTON, S.J. Response to the newly proposed species *C. pestis*, **TRENDS in Parasitol.** **23 (2)**: 41-42, 2006.

- ZHOU, L.; SINGH, A.; JIANG, J.; XIAO, L. Molecular surveillance ao *Cryptosporidium* spp. in raw water in Milwaukee : implications for understanding outbreak occurrence and transmtion dynamics. **J. Clin. Microbiol.** **41(11)**: 5254-5257, 2003.
- ZIOLLI, R. L.; JARDIM, W.F. Mecanismo de fotodegradação de compostos orgânicos catalisada por TiO₂ **Química Nova** **21(3)**: 319-325, 1998.
- ZUCKERMAN, U.; ARMON, R.; YUDITZKY, A.; GOLD, D. Chitin a structural component of *Cryptosporidium* oocysts wall. **J. Euk. Microbiol.** **47(2)**: 13A-13A, 2000.

9. ANEXOS

9.1 ANEXO I

**MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE
CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE-CONAMA
RESOLUÇÃO Nº 358, DE 29 DE ABRIL DE 2005**

*Dispõe sobre o tratamento e a
disposição final dos resíduos
dos serviços de saúde e dá
outras providências.*

O CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE-CONAMA, no uso das competências que lhe são conferidas pela Lei nº 6.938, de 31 de agosto de 1981, regulamentada pelo Decreto nº 99.274, de 6 de julho de 1990, e tendo em vista o disposto em seu Regimento Interno, anexo à Portaria nº 499, de 18 de dezembro de 2002, e o que consta do Processo nº 02000.001672/2000-76, volumes I e II, resolve:

Considerando os princípios da prevenção, da precaução, do poluidor pagador, da correção na fonte e de integração entre os vários órgãos envolvidos para fins do licenciamento e da fiscalização;

Considerando a necessidade de aprimoramento, atualização e complementação dos procedimentos contidos na Resolução CONAMA nº 283, de 12 de julho de 2001, relativos ao tratamento e disposição final dos resíduos dos serviços de saúde, com vistas a preservar a saúde pública e a qualidade do meio ambiente;

Considerando a necessidade de minimizar riscos ocupacionais nos ambientes de trabalho e proteger a saúde do trabalhador e da população em geral;

Considerando a necessidade de estimular a minimização da geração de resíduos, promovendo a substituição de materiais e de processos por alternativas de menor risco, a redução na fonte e a reciclagem, dentre outras alternativas;

Considerando que a segregação dos resíduos, no momento e local de sua geração, permite reduzir o volume de resíduos que necessitam de manejo diferenciado;

Considerando que soluções consorciadas, para fins de tratamento e disposição final de resíduos de serviços de saúde, são especialmente indicadas para pequenos geradores e municípios de pequeno porte;

Considerando que as ações preventivas são menos onerosas do que as ações corretivas e minimizam com mais eficácia os danos causados à saúde pública e ao meio ambiente;

Considerando a necessidade de ação integrada entre os órgãos federais, estaduais e municipais de meio ambiente, de saúde e de limpeza urbana com o objetivo de regulamentar o gerenciamento dos resíduos de serviços de saúde, resolve:

Art. 1º Esta Resolução aplica-se a todos os serviços relacionados com o atendimento à saúde humana ou animal, inclusive os serviços de assistência domiciliar e de

trabalhos de campo; laboratórios analíticos de produtos para saúde; necrotérios, funerárias e serviços onde se realizem atividades de embalsamamento (tanatopraxia e somatoconservação); serviços de medicina legal; drogarias e farmácias inclusive as de manipulação; estabelecimentos de ensino e pesquisa na área de saúde; centros de controle de zoonoses; distribuidores de produtos farmacêuticos; importadores, distribuidores e produtores de materiais e controles para diagnóstico *in vitro*; unidades móveis de atendimento à saúde; serviços de acupuntura; serviços de tatuagem, entre outros similares.

Parágrafo único. Esta Resolução não se aplica a fontes radioativas seladas, que devem seguir as determinações da Comissão Nacional de Energia Nuclear-CNEN, e às indústrias de produtos para a saúde, que devem observar as condições específicas do seu licenciamento ambiental.

Art. 2º Para os efeitos desta Resolução considera-se:

I - agente de classe de risco 4 (elevado risco individual e elevado risco para a comunidade): patógeno que representa grande ameaça para o ser humano e para os animais, representando grande risco a quem o manipula e tendo grande poder de transmissibilidade de um indivíduo a outro, não existindo medidas preventivas e de tratamento para esses agentes;

II - estabelecimento: denominação dada a qualquer edificação destinada à realização de atividades de prevenção, produção, promoção, recuperação e pesquisa na área da saúde ou que estejam a ela relacionadas;

III - estação de transferência de resíduos de serviços de saúde: é uma unidade com instalações exclusivas, com licença ambiental expedida pelo órgão competente, para executar transferência de resíduos gerados nos serviços de saúde, garantindo as características originais de acondicionamento, sem abrir ou transferir conteúdo de uma embalagem para a outra;

IV - líquidos corpóreos: são representados pelos líquidos cefalorraquidiano, pericárdico, pleural, articular, ascítico e amniótico;

V - materiais de assistência à saúde: materiais relacionados diretamente com o processo de assistência aos pacientes;

VI - príon: estrutura protéica alterada relacionada como agente etiológico das diversas formas de encefalite espongiforme;

VII - redução de carga microbiana: aplicação de processo que visa a inativação microbiana das cargas biológicas contidas nos resíduos;

VIII - nível III de inativação microbiana: inativação de bactérias vegetativas, fungos, vírus lipofílicos e hidrofílicos, parasitas e microbactérias com redução igual ou maior que 6Log10, e inativação de esporos do bacilo *stearothermophilus* ou de esporos do bacilo *subtilis* com redução igual ou maior que 4Log10;

IX - sobras de amostras: restos de sangue, fezes, urina, suor, lágrima, leite, colostro, líquido espermático, saliva, secreções nasal, vaginal ou peniana, pêlo e unha que

permanecem nos tubos de coleta após a retirada do material necessário para a realização de investigação;

X - resíduos de serviços de saúde: são todos aqueles resultantes de atividades exercidas nos serviços definidos no art. 1º desta Resolução que, por suas características, necessitam de processos diferenciados em seu manejo, exigindo ou não tratamento prévio à sua disposição final;

XI - Plano de Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde-PGRSS: documento integrante do processo de licenciamento ambiental, baseado nos princípios da não geração de resíduos e na minimização da geração de resíduos, que aponta e descreve as ações relativas ao seu manejo, no âmbito dos serviços mencionados no art. 1º desta Resolução, contemplando os aspectos referentes à geração, segregação, acondicionamento, coleta, armazenamento, transporte, reciclagem, tratamento e disposição final, bem como a proteção à saúde pública e ao meio ambiente;

XII - sistema de tratamento de resíduos de serviços de saúde: conjunto de unidades, processos e procedimentos que alteram as características físicas, físico-químicas, químicas ou biológicas dos resíduos, podendo promover a sua descaracterização, visando a minimização do risco à saúde pública, a preservação da qualidade do meio ambiente, a segurança e a saúde do trabalhador;

XIII - disposição final de resíduos de serviços de saúde: é a prática de dispor os resíduos sólidos no solo previamente preparado para recebê-los, de acordo com critérios técnico-construtivos e operacionais adequados, em consonância com as exigências dos órgãos ambientais competentes; e

XIV - redução na fonte: atividade que reduza ou evite a geração de resíduos na origem, no processo, ou que altere propriedades que lhe atribuam riscos, incluindo modificações no processo ou equipamentos, alteração de insumos, mudança de tecnologia ou procedimento, substituição de materiais, mudanças na prática de gerenciamento, administração interna do suprimento e aumento na eficiência dos equipamentos e dos processos.

Art. 3º Cabe aos geradores de resíduos de serviço de saúde e ao responsável legal, referidos no art. 1º desta Resolução, o gerenciamento dos resíduos desde a geração até a disposição final, de forma a atender aos requisitos ambientais e de saúde pública e saúde ocupacional, sem prejuízo de responsabilização solidária de todos aqueles, pessoas físicas e jurídicas que, direta ou indiretamente, causem ou possam causar degradação ambiental, em especial os transportadores e operadores das instalações de tratamento e disposição final, nos termos da Lei nº 6.938, de 31 de agosto de 1981.

Art. 4º Os geradores de resíduos de serviços de saúde constantes do art. 1º desta Resolução, em operação ou a serem implantados, devem elaborar e implantar o Plano de Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde-PGRSS, de acordo com a legislação vigente, especialmente as normas da vigilância sanitária.

§ 1º Cabe aos órgãos ambientais competentes dos Estados, do Distrito Federal e dos Municípios, a fixação de critérios para determinar quais serviços serão objetos de licenciamento ambiental, do qual deverá constar o PGRSS.

§ 2º O órgão ambiental competente, no âmbito do licenciamento, poderá, sempre que necessário, solicitar informações adicionais ao PGRSS.

§ 3º O órgão ambiental, no âmbito do licenciamento, fixará prazos para regularização dos serviços em funcionamento, devendo ser apresentado o PGRSS devidamente implantado.

Art. 5º O PGRSS deverá ser elaborado por profissional de nível superior, habilitado pelo seu conselho de classe, com apresentação de Anotação de Responsabilidade Técnica-ART, Certificado de Responsabilidade Técnica ou documento similar, quando couber.

Art. 6º Os geradores dos resíduos de serviços de saúde deverão apresentar aos órgãos competentes, até o dia 31 de março de cada ano, declaração, referente ao ano civil anterior, subscrita pelo administrador principal da empresa e pelo responsável técnico devidamente habilitado, acompanhada da respectiva ART, relatando o cumprimento das exigências previstas nesta Resolução.

Parágrafo único. Os órgãos competentes poderão estabelecer critérios e formas para apresentação da declaração mencionada no *caput* deste artigo, inclusive, dispensando-a se for o caso para empreendimentos de menor potencial poluidor.

Art. 7º Os resíduos de serviços de saúde devem ser acondicionados atendendo às exigências legais referentes ao meio ambiente, à saúde e à limpeza urbana, e às normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas-ABNT, ou, na sua ausência, às normas e critérios internacionalmente aceitos.

Art. 8º Os veículos utilizados para coleta e transporte externo dos resíduos de serviços de saúde devem atender às exigências legais e às normas da ABNT.

Art. 9º As estações para transferência de resíduos de serviços de saúde devem estar licenciadas pelo órgão ambiental competente.

Parágrafo único. As características originais de acondicionamento devem ser mantidas, não se permitindo abertura, rompimento ou transferência do conteúdo de uma embalagem para outra.

Art. 10. Os sistemas de tratamento e disposição final de resíduos de serviços de saúde devem estar licenciados pelo órgão ambiental competente para fins de funcionamento e submetidos a monitoramento de acordo com parâmetros e periodicidade definidos no licenciamento ambiental.

Parágrafo único. São permitidas soluções consorciadas para os fins previstos neste artigo.

Art 11. Os efluentes líquidos provenientes dos estabelecimentos prestadores de serviços de saúde, para serem lançados na rede pública de esgoto ou em corpo receptor, devem atender às diretrizes estabelecidas pelos órgãos ambientais, gestores de recursos hídricos e de saneamento competentes.

Art. 12. Para os efeitos desta Resolução e em função de suas características, os resíduos de serviço de saúde são classificados de acordo com o Anexo I desta Resolução.

Art. 13. Os resíduos não caracterizados no Anexo I desta Resolução devem estar contemplados no PGRSS, e seu gerenciamento deve seguir as orientações específicas de acordo com a legislação vigente ou conforme a orientação do órgão ambiental competente.

Art. 14. É obrigatória a segregação dos resíduos na fonte e no momento da geração, de acordo com suas características, para fins de redução do volume dos resíduos a serem tratados e dispostos, garantindo a proteção da saúde e do meio ambiente.

Art. 15. Os resíduos do Grupo A1, constantes do Anexo I desta Resolução, devem ser submetidos a processos de tratamento em equipamento que promova redução de carga microbiana compatível com nível III de inativação microbiana e devem ser encaminhados para aterro sanitário licenciado ou local devidamente licenciado para disposição final de resíduos dos serviços de saúde.

Art. 16. Os resíduos do Grupo A2, constantes do Anexo I desta Resolução, devem ser submetidos a processo de tratamento com redução de carga microbiana compatível com nível III de inativação e devem ser encaminhados para:

I - aterro sanitário licenciado ou local devidamente licenciado para disposição final de resíduos dos serviços de saúde, ou

II - sepultamento em cemitério de animais.

Parágrafo único. Deve ser observado o porte do animal para definição do processo de tratamento. Quando houver necessidade de fracionamento, este deve ser autorizado previamente pelo órgão de saúde competente.

Art. 17. Os resíduos do Grupo A3, constantes do Anexo I desta Resolução, quando não houver requisição pelo paciente ou familiares e/ou não tenham mais valor científico ou legal, devem ser encaminhados para:

I - sepultamento em cemitério, desde que haja autorização do órgão competente do Município, do Estado ou do Distrito Federal; ou

II - tratamento térmico por incineração ou cremação, em equipamento devidamente licenciado para esse fim.

Parágrafo único. Na impossibilidade de atendimento dos incisos I e II, o órgão ambiental competente nos Estados, Municípios e Distrito Federal pode aprovar outros processos alternativos de destinação.

Art. 18. Os resíduos do Grupo A4, constantes do Anexo I desta Resolução, podem ser encaminhados sem tratamento prévio para local devidamente licenciado para a disposição final de resíduos dos serviços de saúde.

Parágrafo único. Fica a critério dos órgãos ambientais estaduais e municipais a exigência do tratamento prévio, considerando os critérios, especificidades e condições ambientais locais.

Art. 19. Os resíduos do Grupo A5, constantes do Anexo I desta Resolução, devem ser submetidos a tratamento específico orientado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA.

Art. 20. Os resíduos do Grupo A não podem ser reciclados, reutilizados ou reaproveitados, inclusive para alimentação animal.

Art. 21. Os resíduos pertencentes ao Grupo B, constantes do Anexo I desta Resolução, com características de periculosidade, quando não forem submetidos a processo de reutilização, recuperação ou reciclagem, devem ser submetidos a tratamento e disposição final específicos.

§ 1º As características dos resíduos pertencentes a este grupo são as contidas na Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos-FISPQ.

§ 2º Os resíduos no estado sólido, quando não tratados, devem ser dispostos em aterro de resíduos perigosos - Classe I.

§ 3º Os resíduos no estado líquido não devem ser encaminhados para disposição final em aterros.

Art. 22. Os resíduos pertencentes ao Grupo B, constantes do Anexo I desta Resolução, sem características de periculosidade, não necessitam de tratamento prévio.

§ 1º Os resíduos referidos no *caput* deste artigo, quando no estado sólido, podem ter disposição final em aterro licenciado.

§ 2º Os resíduos referidos no *caput* deste artigo, quando no estado líquido, podem ser lançados em corpo receptor ou na rede pública de esgoto, desde que atendam respectivamente as diretrizes estabelecidas pelos órgãos ambientais, gestores de recursos hídricos e de saneamento competentes.

Art. 23. Quaisquer materiais resultantes de atividades exercidas pelos serviços referidos no art. 1º desta Resolução que contenham radionuclídeos em quantidades superiores aos limites de isenção especificados na norma CNEN-NE-6.02 - Licenciamento de Instalações Radiativas, e para os quais a reutilização é imprópria ou não prevista, são considerados rejeitos radioativos (Grupo C) e devem obedecer às exigências definidas pela CNEN.

§ 1º Os rejeitos radioativos não podem ser considerados resíduos até que seja decorrido o tempo de decaimento necessário ao atingimento do limite de eliminação.

§ 2º Os rejeitos radioativos, quando atingido o limite de eliminação, passam a ser considerados resíduos das categorias biológica, química ou de resíduo comum, devendo seguir as determinações do grupo ao qual pertencem.

Art. 24. Os resíduos pertencentes ao Grupo D, constantes do Anexo I desta Resolução, quando não forem passíveis de processo de reutilização, recuperação ou reciclagem, devem ser encaminhados para aterro sanitário de resíduos sólidos urbanos, devidamente licenciado pelo órgão ambiental competente.

Parágrafo único. Os resíduos do Grupo D, quando for passível de processo de reutilização, recuperação ou reciclagem devem atender as normas legais de higienização e descontaminação e a Resolução CONAMA nº 275, de 25 de abril de 2001.

Art. 25. Os resíduos pertencentes ao Grupo E, constantes do Anexo I desta Resolução, devem ter tratamento específico de acordo com a contaminação química, biológica ou radiológica.

§ 1º Os resíduos do Grupo E devem ser apresentados para coleta acondicionados em coletores estanques, rígidos e hígidos, resistentes à ruptura, à punctura, ao corte ou à escarificação.

§ 2º os resíduos a que se refere o caput deste artigo, com contaminação radiológica, devem seguir as orientações contidas no art. 23, desta Resolução.

§ 3º os resíduos que contenham medicamentos citostáticos ou antineoplásicos, devem ser tratados conforme o art. 21, desta Resolução.

§ 4º os resíduos com contaminação biológica devem ser tratados conforme os arts. 15 e 18 desta Resolução.

Art. 26. Aos órgãos ambientais competentes, integrantes do Sistema Nacional de Meio Ambiente-SISNAMA, incumbe a aplicação desta Resolução, cabendo-lhes a fiscalização, bem como a imposição das penalidades administrativas previstas na legislação pertinente.

Art. 27. Para os municípios ou associações de municípios com população urbana até 30.000 habitantes, conforme dados do último censo disponível do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE, e que não disponham de aterro sanitário licenciado, admite-se de forma excepcional e tecnicamente motivada, por meio de Termo de Ajustamento de Conduta, com cronograma definido das etapas de implantação e com prazo máximo de três anos, a disposição final em solo obedecendo aos critérios mínimos estabelecidos no Anexo II, desta Resolução, com a devida aprovação do órgão ambiental competente.

Art. 28. Os geradores dos resíduos dos serviços de saúde e os órgãos municipais de limpeza urbana poderão, a critério do órgão ambiental competente, receber prazo de até dois anos, contados a partir da vigência desta Resolução, para se adequarem às exigências nela prevista.

§ 1º O empreendedor apresentará ao órgão ambiental competente, entre outros documentos, o cronograma das medidas necessárias ao cumprimento do disposto nesta Resolução.

§ 2º O prazo previsto no *caput* deste artigo poderá, excepcional e tecnicamente motivado, ser prorrogado por até um ano, por meio de Termo de Ajustamento de Conduta, ao qual se dará publicidade, enviando-se cópia ao Ministério Público.

Art. 29. O não cumprimento do disposto nesta Resolução sujeitará os infratores às penalidades e sanções previstas na legislação pertinente, em especial na Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998, e no seu Decreto regulamentador.

Art. 30. As exigências e deveres previstos nesta resolução caracterizam obrigação de relevante interesse ambiental.

Art. 31. Esta Resolução entra em vigor na data de sua publicação.

Art. 32. Revogam-se a Resolução CONAMA nº 283, de 12 de julho de 2001, e as disposições da Resolução nº 5, de 5 de agosto de 1993, que tratam dos resíduos sólidos oriundos dos serviços de saúde, para os serviços abrangidos no art. 1º desta Resolução.

MARINA SILVA**ANEXO I**

I - GRUPO A: Resíduos com a possível presença de agentes biológicos que, por suas características de maior virulência ou concentração, podem apresentar risco de infecção.

a) A1

1. culturas e estoques de microrganismos; resíduos de fabricação de produtos biológicos, exceto os hemoderivados; descarte de vacinas de microrganismos vivos ou atenuados; meios de cultura e instrumentais utilizados para transferência, inoculação ou mistura de culturas; resíduos de laboratórios de manipulação genética;
2. resíduos resultantes da atenção à saúde de indivíduos ou animais, com suspeita ou certeza de contaminação biológica por agentes classe de risco 4, microrganismos com relevância epidemiológica e risco de disseminação ou causador de doença emergente que se torne epidemiologicamente importante ou cujo mecanismo de transmissão seja desconhecido;
3. bolsas transfusionais contendo sangue ou hemocomponentes rejeitadas por contaminação ou por má conservação, ou com prazo de validade vencido, e aquelas oriundas de coleta incompleta;
4. sobras de amostras de laboratório contendo sangue ou líquidos corpóreos, recipientes e materiais resultantes do processo de assistência à saúde, contendo sangue ou líquidos corpóreos na forma livre;

b) A2

1. carcaças, peças anatômicas, vísceras e outros resíduos provenientes de animais submetidos a processos de experimentação com inoculação de microrganismos, bem como suas forrações, e os cadáveres de animais suspeitos de serem portadores de microrganismos de relevância epidemiológica e com risco de disseminação, que foram submetidos ou não a estudo anátomo-patológico ou confirmação diagnóstica;

c) A3

1. peças anatômicas (membros) do ser humano; produto de fecundação sem sinais vitais, com peso menor que 500 gramas ou estatura menor que 25 centímetros ou idade gestacional menor que 20 semanas, que não tenham valor científico ou legal e não tenha havido requisição pelo paciente ou familiares;

d) A4

1. kits de linhas arteriais, endovenosas e dialisadores, quando descartados;
2. filtros de ar e gases aspirados de área contaminada; membrana filtrante de equipamento médico-hospitalar e de pesquisa, entre outros similares;
3. sobras de amostras de laboratório e seus recipientes contendo fezes, urina e secreções, provenientes de pacientes que não contenham e nem sejam suspeitos de conter agentes Classe de Risco 4, e nem apresentem relevância epidemiológica e risco de disseminação, ou microrganismo causador de doença emergente que se torne epidemiologicamente

importante ou cujo mecanismo de transmissão seja desconhecido ou com suspeita de contaminação com príons.

4. resíduos de tecido adiposo proveniente de lipoaspiração, lipoescultura ou outro procedimento de cirurgia plástica que gere este tipo de resíduo;
5. recipientes e materiais resultantes do processo de assistência à saúde, que não contenha sangue ou líquidos corpóreos na forma livre;
6. peças anatômicas (órgãos e tecidos) e outros resíduos provenientes de procedimentos cirúrgicos ou de estudos anátomo-patológicos ou de confirmação diagnóstica;
7. carcaças, peças anatômicas, vísceras e outros resíduos provenientes de animais não submetidos a processos de experimentação com inoculação de microorganismos, bem como suas forrações; e
8. bolsas transfusionais vazias ou com volume residual pós-transfusão.

e) A5

1. órgãos, tecidos, fluidos orgânicos, materiais perfurocortantes ou escarificantes e demais materiais resultantes da atenção à saúde de indivíduos ou animais, com suspeita ou certeza de contaminação com príons.

II - GRUPO B: Resíduos contendo substâncias químicas que podem apresentar risco à saúde pública ou ao meio ambiente, dependendo de suas características de inflamabilidade, corrosividade, reatividade e toxicidade.

- a) produtos hormonais e produtos antimicrobianos; citostáticos; antineoplásicos; imunossupressores; digitálicos; imunomoduladores; anti-retrovirais, quando descartados por serviços de saúde, farmácias, drogarias e distribuidores de medicamentos ou apreendidos e os resíduos e insumos farmacêuticos dos medicamentos controlados pela Portaria MS 344/98 e suas atualizações;
- b) resíduos de saneantes, desinfetantes, desinfestantes; resíduos contendo metais pesados; reagentes para laboratório, inclusive os recipientes contaminados por estes;
- c) efluentes de processadores de imagem (reveladores e fixadores);
- d) efluentes dos equipamentos automatizados utilizados em análises clínicas; e
- e) demais produtos considerados perigosos, conforme classificação da NBR 10.004 da ABNT (tóxicos, corrosivos, inflamáveis e reativos).

III - GRUPO C: Quaisquer materiais resultantes de atividades humanas que contenham radionuclídeos em quantidades superiores aos limites de eliminação especificados nas normas da Comissão Nacional de Energia Nuclear-CNEN e para os quais a reutilização é imprópria ou não prevista.

- a) enquadram-se neste grupo quaisquer materiais resultantes de laboratórios de pesquisa e ensino na área de saúde, laboratórios de análises clínicas e serviços de medicina nuclear e radioterapia que contenham radionuclídeos em quantidade superior aos limites de eliminação.

IV - GRUPO D: Resíduos que não apresentem risco biológico, químico ou radiológico à saúde ou ao meio ambiente, podendo ser equiparados aos resíduos domiciliares.

- a) papel de uso sanitário e fralda, absorventes higiênicos, peças descartáveis de vestuário, resto alimentar de paciente, material utilizado em anti-sepsia e hemostasia de venóclises, equipo de soro e outros similares não classificados como A1;
- b) sobras de alimentos e do preparo de alimentos;
- c) resto alimentar de refeitório;
- d) resíduos provenientes das áreas administrativas;
- e) resíduos de varrição, flores, podas e jardins; e
- f) resíduos de gesso provenientes de assistência à saúde.

V - GRUPO E: Materiais perfurocortantes ou escarificantes, tais como: lâminas de barbear, agulhas, escalpes, ampolas de vidro, brocas, limas endodônticas, pontas diamantadas, lâminas de bisturi, lancetas; tubos capilares; micropipetas; lâminas e lamínulas; espátulas; e todos os utensílios de vidro quebrados no laboratório (pipetas, tubos de coleta sanguínea e placas de Petri) e outros similares.

ANEXO II

CRITÉRIOS MÍNIMOS PARA DISPOSIÇÃO FINAL DE RESÍDUOS DE SERVIÇOS DE SAÚDE EXCLUSIVAMENTE

I) Quanto à seleção de área:

- a) não possuir restrições quanto ao zoneamento ambiental (afastamento de Unidades de Conservação ou áreas correlatas);
- b) respeitar as distâncias mínimas estabelecidas pelos órgãos ambientais competentes de ecossistemas frágeis, recursos hídricos superficiais e subterrâneos;

II) Quanto à segurança e sinalização:

- a) sistema de controle de acesso de veículos, pessoas não autorizadas e animais, sob vigilância contínua; e
- b) sinalização de advertência com informes educativos quanto aos perigos envolvidos.

III) Quanto aos aspectos técnicos

- a) sistemas de drenagem de águas pluviais;
- b) coleta e disposição adequada dos percolados;
- c) coleta de gases;

- d) impermeabilização da base e taludes; e
- e) monitoramento ambiental.

IV) Quanto ao processo de disposição final de resíduos de serviços de saúde:

- a) disposição dos resíduos diretamente sobre o fundo do local;
- b) acomodação dos resíduos sem compactação direta;
- c) cobertura diária com solo, admitindo-se disposição em camadas;
- d) cobertura final; e
- e) plano de encerramento.

9.2 ANEXO II

Tabela de precipitação ocorrida na Unicamp, Campinas; durante o mês de outubro de 2005 ³.

Data	Precipitação (mm)
01/10/2005	0,0
02/10/2005	5,3
03/10/2005	9,4
04/10/2005	0,3
05/10/2005	0,0
06/10/2005	3,3
07/10/2005	0,0
08/10/2005	17,0
09/10/2005	0,3
10/10/2005	0,0
11/10/2005	0,0
12/10/2005	1,3
13/10/2005	0,3
14/10/2005	0,0
15/10/2005	44,4
16/10/2005	0,3
17/10/2005	0,0
18/10/2005	0,3
19/10/2005	3,3
20/10/2005	1,8
21/10/2005	0,0
22/10/2005	19,3
23/10/2005	15,0
24/10/2005	0,3
25/10/2005	0,0
26/10/2005	0,0
27/10/2005	37,6
28/10/2005	0,3
29/10/2005	43,7
30/10/2005	2,0
31/10/2005	4,6

³ www.agritempo.gov.br/agroclima/pesquisaWeb

DECLARAÇÃO

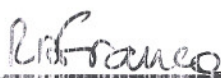
Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação/ tese de mestrado/doutorado intitulada "*Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. e ovos de helmintos em esgoto hospitalar: destruição e análise do dano estrutural dos protozoários após processo fotoeletroquímico"

(X) não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 002/06, referente a bioética e biossegurança.

() está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº _____), intitulado

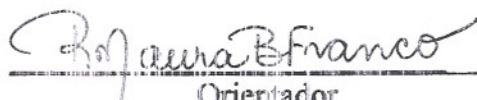
() tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº _____).

() tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (?) (Protocolo nº _____).



Aluno

Rita Borges França



Orientador

Regina Maura Bueno Franco

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Nome:

Função: