

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



Antônio de Lima Barros Júnior

“Avaliação da ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em amostras de água superficial e da interface sedimento-água do Rio Capivari, na cidade de Campinas, São Paulo, Brasil.”

| |
|---|
| Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <u>Antônio de Lima Barros Jr.</u> |
| <u>Romeu Neto</u> |
| e aprovada pela Comissão Julgadora. |

Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestre em Parasitologia.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Regina Maura Bueno Franco

Co-Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Romeu Cantusio Neto

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
SÍLVIA CELESTE SÁLVIO – CRB8/7039
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

B278a Barros Júnior, Antônio de Lima, 1973-
Avaliação da ocorrência de oocistos de
Cryptosporidium spp. e cistos de *Giardia* spp. em
amostras de água superficial e da interface sedimento-
água do Rio Capivari, na cidade de Campinas, São
Paulo, Brasil / Antônio de Lima Barros Júnior. –
Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Regina Maura Bueno Franco.
Coorientador: Romeu Cantusio Neto.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Cryptosporidium*. 2. *Giardia*. 3. Sedimentos
(Geologia). 4. Interface solo-água. 5. Draga de
Ekman. I. Franco, Regina Maura Bueno, 1958-. II.
Cantusio Neto, Romeu. III. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Evaluation of the occurrence of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia* spp. cysts fresh water samples and of the sediment-water interface from Capivari River in the city of Campinas, São Paulo, Brazil

Palavras-chave em Inglês:

Cryptosporidium

Giardia

Sediments (Geology)

Soil-water interface

Ekman drag

Área de concentração: Parasitologia

Titulação: Mestre em Parasitologia

Banca examinadora:

Romeu Cantusio Neto [Coorientador]

Silmara Marques Allegretti

José Roberto Guimarães

Data da defesa: 17-08-2011

Programa de Pós Graduação: Parasitologia

Campinas 17 de agosto de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Prof (a). Dr (a) Romeu Cantúcio Neto (Co-Orientador)


Assinatura

Prof (a). Dr (a) Silmara Marques Allegretti


Assinatura

Prof (a). Dr (a) José Roberto Guimarães


Assinatura

Prof (a). Dr (a) Ana Maria Aparecida Guaraldo

Assinatura

Prof (a). Dr (a) Luciana Urbano Santos

Assinatura

Dedico este trabalho a minha amada esposa Raquel, aos meus filhos, Bruno e Maria Eduarda, a Idalina (in memoriam), e aos meus pais Antônio e Iracy, pelo apoio, compreensão e palavras que sempre me fortaleceram e me fizeram prosseguir.

Agradecimentos

À SANASA, Sociedade de Abastecimento de Água e Saneamento S/A, que autorizou e apoiou a realização desta Pós-Graduação.

Aos Meus colegas de laboratório: Ana Cristina pelo seu valioso apoio, Alexandre pelas traduções dos textos em Inglês e constantes palavras de ânimo, também aos amigos, Ivânio, Diego e todos os que trabalharam comigo e me apoiaram nesta jornada.

Aos professores, funcionários e alunos do departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia - UNICAMP, pelo apoio na a realização deste trabalho.

À CETESB, pela valiosa ajuda. Amigos sempre prestativos e prontos a ajudar.

Aos amigos do Laboratório de Protozoologia, Nilson, Diego e Juliane. À Luciana, pelas discussões e atenção.

Ao Prof. Dr. Arício, pela colaboração na realização dos cálculos estatísticos e esclarecimentos.

À Profa. Dra. Regina Maura Bueno Franco, pela orientação, incentivo, apoio e principalmente sinceridade e carinho com os quais sempre me tratou.

Ao Dr. Romeu, pela orientação, incentivo, paciência e dedicação que dispensou desde o início deste trabalho.

Agradeço a Deus, por me sustentar quando tudo parecia estar errado, quando Sua voz sempre presente, dizia: calma os planos de Deus ninguém pode frustrar.

Muito Obrigado.

Resumo

Os protozoários patogênicos gastrointestinais, *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. estão amplamente presentes em ambientes aquáticos e suas formas infectantes (oocistos e cistos), são resistentes às condições ambientais (temperatura e radiação solar) e ao processo de desinfecção da água (principalmente à cloração). Inúmeros surtos de gastroenterite foram causados por estes organismos devido à veiculação hídrica, sendo que estes protozoários patogênicos tornaram-se uma preocupação constante para os sistemas produtores de água. Os objetivos desta pesquisa foram: verificar a ocorrência de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de água do rio Capivari em dois pontos, identificados como CAP1 (localizado na estação de tratamento de água ETA Capivari) e CAP2 (à montante da mesma estação), avaliar a interface sedimento-água no ponto CAP1, com periodicidade mensal de agosto 2009 à Janeiro 2011, avaliar a qualidade da água mediante análise microbiológica e físico-química deste manancial. Para os ensaios parasitológicos, foi empregada a técnica de filtração em membrana de acordo com Franco et al., (2001) e visualização mediante reação de imunofluorescência direta (RID) com anticorpos monoclonais comerciais para visualização de cistos e oocistos; para ensaios microbiológicos visando a detecção de coliformes termotolerantes, utilizou-se a técnica de tubos múltiplos de acordo com os procedimentos descritos no STANDARD METHODS 21^a edição (APHA, AWWA, WEF, 2005). As análises das amostras da Interface sedimento-água foram processadas pela técnica de centrífugo-concentração através da metodologia que emprega desagregação química acrescida de desagregação físico-química por ultrassom. Ao todo, 36 amostras de água bruta superficial e 18 amostras da interface sedimento-água foram coletadas. Nos pontos CAP1 e CAP2, cistos de *Giardia* spp. foram detectados em 94,1 % e 100,0 % das amostras, respectivamente; na interface sedimento-água 94,5 % das amostras foram positivas para cistos de *Giardia* spp. Oocistos de *Cryptosporidium* foram detectados no ponto CAP1 em 6,6 % das amostras, em 13,3 % das amostras no ponto Cap2 e em 16,6 % das amostras da interface sedimento-água durante toda a pesquisa. Ambos os protozoários foram detectados nas diferentes amostras do rio Capivari.

Palavras chave: *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., Sedimento (Geologia), draga de Ekman, interface solo-água.

Abstract

The gastrointestinal pathogenic protozoa *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. are ubiquitous in aquatic environment and their infectious forms (cysts and oocysts) are resistant to environmental conditions (temperature and solar radiation) and the water disinfection process (mainly chlorination). Numerous outbreaks of gastroenteritis were caused by these organisms due to waterborne transmission and these parasitic protozoa have become a constant concern for systems producing water. The aims of this research were: to investigate the occurrence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water samples of Capivari River in two sites identified as CAP1 (in the plant of water treatment named ETA Capivari) and CAP2 (upstream from the same plant); to evaluate the sediment-water interface in site CAP1, from august 2009 to january 2011, to assess water quality of this source by microbiological and physical-chemical analysis. For parasitological assays, the membrane filter technique according to Franco et al. (2001) was employed followed by visualization by direct immunofluorescence assay (IFA) with commercial monoclonal antibody kit for enumerating cysts and oocysts. For microbiological tests aiming the detection of thermo tolerant coliforms, multiple tubes technique was used according to the procedures described in STANDARD METHODS 21^a edition (APHA, AWWA, WEF, 2005). The analysis of the sediment-water interface samples were made by centrifugation and concentration technique through the methodology that uses chemical disaggregation followed by physical-chemical disaggregation using ultrasonic equipment. 36 fresh water samples and 18 sediment-water interface samples were collected. In CAP1 and CAP2 sites, cysts of *Giardia* were detected in 94,1 % and 100% of the samples, respectively; in sediment-water interface, 94,5 % of the samples presented *Giardia* cysts. *Cryptosporidium* oocysts were detected in 6,6 % of the samples from CAP1 site, in 13,3 % samples from CAP2 site and in 16,6 % of the samples from sediment-water interface during all the research. Both protozoa were detected in different samples of the Capivari river.

Keywords: *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., Sediments (Geology), Ekman Drag, Soil-water Interface.

Lista de Siglas.

APHA - American Public Health Association.

ANOVA – Análise de variância de dois fatores com nível de segurança de 95 %.

AWWA – American Water Works Association.

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental.

DAPI – 4 – 6 diamidino – 2 – phenyllindol, (corante fluorogênico).

EDTA – Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etilenodiamino tetra-acético).

IMS – Immunomagnetic Separation.

IQA – Índice de Qualidade das Águas.

NTU – Nefrelometric Unit Turbidity.

ONU – Organização das Nações Unidas.

OMS – Organização Mundial da Saúde.

PBS - Phosphate Buffered Saline.

PtCO – Platinum – Cobalt, (Unidade de medida de cor).

RID – Reação de Imunofluorescência Direta.

SANASA - Sociedade de Abastecimento de Água e Saneamento S/A.

TRIS – Hidroximetil Amino - Metano (composto orgânico).

UMA – Universidade livre da Mata Atlântica.

USEPA – U.S. Environmental Protection Agency

WEF - The World Economic Forum.

| Lista de figuras | páginas. |
|--|-----------------|
| Figura 1 Ponto de coleta CAP1, próximo estação de tratamento..... | 26 |
| Figura 2 Ponto de coleta CAP2..... | 26 |
| Figura 3 Ponto de coleta da interface sedimento-água..... | 27 |
| Figura 4 Draga de Ekman modelo B5023..... | 28 |
| Prancha 1 Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. e cistos de <i>Giardia</i> spp. naturais e do controle positivo em amostras de água bruta superficial e da interface sedimento-água do rio Capivari..... | 78 |

| Lista de tabelas | | páginas. |
|-------------------------|---|-----------------|
| Tabela 1 | Espécies e respectivas assembleias do gênero <i>Giardia</i> | 13 |
| Tabela 2 | Espécies do gênero <i>Cryptosporidium</i> , autores, hospedeiros..... | 20 |
| Tabela 3 | Porcentagem de recuperação de cistos de <i>Giardia</i> spp. e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. dos experimentos controles nos meses de agosto 2009, novembro 2009, fevereiro 2010, maio 2010, agosto 2010 e novembro 2010, para as amostras de água bruta superficial do ponto CAP1 do rio Capivari..... | 39 |
| Tabela 4 | Porcentagem de recuperação de cistos de <i>Giardia</i> spp. e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. dos experimentos controles nos meses de agosto 2009, novembro 2009, fevereiro 2010, maio 2010, agosto 2010 e novembro 2010, para as amostras de água bruta superficial do ponto CAP2 do rio Capivari..... | 40 |
| Tabela 5 | Critérios de aceitação para o método 1623, USEPA..... | 41 |
| Tabela 6 | Parâmetros parasitológicos (cistos de <i>Giardia</i> spp. e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp.) para as amostras de água bruta superficial no ponto de coleta CAP1, rio Capivari, Campinas, SP, no período de agosto/2009 a janeiro/2011..... | 44 |
| Tabela 7 | Parâmetros parasitológicos (cistos de <i>Giardia</i> spp. e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp.) para as amostras de água bruta superficial no ponto de coleta CAP2, rio Capivari, Campinas, SP, no período de agosto/2009 a janeiro/2011..... | 46 |
| Tabela 8 | Parâmetros físico-químicos (pH, cor, turbidez) e microbiológicos (coliformes termotolerantes) das amostras de água bruta superficial no ponto de coleta CAP1, rio Capivari, Campinas, SP, no período de agosto/2009 a janeiro/2011..... | 48 |
| Tabela 9 | Parâmetros físico-químicos (pH, cor, turbidez) e microbiológicos (coliformes termotolerantes) das amostras de água bruta superficial no ponto de coleta CAP2, Rio Capivari, Campinas, SP, no período de agosto/2009 a janeiro/2011..... | 50 |

| | | |
|-----------|--|----|
| Tabela 10 | Porcentagens de recuperação de cistos de <i>Giardia</i> spp. e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. nos experimentos controles, nas amostras da interface sedimento-água, utilizando-se metodologia com desagregação química (agosto 09 a agosto 10) e acrescida de desagregação físico-química (setembro/10 a janeiro/11)..... | 58 |
| Tabela 11 | Concentrações de cistos de <i>Giardia</i> spp., oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. p/mL, encontrados nas amostras da interface sedimento - água do ponto de coleta CAP1, rio Capivari, Campinas, SP, no período de agosto/2009 a janeiro/2011..... | 62 |
| Tabela 12 | Valores de ANOVA (teste <i>f</i>) e probabilidade (<i>p</i>) entre os pontos de coleta CAP1 e CAP2, para os parâmetros físico-químicos, microbiológicos (coliformes termotolerantes) e parasitológicos (cistos de <i>Giardia</i> spp. e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp.)..... | 68 |
| Tabela 13 | Valores de ANOVA (teste <i>f</i>) e probabilidade (<i>p</i>) entre o ponto de coleta CAP1 e interface sedimento-água, para os dados parasitológicos (cistos de <i>Giardia</i> spp. e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp.)..... | 69 |
| Tabela 14 | Valores de ANOVA (teste <i>f</i>) e probabilidade (<i>p</i>) entre as duas etapas das análises da interface sedimento-água para cistos de <i>Giardia</i> spp. e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp..... | 69 |
| Tabela 15 | Comparação múltipla de médias (Teste de Duncan) dos parâmetros microbiológicos físico - químicos e parasitológicos entre os pontos CAP1 e CAP2..... | 71 |
| Tabela 16 | Comparação múltipla de médias (Teste de Duncan) dos parâmetros parasitológicos entre o ponto CAP1 e a interface sedimento-água..... | 74 |
| Tabela 17 | Comparação múltipla de médias (Teste de Duncan) entre as duas etapas das análises da interface sedimento-água para e cistos de <i>Giardia</i> spp. oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. | 73 |

| | | |
|-----------|--|----|
| Tabela 18 | Matriz da Correlação linear de Pearson (r) entre cistos de <i>Giardia</i> spp. e parâmetros físico-químicos e microbiológicos das amostras de água bruta superficial dos pontos de coleta CAP1 e Cap2 do rio Capivari, Campinas, São Paulo..... | 75 |
| Tabela 19 | Matriz da Correlação linear de Pearson (r) entre oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. e parâmetros físico-químicos e microbiológicos das amostras de água bruta superficial dos pontos de coleta CAP1 e CAP2 do rio Capivari, Campinas São Paulo..... | 76 |
| Tabela 20 | Matriz da Correlação linear de Pearson (r) da segunda etapa das análises da interface sedimento-água para e cistos de <i>Giardia</i> spp. com o uso do aparelho de Ultrassom..... | 76 |

| Sumário | páginas. |
|--|-----------------|
| Resumo..... | vi |
| Abstract..... | vii |
| Lista de Siglas..... | viii |
| Lista de Figuras..... | ix |
| Lista de tabelas..... | x |
| 1.0 Introdução..... | 1 |
| 2.0 - Revisão de Literatura..... | 8 |
| 2.1- <i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>Giardia</i> spp. no meio ambiente..... | 8 |
| 2.2 - <i>Giardia</i> | 11 |
| 2.2.1- Espécies de <i>Giardia</i> | 13 |
| 2.3- <i>Cryptosporidium</i> | 15 |
| 2.3.1- Espécies de <i>Cryptosporidium</i> | 17 |
| 2.4- Investigação da concentração de cistos de <i>Giardia</i> spp. e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp., na interface sedimento-água..... | 22 |
| 3- Justificativa..... | 24 |
| 4- Objetivos | 25 |

| | |
|--|----|
| 5- Material e métodos..... | 25 |
| 5.1- Locais de coleta das amostras de água bruta superficial..... | 25 |
| 5.2- Local de coleta das amostras da interface sedimento-água..... | 27 |
| 5.2.1- Draga de Ekman M. B5023..... | 27 |
| 5.3- Análise parasitológica..... | 28 |
| 5.3.1- Recuperação de cistos de <i>Giardia</i> spp. e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. na água bruta superficial, a partir do material filtrado..... | 28 |
| 5.3.1.1- Procedimento para separação imunomagnética (IMS), utilizado nas amostras de água bruta superficial de amostras com turbidez acima de 50 NTU..... | 29 |
| 5.3.2- Recuperação de cistos de <i>Giardia</i> spp. e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. a partir das amostras da interface sedimento-água..... | 30 |
| 5.3.3- Visualização e quantificação de cistos de <i>Giardia</i> spp. e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp., através da RID com anticorpos monoclonais específicos..... | 31 |
| 5.3.4- Teste para confirmação das estruturas observadas utilizando o corante fluorogênico 4-6-diamidino-2-phenilindol (DAPI)..... | 32 |
| 5.3.5- Controle positivo nas amostras de água bruta superficial..... | 33 |
| 5.3.6- Controle negativo nas amostras de água bruta superficial..... | 34 |

| | |
|--|----|
| 5.3.7- Controle positivo nas amostras da interface sedimento-água..... | 34 |
| 5.3.8- Critérios de positividade dos protozoários..... | 34 |
| 5.4- Estimativa da concentração de cistos e oocistos..... | 35 |
| 5.5- Eficiência de Recuperação..... | 36 |
| 5.6- Análises microbiológicas e físico-químicas das amostras de água bruta..... | 37 |
| 6- Resultados..... | 38 |
| 6.1- Análises estatísticas..... | 38 |
| 6.2- Experimento controle da água bruta superficial (CAP1)..... | 38 |
| 6.3- Experimento controle da água bruta superficial (CAP2)..... | 39 |
| 6.4- Discussão: experimentos controles da matriz de água bruta superficial dos pontos de coleta CAP1 e CAP2..... | 40 |
| 6.5- Resultados do experimento controle negativo..... | 43 |
| 6.6- Ocorrência de cistos de <i>Giardia</i> spp. e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. na água bruta superficial do ponto de coleta CAP1..... | 43 |
| 6.7- Ocorrência de cistos <i>Giardia</i> spp. e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. da água bruta superficial do ponto de coleta CAP2..... | 45 |

| | |
|--|----|
| 6.8- Caracterização físico-química e microbiológica do ponto de coleta CAP1..... | 47 |
| 6.9- Caracterização físico-química e microbiológica do ponto de coleta CAP2..... | 49 |
| 6.10- Discussão: matriz de água bruta superficial dos pontos de coleta CAP1 e CAP2, água do rio Capivari..... | 51 |
| 6.11- Resultado dos experimentos controles para as amostras da interface sedimento-água..... | 57 |
| 6.12- Discussão: experimentos controles da matriz interface sedimento-água, rio Capivari..... | 59 |
| 6.13- Ocorrência de cistos <i>Giardia</i> spp. e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. na interface sedimento-água do Rio Capivari..... | 61 |
| 6.14- Discussão: ocorrência de cistos de <i>Giardia</i> spp. e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. na interface sedimento-água do rio capivari..... | 63 |
| 7- Análises estatísticas..... | 67 |
| 7.1- Análise de Variância (ANOVA)..... | 67 |
| 7.2- Comparação múltipla de médias (Teste de Duncan) dos parâmetros, físico-químicos (pH, cor e turbidez), microbiológico (coliformes termotolerantes) e parasitológicos (cistos de <i>Giardia</i> spp. e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp.), entre os pontos CAP1 e CAP2 do rio Capivari..... | 70 |

| | |
|--|----|
| 7.3- Comparação múltipla de médias (Teste de Duncan) dos parâmetros parasitológicos (cistos de <i>Giardia</i> spp. e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp.) entre o ponto CAP1 e a interface sedimento-água do rio Capivari..... | 72 |
| 7.4- Comparação múltipla de médias (Teste de Duncan) entre as duas etapas das análises da interface sedimento-água para e cistos de <i>Giardia</i> spp. e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp..... | 72 |
| 7.5- Teste de Correlação de Pearson entre os dados de cistos de <i>Giardia</i> spp. e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. parâmetros físico-químicos e microbiológico dos pontos de coleta (CAP1- CAP2 e CAP1 - Interface sedimento-água)..... | 74 |
| 7.6- Teste de Correlação de Pearson entre a concentração de cistos de <i>Giardia</i> spp. nas amostras que se empregou a metodologia com desagregação química acrescida de desagregação físico-química da interface sedimento-água..... | 74 |
| 8- Conclusões..... | 78 |
| 9- Referências Bibliográficas..... | 79 |

1- Introdução

O Brasil é um país com dimensões continentais, com uma área de mais de 8,5 milhões de km², possui uma costa de cerca de 8,500 km de extensão, onde se encontra a maior parte da população. O relevo brasileiro apresenta grande variedade de aspectos geomorfológicos, decorrentes de sucessivas mudanças climáticas, das características litológicas e estruturais e dos fatores biológicos, que originam sua compartimentação geomorfológica atual. Além disso, possui uma diversificação climática muito ampla (MMA, 1998).

O território brasileiro é constituído de três grandes bacias e de dois complexos de bacias hidrográficas. As três bacias são: a do rio Amazonas, a do rio Tocantins e a do São Francisco, e os dois complexos de bacias são a do rio da Prata e do Atlântico. O complexo da bacia do Prata é constituído de três bacias: Alto Paraguai, Paraná e Uruguai e o complexo Atlântico é subdividido nos seguintes complexos: Atlântico Norte, Atlântico Nordeste, Atlântico Leste 1, Atlântico Leste 2 e Sudeste (MMA, 1998).

A produção hídrica, entendida como o escoamento anual afluente ao Oceano Atlântico é de 168.790 m³/s, no território brasileiro, levando-se em consideração também a vazão produzida na área da bacia Amazônica que se encontra em território estrangeiro, estimada em 89.000 m³/s. A disponibilidade hídrica total do país atinge 257.790 m³/s, dessa maneira observa-se que há abundância de água no Brasil, considerando-se o valor médio de 36.317 m³/ano/hab. No Brasil, o volume de água subterrânea a menos de 1.000 m de profundidade e de boa qualidade para o consumo humano, está estimado em 112.000 km³, porém, existem bacias que estão no limiar de escassez hídrica como as do Atlântico leste, com somente 1.967 m³/ano/hab (MMA, 1998).

Desta maneira, embora com esta relativa abundância de água no país, a sua qualidade tem sido questionável. O Brasil concentra 12 % de toda a água doce do planeta no Aquífero Guarani, considerado o maior reservatório natural de água subterrânea da terra com 1,2 milhões Km², e que não está livre de problemas relacionados à escassez e qualidade das águas devido ao uso não planejado e à degradação ambiental (VASCONCELOS, 2002).

A poluição hídrica tem-se agravado no país, considerando-se o aumento das cargas poluidoras urbanas e industriais, o uso inadequado do solo, erosão, desmatamento, uso inadequado de insumos agrícolas e a mineração. Estes fatores levam a danos ambientais dos recursos hídricos, aliado ao aumento da concentração da população em determinadas regiões que implica em uma alta demanda por água disponível para abastecimento público e descarga de efluentes urbanos e industriais. Desta maneira, a união destes fatores acarreta danos ambientais causados pelo transporte de sedimento para a água superficial devido ao aumento das correntezas durante as chuvas e conseqüente contaminação orgânica e química das águas (MMA, 1998).

À medida que a demanda suplanta a oferta, os lençóis freáticos estão hoje diminuindo em todos os continentes. Dezenas de países estão enfrentando esse problema. Vivemos num mundo em que a água se torna um desafio cada vez maior. Infelizmente, no próximo meio século quase todos os três bilhões de habitantes irão nascer em países que sofrerão com a escassez de água (UMA, 2001).

Nos dias de hoje, muitas pessoas vivem em países que carecem de água, com problemas até mesmo para suprir suas necessidades higiênicas e produzir alimentos. Com a população de seis bilhões, o mundo tem um imenso déficit hídrico. Cerca de 70 % da água consumida mundialmente, incluindo o desvio dos rios e a bombeamento do subsolo, são

utilizados para irrigação e somente 20 % vão para a indústria e 10 %, para as residências para consumo humano (UMA, 2001).

Segundo dados do IBGE (2010), 78,6 % dos domicílios urbanos no Brasil têm acesso à água tratada. O número cai para 45,3 % na região norte do país. A rede de esgoto chega a 58,9 % das moradias em todo o país, no norte chegam a 11,5 %, em outras áreas 20,4 % têm fossas sépticas e as demais não contam com nenhum recurso de coleta do esgoto sanitário e tratamento.

Com relação ao saneamento completo (abastecimento de água, esgoto sanitário e coleta de lixo), o percentual de domicílios cobertos chega a apenas 60,3 %. No nordeste e no centro-oeste, o número cai para 41 % e no Norte para 11,5 %. O tratamento do esgoto coletado é feito em 28,5 % dos municípios brasileiros, por meio de estações de tratamento de esgotos (ETE) que possuem pré-tratamento, tratamento primário, tratamento secundário e tratamento terciário incluindo a remoção de nutrientes e a desinfecção (IBGE, 2010).

No sudeste somente 48,0 % dos municípios fazem o tratamento do esgoto, no Estado de São Paulo, o percentual de tratamento é de 78,4 % em 2008. No mesmo ano, 34,8 milhões de pessoas, ou seja, 18,0 % da população brasileira viviam em cidades sem rede coletora de esgoto (apenas 55,2 % dos municípios possuíam rede coletora); o aumento da população não acompanhou a construção de novas redes, mesmo levando-se em conta que nem a extensão nem a qualidade da rede estão incluídas nas estatísticas, e o município que possui somente um distrito atendido, já é considerado na estatística (IBGE, 2010).

A degradação e a conseqüente queda da qualidade dos recursos hídricos deixou de ser somente uma preocupação de ambientalistas, passando a representar um sério problema de saúde pública (MORAES & JORDÃO, 2002), pois a constante degradação ambiental em bacias hidrográficas de intensa ocupação antrópica tem alterado significativamente a

qualidade da água dos mananciais utilizados para abastecimento público, irrigação e recreação (CANTUSIO, 2008).

O lançamento de efluentes domésticos são a causa dessa deterioração da qualidade da água em países em desenvolvimento e desenvolvidos. Tais efluentes contêm misturas tóxicas, como pesticidas, metais potencialmente tóxicos, produtos industriais e uma variedade de outras substâncias com sérias conseqüências para a saúde humana (MORAES & JORDÃO, 2002).

Segundo o relatório da Organização das Nações Unidas (ONU, 2008), em países subdesenvolvidos como o Camboja, Indonésia, Filipinas e Vietnã, 1,6 milhões de pessoas morrem por ano devido à falta de água e saneamento básico. No início do século XX, 44,0 % das mortes ocorridas também em um país desenvolvido como os Estados Unidos foram por doenças infecto contagiosas, onde as doenças transmitidas pela água contribuíram com um quarto deste percentual. No Brasil 28 mil pessoas por ano ainda morrem por causa da contaminação da água (OMS, 2008).

Estes problemas também ocorrerem em regiões industrializadas como a região de Campinas, onde se encontram as seguintes micro-bacias hidrográficas: Capivari, Quilombo, Anhumas, Atibaia, Jaguari e Capivari - Mirim. Sendo que abastecem Campinas somente os rios Atibaia e Capivari. O rio Atibaia é formado pela junção dos rios Atibainha e Cachoeira, entre os municípios paulistas de Bom Jesus dos Perdões e Atibaia. O rio Atibaia abastece 95,0 % da água para a população de Campinas, que possui alta densidade industrial, com quase 5500 fábricas, além do efeito poluidor desta densidade urbano – industrial. A bacia do rio Atibaia fornece água para o sistema Cantareira, principal sistema de abastecimento de São Paulo e Campinas (SILVA, 2004).

O rio Capivari é afluente direto do Rio Tietê e localiza-se na região sul de Campinas, após passar pelos municípios de Monte Mor, Capivari, Rafar e Mombuca. Entre 2002 e 2003, os rios que integram a bacia do rio Capivari, apresentaram uma redução do índice de qualidade das águas (IQA) somente no ponto localizado à montante da região metropolitana de Campinas (RMC), onde o IQA passou de 52, classificado como “boa” para 47, “aceitável”. Nos pontos a jusante da RMC, observou-se um aumento do IQA, refletindo incremento na eficiência da rede de tratamento de efluentes. O ponto localizado próximo à foz do rio Tietê registra um aumento do IQA de 48 para 53, elevando a classificação realizada pela CETESB de “aceitável” em 2002, para “boa” em 2003.

Os índices indicativos da qualidade das águas superficiais na bacia do Rio Capivari que retratam a situação dos recursos hídricos nesta sub-bacia apresentaram valores variando entre “36” e “51”, sendo que classificações de 80 – 100 são consideradas ótimas, 52 – 79 boas, 37 – 51 aceitáveis, 20 – 36 impróprias para tratamento convencional e 0 – 19 imprópria para consumo humano (PCJ, 2007). Esse enquadramento é definido pelo CONAMA 357/2005, o qual estabelece um conjunto de parâmetros de qualidade e seus devidos fins de utilização (abastecimento, recreação e irrigação).

Atualmente o trecho do rio Capivari entre os municípios de Valinhos e jusante da sede de Monte Mor, encontra-se em situação correspondente a um rio com enquadramento classe 4 (PCJ, 2008-2020). Vale ressaltar que visando o abastecimento para consumo humano, é recomendável até classe 3 e esta área não se enquadra na classificação para águas de captação para tratamento (MORAIS, 2009; CONAMA 357/2005).

Com níveis de IQA tão baixos a água pode atuar como veículo de doenças, dentre elas as gastroenterites provocadas por protozoários patogênicos como *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. e também as provocadas por bactérias como *Campylobacter* spp.,

Shigella spp., *Salmonella* spp e *Escherichia coli*, que lideram significante taxa de morbidade e mortalidade em países em desenvolvimento e desenvolvidos (SNEL et al., 2009).

No mundo todo a cada 14 segundos, morre uma criança vítima de doenças de veiculação hídrica. Estima-se que 80,0 % de todas as moléstias e mais de um terço dos óbitos dos países em desenvolvimento, sejam causados pelo consumo de água contaminada. Em média, até um décimo do tempo produtivo de cada pessoa se perde devido a doenças relacionadas à água, tais como: amebíase, febre tifoide e paratifoide, hepatite A e B (OMS, 2008).

Entre os vários agentes patogênicos relacionados a veiculação hídrica, algumas das espécies dos protozoários parasitas como *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. são reconhecidos como causadoras de surtos de diarreia e, nos últimos 25 anos, estes organismos alcançaram grande relevância em saúde pública devido ao expressivo número de casos registrados (GAJADHAR & FORBES, 2002; MACPHERSON, 2005; KARANIS, 2007; CANTUSIO, 2008).

Cryptosporidium spp. e *Giardia* spp. estão amplamente dispersos no meio ambiente aquático e foram responsáveis por diversos surtos de criptosporidiose e giardiose por veiculação hídrica, tanto em países em desenvolvimento bem como em desenvolvidos como os Estados Unidos e Finlândia (FRANCO et al., 2001; PEREIRA et al., 2009; WANG ET al., 2011).

A transmissão destes organismos se deve ao estágio ambiental do ciclo de vida, que já está infectante quando eliminado no meio ambiente via fezes. *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. podem ser transmitidos para um humano, por qualquer material contaminado com oocistos e cistos se ingeridos por um hospedeiro suscetível. Tanto o *Cryptosporidium*

spp. como a *Giardia* spp. possuem ciclos de vida que possibilitam as transmissões de origem hídrica e alimentar, sendo a água o seu principal forma de transmissão (SMITH & NICHOLS, 2010).

No Estado de São Paulo, estes parasitos já foram detectados em água bruta superficial no rio Atibaia (FRANCO et al., 2001; CANTUSIO et al., 2010) e em águas subterrâneas (GAMBA et al., 2000) e teve seu primeiro registro de *Cryptosporidium* spp. em águas superficiais em 2002. Outro estudo realizado em amostras de 20 marcas diferentes de água mineral comercializadas em Campinas, foi detectada a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em uma das amostras (FRANCO & CANTUSIO, 2002). Sendo que a presença destes patógenos em água utilizada para consumo humano é um fator de risco para aquisição destas parasitoses (OLIVEIRA, 2005). No Brasil, também há registros da ocorrência de ambos os organismos em água superficial e subterrânea e em esgoto bruto e tratado (SANTOS, 2007; CANTUSIO, 2008).

No rio Atibaia, na cidade de Campinas, foi detectada uma concentração média de 64,14 cistos de *Giardia* spp. por litro, com uma positividade de 76 % das amostras, e uma concentração média de 0,08 oocistos de *Cryptosporidium* spp. por litro e positividade de 0,04 % nas águas deste manancial (OLIVEIRA, 2005).

Além destes trabalhos, considerou-se também a avaliação da concentração de *Cryptosporidium* spp. e de *Giardia* spp. que foi realizada pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) em 28 mananciais, dentre eles, o Capivari, o qual foi considerado um dos mais críticos (HACHICH et al., 2004).

De acordo com Jiang (2005), os leitos dos rios também são reservatórios de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp., e após fortes chuvas ocorre um aumento da quantidade destes cistos e oocistos, este comportamento ambiental pode propiciar o

deslocamento destas espécies que estão depositadas no sedimento e conseqüentemente serem captadas pelas estações de tratamento.

A Portaria M/S n. 518, de 25 de março de 2004, recomenda a pesquisa destas formas ambientais com o objetivo de assegurar a adequada eficiência de remoção de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. na água a ser distribuída para a população.

Desta maneira é fundamental que se monitore a freqüência e a distribuição destes parasitos em águas, considerando-se suas variações de densidade em locais que podem comprometer a saúde humana tais o rio Capivari que é um importante rio de abastecimento para a cidade de Campinas.

2- Revisão de literatura

2.1- *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. no meio ambiente

Segundo a OMS (2008), os patógenos de veiculação hídrica englobam bactérias, vírus e parasitos como: *Burkholderia pseudomallei*, *Campylobacter jejuni* e *C. coli*, *E. coli* 0157:H7, *Legionella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella* spp., *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, adenovírus, astrovírus, Hepatites A e E, rotavírus, *Acanthamoeba* spp., *Cyclospora cayetanensis*, *Entamoeba histolytica*, *Naegleria fowleri* e *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium* spp. e *Giardia duodenalis*.

Estes patógenos são causadores de gastroenterites que é o problema de saúde mais comum entre viajantes que visitam áreas em desenvolvimento, especialmente nos trópicos. Acima de 80 % dos episódios de diarreia em viajantes são de origem bacteriana, causadas principalmente por algumas espécies de *E. coli* e também são causadas por *Shigella* spp.,

Campylobacter spp. e *Salmonella* spp., assim como, metade dos casos de cólera registrados são causados pelo *Vibrio cholerae* (OMS, 2008).

Cryptosporidium spp. e *Giardia* spp. são os principais causadores de diarreia por protozoários, liderando uma significativa taxa de morbidade e mortalidade em países desenvolvidos e subdesenvolvidos (SNEL et al., 2009).

Os protozoários, *Giardia* spp. (40,6 %) e *Cryptosporidium* spp. (50,8 %) foram responsáveis pela maioria destes surtos no mundo, respectivamente. *Entamoeba histolytica* e *C. cayetanensis* foram os agentes etiológicos incriminados em nove (2,8 %) e seis (1,8 %) surtos, e *Toxoplasma gondii* e *Cystoisospora belli*, ocasionaram três surtos cada (0,9 %), enquanto dois (0,6 %) eventos foram a veiculação hídrica de *Blastocystis hominis*. Outros agentes parasitários, como *Balantidium coli*, microsporídios, *Acanthamoeba* e *Naegleria fowleri* foram responsáveis por um surto, cada um deles contribuindo com 0,3 % (KARANIS et al., 2007).

A transmissão destes agentes ocorre através da via fecal-oral ou por meio da urina, seguida por contato direto ou indireto com os estágios transmissíveis dos organismos. Parasitos como *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. podem ser transmitidos por três origens, antroponótica, zoonótica e sapronótica em substratos abióticos (SNEL et al., 2009).

Vários fatores contribuem para a ampla dispersão dos cistos de *Giardia* spp. e de oocistos de *Cryptosporidium* spp. no ambiente: são eliminados em grandes quantidades com as fezes de humanos e outros animais infectados no ambiente além de lançamentos de esgotos não tratados e tratados (considerando que os processos de tratamento de esgotos não são capazes de alcançar 100,0 % de remoção), a deposição de fezes animais em cursos d'água, o escoamento superficial do solo onde foram depositadas fezes de animais domésticos e silvestres (SMITH & GRIMASON, 2003).

Ferramentas para diagnóstico molecular estão sendo utilizadas para o acesso a taxonomia, ao potencial zoonótico, as transmissões de espécies de *Giardia* spp. e manifestações clínicas em humanos. Sendo que adaptações ao hospedeiro e a descoberta de genótipos e subgenótipos classificando-as em subgenótipos ou assembleias. Estes estudos também demonstraram variações na distribuição de genótipos de *Giardia duodenalis* que é a espécie que acomete o ser humano, entre diferentes áreas geográficas, entre ruminantes domésticos e selvagens e diferenças nas manifestações clínicas e, o potencial para causar surtos que algumas assembleias possuem (FENG & XIAO, 2011).

De acordo com Wang et al. (2011), o estudo molecular, resultou em 8 espécies e 6 genótipos de *Cryptosporidium* spp. infectando humanos, com as espécies *C. parvum* e *C. hominis* responsáveis pela maioria das manifestações clínicas, mas a distribuição destas duas espécies difere entre regiões geográficas.

Oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. são detectados em amostras de esgoto bruto e tratado, em concentrações que variam de 10^2 a 10^4 oocistos e 10^3 a 10^5 cistos/L, respectivamente (CARRARO et al, 2000). Santos et al, (2004) detectaram altas concentrações de cistos de *Giardia* spp. ($4,4 \times 10^4$ a $8,0 \times 10^4$ /L) em amostras de lodo ativado de uma estação de tratamento de esgoto de Campinas.

As formas císticas destes protozoários são capazes de suportar os processos de cloração da água e apresentam elevada persistência em condições ambientais adversas, podendo permanecer infectantes até seis meses, a 20°C em águas superficiais (MONS et al., 2008).

Estas formas císticas agregadas a outras partículas possuem velocidades de sedimentação de aproximadamente $1,4 \mu\text{m S}^{-1}$ em soluções salinas à 23°C , afetadas por características das partículas as quais estão agregadas, tais como, tamanho e densidade, que

aliadas a alta taxa de sobrevivência dos cistos podem resultar no seu acúmulo em sedimentos aquáticos representando assim, alto risco à empresas de saneamento (MEDEMA et al., 1998).

Além da possível concentração de cistos no ambiente, outro problema que ocorre mesmo em países desenvolvidos onde o tratamento de esgoto é praticado com tecnologia sofisticada e amplamente difundido, são os surtos que tiveram o esgoto doméstico como sendo a fonte poluidora dos recursos hídricos devido a falhas no processo de tratamento (GAJADHAR & ALLEN, 2004; MACPHERSON, 2005).

Atualmente o surto de giardiose por veiculação hídrica de maior destaque ocorreu na cidade de Bergen na Noruega entre os anos de 2004 e 2005, onde mais de 1500 pacientes foram diagnosticadas com giardiose. Este foi primeiro surto com estas dimensões na Noruega, onde teve como provável fonte de contaminação o lançamento de esgoto não tratado de uma área residencial que foram drenados em direção ao corpo hídrico de captação, confirmando que o lançamento de esgoto sem tratamento é a principal fonte de contaminação (ROBERTSON et al., 2006).

2.2- *Giardia*

Giardia spp. pertence à ordem Diplomonadida e família Hexamitidae e com ciclo biológico monoxênico (apenas um hospedeiro definitivo). O gênero *Giardia* teve as descrições das espécies, baseadas inicialmente apenas na especificidade do hospedeiro. Os taxonomistas utilizam como parâmetros a forma e a posição dos corpos medianos, a forma dos trofozoítos, o tamanho do disco ventral, entre outras características possíveis de observação por microscopia eletrônica. O trofozoíto (forma intestinal) é flagelado, em forma de pêra e possui um disco em forma de ventosa, por meio do qual se fixa à superfície

das células da mucosa intestinal, sendo encontrado em toda a extensão do duodeno nutrindo-se de substâncias líquidas. Ao se moverem para o cólon transformam-se em cistos com dimensões entre 6,0 e 12,0 µm que são a forma ambiental que completa o ciclo. Os cistos são eliminados pelas fezes em grande quantidade, ocorrendo períodos de interrupção de sua eliminação por sete a dez dias. Os trofozoítos também podem estar presentes nas fezes, mas são os cistos os responsáveis pela transmissão (FELICE, 1952).

Giardia spp. é o protozoário entérico patogênico mais comum em humanos e animais domésticos. Crianças com até 5 anos, particularmente aquelas que vivem em países em desenvolvimento e comunidades carentes, constituem uma categoria populacional que se encontra em maior risco de infecção com manifestações clínicas mais severas (MONIS, 2009).

A giardiose apresenta diversas manifestações clínicas, com sintomas de severidade variável, que incluem diarreia, perda de massa corpórea, dores abdominais e pode contribuir para o retardo do crescimento em crianças, dependendo da carga parasitária, devido à deficiência nutricional decorrente da má absorção de vitaminas lipossolúveis pelo hospedeiro infectado. A transmissão ocorre pelos seguintes mecanismos: ingestão de cistos que contaminam a água e alimentos, transmissão interpessoal em creches e hospitais psiquiátricos e transmissão sexual (sexo anal/oral) (GUIMARÃES & SOGAYAR, 2002).

A giardiose é responsável pela morbidade residual, que significa que, em determinadas áreas endêmicas, a prevalência da doença é baixa bem como a carga parasitária, causando fadiga crônica, síndrome do intestino irritável pós-infecção, o que provoca na primeira infância baixa função cognitiva e alteração no crescimento dependendo do estado nutricional e da carga parasitária (ESCOBEDO et al., 2010).

2.2.1- Espécies de *Giardia*

A aplicação de ferramentas moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) em isolados de *Giardia* spp. em amostras fecais e ambientais demonstrou que há um grande número de espécies e genótipos do protozoário devido à existência de especificidade de hospedeiro, podendo classificá-las em sete genótipos ou assembleias classificadas como A, B, C, D, E, F e G (THOMPSON, 2008, MONIS et al, 2009).

As assembleias A e B foram detectadas em humanos e em uma grande variedade de outros mamíferos e são divididas nos subgrupos, AI, BIII (zoonóticos), AII e BIV (exclusivamente humanos). As assembleias de C à G são hospedeiro- específicas, sendo que C e D são específicas para cães, a assembleia E específica para bovinos, ovelhas e porcos, F para gatos e G para ratos (THOMPSON, 2004).

Tabela 1: Espécies e respectivas assembleias do gênero *Giardia*.

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

Fonte: Adaptado de Monis et al., 2009.

Mais de 100 surtos de giardiose por veiculação hídrica foram relatados em todo o mundo do início do século passado até 2004. Nos últimos anos foram relatados casos de

giardiose por veiculação hídrica na Florida e em Hampshire nos EUA e também em Nokia na Finlândia. O surto de giardiose ocorrido na Noruega por veiculação hídrica acometeu mais de 1500 pessoas, é considerado um dos maiores surtos em número de pessoas afetadas (ROBERTSON et al., 2006).

A investigação molecular de amostras fecais obtidas durante este surto indicou que a maioria dos isolados de *Giardia duodenalis* estavam relacionados ao subgenótipo BIII, genótipo da assembleia B com reconhecido potencial zoonótico. Um pequeno número de cistos foi detectado na água e o esgoto doméstico foi a provável fonte de contaminação do recurso hídrico (ROBERTSON et al., 2006).

Alguns estudos de casos feitos no Brasil comprovam que a giardiose é uma parasitose de grande prevalência no país. Sua incidência varia de 12,4 % a 50,0 %, dependendo do estudo, da região e faixa etária pesquisada, vindo a predominar nas crianças entre zero e seis anos. Estudo feito em Botucatu/SP encontrou acometimento de crianças em uma faixa etária predominante de 1 a 4 anos (MONTEVERDE et al., 2007).

A formação de aglomerados sem saneamento básico e preparo sanitário, bem como o convívio em creches, aumenta a disseminação dos enteropatógenos como *G. duodenalis*, podendo ocorrer picos sazonais simultâneos à estação do verão, relacionado ao maior uso de piscinas comunitárias por crianças de pouca idade. As creches são locais em que comumente se encontram parasitoses intestinais. Trabalho feito em Aracaju, que avaliou se as creches são ambientes protetores ou propiciadores de infestação intestinal, em relação ao grupo-controle, verificou-se que a maior prevalência de parasitoses ocorria em crianças que frequentam creches (MONTEVERDE et al., 2007).

Porém grandes surtos ocasionados por *Giardia* spp. por veiculação hídrica não foram documentados até o momento no Brasil, talvez pela deficiência de diagnóstico e

registro dos casos. Contudo o problema pode ocorrer a qualquer momento devido à vulnerabilidade dos mananciais quanto à contaminação por patógenos (SANTOS et al., 2008).

2.3- *Cryptosporidium*

O gênero *Cryptosporidium* pertence ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, subclasse Coccidia, ordem Eucoccidiida, subordem Eimeríina, família Cryptosporiidae (PLUTZER & KARANIS, 2009).

É um coccídio intestinal que afeta várias espécies de répteis, aves e mamíferos. A criptosporidiose humana teve sua importância reconhecida a partir do surgimento dos primeiros casos de diarreia aquosa associados aos pacientes portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), no início dos anos 80. Estudos subsequentes comprovaram a criptosporidiose como uma doença esporádica e de duração limitada em pessoas saudáveis, mas a infecção pode ser particularmente severa entre os indivíduos com comprometimento do seu sistema imunológico como as crianças menores de cinco anos, os idosos, as pessoas desnutridas, aquelas em terapia com imunossupressores ou quimioterápicos, que podem apresentar diarreia crônica persistente e de longa duração (SODRÉ & FRANCO, 2001).

O protozoário *Cryptosporidium* spp. foi considerado como relevante problema de saúde pública, atingindo indivíduos imunocompetentes, após o surto de Milwaukee (Wisconsin-EUA) em 1993. Neste episódio, 403 mil pessoas foram infectadas em uma cidade de 1,5 milhões de habitantes, causando 100 mortes; no entanto, estes números foram subestimados porque somente pessoas com sintomas de diarreia aquosa foram consideradas no levantamento oficial (MACKENZIE et al., 1994)

Evidências moleculares têm demonstrado que o *C. parvum* não é uma espécie única, contendo vários genótipos distintos ou um complexo de espécies que exibem diferenças em especificidade de hospedeiro. O gênero *Cryptosporidium* consiste de mais de 20 espécies e mais de 60 genótipos (SMITH & NICHOLS, 2010).

C. parvum já foi considerada a única espécie de *Cryptosporidium* capaz de infectar humano. O uso de ferramentas de genotipagem no final dos anos 90 identificou dois genótipos (I e II) de *C. parvum*, que receberam a nomenclatura de *C. hominis* e *C. parvum sensu stricto*, ambos infectantes para imunocompetentes e imunocomprometidos. O uso de ferramentas de genotipagem baseado em fragmentos de RNA (ssRNA) revelou a presença de muitas outras espécies, incluindo *C. canis*, *C. felis* e *C. meleagridis* em fezes humanas, bem como, *C. muris* e *C. suis*. Em adição, muitos genótipos de *Cryptosporidium* spp. têm sido detectados em fezes humanas de pacientes com criptosporidiose, incluindo: o genótipo de cervídeo; genótipo semelhante ao *C. suis*; genótipo semelhante ao *C. andersoni*; genótipo de *Tamias striatus* (esquilo listrado); genótipo de *Didelphis marsupialis* (gambá); e o genótipo *C. hominis* em símios (FAYER, 2010).

O protozoário *Cryptosporidium* apresenta estágio ambiental infectante (oocistos) transmitido pela via fecal-oral a partir de um indivíduo infectado para outro susceptível, possui potencial zoonótico, pois infecta várias espécies de animais, é transmitido por meio de alimentos e água contaminados. Oocistos podem permanecer infectantes no ambiente por longos períodos e são insensíveis as concentrações de desinfetantes como cloro utilizado na descontaminação ambiental (ORTEGA & ADAM, 1997).

É necessário um número relativamente pequeno para se iniciar a infecção no hospedeiro susceptível, cerca de 9,0 a 1042,0 oocistos dependendo da espécie e, amplamente disperso no ambiente aquático como, rios, lagos, reservatórios, águas

subterrâneas e recreacionais, *Cryptosporidium* spp. causou numerosos surtos de gastroenterite relacionados à veiculação hídrica no mundo nas duas últimas décadas (FAYER et al., 2000; KARANIS, 2007).

Em água doce, os oocistos de *Cryptosporidium* spp. permanecem infectantes por seis meses, em temperatura entre 0 e 20°C e resistem à salinidade de 35,0 ‰ por 40 dias a 18°C, sendo esta mais uma das características que o torna uma espécie com alta taxa de sobrevivência ambiental (MONS et al., 2009).

Durante o processo de tratamento de água, a remoção desse organismo depende basicamente da remoção física. Estações de tratamento de água que utilizam o processo convencional de tratamento (com base na floculação, coagulação, sedimentação e filtração) alcançam, em geral, uma remoção de 99,0 ‰ dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas etapas de sedimentação e filtração, diminuindo assim o risco de transmissão. Porém a característica da compressibilidade que permite aos oocistos reduzirem seu tamanho de 2,94 - 8,4 µm para 2,0 - 4,0 µm quando expostos às altas pressões, pode permitir que os oocistos atravessem esses filtros. Soma-se a isso, a alta resistência dos oocistos à desinfecção da água e do efluente tratados (SANTOS, 2007).

2.3.1- Espécies de *Cryptosporidium*

As regras para aplicação de nomes científicos para organismos animais, incluindo *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., são publicados no Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN) (FAYER, 2010). Entretanto, alguns autores propuseram critérios para caracterização de uma nova espécie de *Cryptosporidium* spp.

Egyed et al., (2003) relataram que as espécies aceitas como *Cryptosporidium* spp. são aquelas que os oocistos foram inteiramente caracterizados quanto a morfologia e

informação genética. Já para Xiao et al., (2004), os requisitos mínimos para uma nova espécie inclui dados morfométricos, caracterização genética, conhecimento de hospedeiros naturais e infectados experimentalmente e por último, enquadramento as regras ICZN.

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

A aplicação de técnicas moleculares tem contribuído para a detecção e diferenciação das espécies e genótipos de *Cryptosporidium* spp., como também, a caracterização da transmissão dos oocistos entre outros animais e humanos (XIAO, 2010).

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.

Ainda hoje é controverso o número de espécies do gênero *Cryptosporidium* e muitas têm sido aceitas e excluídas. De acordo com Fayer (2010), as espécies aceitas são: *C. andersoni*, *C. bovis*, *C. parvum*, *C. ryanae* (parasitando ruminantes e bovinos), *C. baileyi*, *C. galli*, *C. meleagridis* (parasitando aves e galináceos), *C. canis* (parasitando cães domésticos), *C. felis* (parasitando gatos domésticos), *C. fayeri*, *C. macropodum* (parasitando canguru), *C. hominis*, *C. parvum* (parasitando humanos), *C. muris*

(parasitando camundongo), *C. serpentis* (parasitando répteis), *C. suis* (parasitando suínos), *C. varanii* e *C. wrairi* (parasitando porquinho da índia).

Em 2009, Fayer e Santín identificaram uma nova espécie: *C. xiaoi* que foi previamente denominada como *C. bovis-like*. Não foram consideradas como espécies *C. molnari*, *C. scophthalmi* (parasita de peixes) e *C. fragile* (parasita de sapo) por não apresentarem dados taxonômicos suficientes (FAYER, 2010). Também não foram aceitos, *C. anserinum* e *C. tyzzeri* (LINDSAY e BLAGBURN, 1990). *C. nasorum* não foi considerado por não ter descrição suficiente (RYAN et al, 2004; XIAO et al, 2004), e também não foi considerada como nova espécie, *C. blagburni*, pois dados moleculares indicaram que é a mesma espécie que *C. galli* (RYAN et al, 2003).

Tabela 2: Gênero *Cryptosporidium*, espécies, autores, hospedeiros

| Espécie | Autor | Hospedeiro |
|-------------------------------------|--|--------------------|
| <i>Cryptosporidium molnari</i> | Alvarez- Pellitero and Sitjà Bodadilla, (2002) | Peixe |
| <i>Cryptosporidium schophthalmi</i> | Alvarez- Pellitero et al., (2004) | Peixe |
| <i>Cryptosporidium serpentis</i> | Levine (1980) | Serpente |
| <i>Cryptosporidium varanii</i> * | Pavlàsek et al., (1995) | Lagarto |
| <i>Cryptosporidium fragile</i> | Jirku et al., (2008) | Sapo |
| <i>Cryptosporidium meleagridis</i> | Slavin, (1995) | Peru |
| <i>Cryptosporidium baileyi</i> | Current et al., (1986) | Galinha |
| <i>Cryptosporidium galli</i> | Pavlàsek, (1999) | Galinha |
| <i>Cryptosporidium muris</i> | Tyzzer, (1907) | Camundongo |
| <i>Cryptosporidium parvum</i> | Tyzzer, (1912) | Camundongo |
| <i>Cryptosporidium wrairi</i> | Vetterling et al., (1971) | Porquinho da Índia |
| <i>Cryptosporidium felis</i> | Iseki, (1979) | Gato |
| <i>Cryptosporidium andersoni</i> | Lindsay et al., (2000) | Boi |
| <i>Cryptosporidium canis</i> | Fayer et al., (2001) | Cães |
| <i>Cryptosporidium hominis</i> | Morgan-Ryan et al., (2002) | Homem |
| <i>Cryptosporidium suis</i> | Ryan et al., (2004) | Porco |
| <i>Cryptosporidium bovis</i> | Fayer et al., (2005) | Boi |
| <i>Cryptosporidium fayeri</i> | Ryan et al., (2008) | Canguru |
| <i>Cryptosporidium ryanae</i> | Fayer et al., (2008) | Boi |
| <i>Cryptosporidium macropodum</i> | Power and Ryan, (2008) | Canguru |
| <i>Cryptosporidium xiaoi</i> | Fayer and Santín, (2009) | Carneiro |

Fonte: (FAYER, 2009; FAYER e SANTÍN, 2009). * Sinônimo de *C. saurophilum* (Koudela Modry, 1998)

De 1984 a 2000, 76 surtos epidêmicos de transmissão hídrica foram associados ao *Cryptosporidium* em países como EUA, Inglaterra, Irlanda do Norte, Canadá, Japão, Itália, Nova Zelândia e Austrália, atingindo 481.026 pessoas; destes 59,2 %; (n = 45) estavam relacionados à água potável e 40,7 % (n = 31) ao uso de água recreacional. As causas mais freqüentes de contaminação foram falhas operacionais dos sistemas de tratamento, o

contato da água com o esgoto ou, acidente fecal, no caso de águas recreacionais (GLABERMAN, 2002).

O episódio ocorrido em Milwaukee (EUA) teve o maior número de casos já documentado: 403.000, com 4.400 hospitalizações e a morte de cerca de uma centena de pessoas. Fatores como a diminuição da efetividade do processo de coagulação e filtração de uma das companhias locais de abastecimento de água, ocasionaram um aumento da turbidez da água tratada e a remoção inadequada de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (KRAMER et al., 1996).

Posteriormente, a aplicação de técnicas moleculares tornou possível averiguar que *C. hominis* foi o principal agente etiológico envolvido no surto de Milwaukee (PENG et al., 1997) e, mais recentemente, o estudo da sequência de genes que codificam a glicoproteína GP60 permitiu identificar a existência de variação intraespecífica, ou seja, o subgenótipo l-b foi responsável pelo episódio de abril de 1993, o que justifica as observações clínicas feitas por ocasião do surto: 93,0 % dos indivíduos infectados haviam relatado, em inquérito telefônico, a ocorrência de diarreia aquosa com duração entre 12 e 19 dias, um período excepcionalmente longo em se tratando de indivíduos imunocompetentes. Hoje, sabe-se que o subgenótipo l-b exibe uma acentuada virulência (FRANÇA, 2007).

A ampliação dos estudos na área ambiental, com a realização de investigação de amostras disponíveis de esgoto bruto da cidade de Milwaukee, evidenciou a ocorrência de seis espécies de *Cryptosporidium*, à época do surto: *C. andersoni*, *C. muris*, *C. hominis*, *C. parvum*, *C. canis*, *C. felis* e *Cryptosporidium* genótipo cervídeo (XIAO et al., 2001).

Em Las Vegas, Nevada, EUA, também ocorreu outro evento onde uma estação de tratamento considerada modelo de tratamento de água, experimentou um surto epidêmico (n = 103 casos) que foi reconhecido primeiramente a partir do diagnóstico da infecção entre

as pessoas portadoras da síndrome da imunodeficiência (SIDA). Este surto teve sete meses de duração (ROEFER et al; 1996; FRANÇA, 2007). Esta estação de tratamento já praticava o monitoramento dos protozoários *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. por ocasião do surto e nenhuma falha operacional pode ser comprovadas, porém, após 18 meses de monitoramento, uma única amostra positiva para *Cryptosporidium* spp. foi detectada entre aquelas colhidas, e referente às águas de retro lavagem dos filtros. Ao todo, 41 pessoas vieram a óbito, destas, pelo menos vinte tiveram a criptosporidiose como causa de morte, registrada na certidão de óbito (FRANÇA, 2007).

2.4- Investigação da concentração de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp., na interface sedimento-água.

Análises de amostras de água superficial são determinantes para se conhecer o nível de eutrofização de um ambiente, bem como análises da interface sedimento-água, pois, sabe-se que concentram poluentes, tornando-se de fundamental importância que se pesquisem suas características (NETO et al., 2009).

A utilização da interface sedimento-água para estudos de caracterização ambiental apresenta algumas vantagens com relação ao meio hídrico circulante, pois esta corresponde a um dos segmentos ambientais mais estáveis em termos físicos e químicos e concentração de algumas espécies de bactérias, e proporciona proteção contra os raios ultravioleta. Por essa razão, são frequentemente indicativos da qualidade média das águas (BONATTI et al., 2007)

A amostragem da interface pode ser superficial ou sub-superficial. As amostras superficiais, que tem interesse particular neste trabalho, são aquelas que se situam no topo da coluna sedimentar ou interface sedimento-água (em depósitos aquáticos) ou sedimento

atmosfera (em depósitos subaéreos). Estas interfaces apresentam suas características determinadas por processos ambientais como dispersão e sedimentação. As amostras sub-superficiais, consistem no material que está abaixo da interface sedimento-água ou sedimento-atmosfera (BAISCH et al., 2003).

De acordo com Jiang (2005), após fortes chuvas ocorre um aumento massivo na turbidez das águas superficiais que geralmente pode ser relacionado com o aumento da quantidade de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp., este fato pode liberar tais espécies contaminantes depositados na interface sedimento-água.

Em estudo realizado por Graczyk et al., (2007) esses autores demonstraram que a suspensão desta interface dos rios causada por ação mecânica eleva os níveis de oocistos de *C. parvum*, cistos de *G. duodenalis* e alguns microsporídios, particularmente *Enterocytozoon bieneusi*. As ocorrências dos fenômenos de acúmulo de espécies na interface sedimento-água a qualifica como sendo de extrema importância em estudos de impacto ambiental.

As interações hidrodinâmicas entre os cistos de *Giardia* spp., oocistos de *Cryptosporidium* spp. e as partículas suspensas na coluna d'água reduz suas concentrações na água superficial. Estas associações aumentam a taxa de velocidade de sedimentação transferindo-os para o leito do rio, de acordo com o trabalho de Kristin et al., (2006).

Além das espécies citadas acima existem outros enteropatógenos antropozoonóticos que possuem distribuição agregada ao leito do rio, tais como: *Encephalitozoon intestinalis*, *E. hellen* e *E. cuniculi*, que também causam considerável morbidade e podem causar o óbito em indivíduos imunossuprimidos (CROCKETT, 1995; GRACZYK et al., 2007).

3- Justificativa

No Brasil, a detecção dos protozoários *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. foi registrada em diversas amostras, como: águas superficiais, subterrâneas, tratadas, fontes naturais, dentre outras.

Em decorrência do potencial risco à saúde humana, representado pela possível presença destes organismos na água de abastecimento, e a recomendação do Ministério da Saúde por meio da Portaria 518 de 25 de março de 2004 para a pesquisa, dentre outros, de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e de cistos de *Giardia* spp., fundamentam à necessidade de estudos e pesquisas em mananciais utilizados para fins de abastecimento público.

Ressalte-se também a relevância deste estudo quanto à investigação destes protozoários na interface sedimento-água do rio Capivari (juntamente com as amostras superficiais), pois são poucos os estudos descritos na literatura em amostras desta área dos rios relacionados à concentração oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. o que pode comprometer diretamente a qualidade da água.

O monitoramento da interface sedimento-água torna-se justificável, pois se sabe que somente 0,1 % dos contaminantes estão dissolvidos na água, e 99,9 % estão concentrados no fundo dos rios. Como o revolvimento do fundo do rio pode mudar as características da água, o ponto CAPI torna-se crítico com relação ao sedimento por ser o local de tomada da água bruta da ETA

4- Objetivos

- Avaliar a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em amostras da água bruta superficial do Rio Capivari.
- Determinar a qualidade da água do rio Capivari mediante parâmetros físico-químicos (cor, pH e turbidez) e parâmetro microbiológico (coliformes termotolerantes).
- Avaliar a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em amostras da interface sedimento – água no Rio Capivari.

5- Material e métodos

5.1- Locais de coleta das amostras de água bruta superficial

O rio Capivari pertence ao estado de São Paulo, afluente norte do rio Tietê. Sua nascente fica entre os municípios de Louveira e Jundiaí, passando pelas cidades de Campinas, Monte Mor e Capivari, desaguando no rio Tietê, não muito longe da cidade de Laranjal Paulista. De acordo com a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental e Fiscalização (CETESB, 2010) o rio apresenta-se fortemente impactado, devido ao lançamento de esgotos industriais e domésticos sem tratamento, entretanto é utilizado como fonte de captação de água para distribuição pública na estação de tratamento ETA Capivari.

Esta estação está localizada na cidade de Campinas, no Km 86 da Rodovia dos Bandeirantes e utiliza o rio Capivari como fonte de captação, sendo responsável por uma parte da produção de água potável do município. Está em operação desde 1988 com o tratamento convencional diferenciado (com pré-cloração), tendo capacidade de produção de aproximadamente 210 L/s de água tratada.

Nessa pesquisa, foram escolhidos dois pontos próximos a esta estação de tratamento de água utilizada pela SANASA, onde foram colhidas mensalmente, amostras de 2 litros de

água bruta superficial durante 18 meses ($n = 36$), sendo o primeiro ponto de coleta denominado CAP1, localização: ($23^{\circ}00'15,11'' - S$) – ($47^{\circ}05'56,49'' - W$) (Figura 1).



Figura 1: Ponto de coleta CAP1 localizado próximo a ETA Capivari. Fonte: Google Earth, 09-11-11.

O segundo ponto de coleta denominado CAP2, localizado à montante da estação de tratamento de água, localização: ($23^{\circ}03'37,45'' - S$) – ($47^{\circ}00'38,81'' - W$) (Figura 2).



Figura 2: Ponto de coleta CAP2 localizado a montante da ETA Capivari. Fonte: Google Earth, 09-11-11

5.2- Local de coleta das amostras da interface sedimento-água

Foram coletados mensalmente, aproximadamente 250 mL da interface sedimento-água no ponto CAP1 (Figura 3) durante 18 meses ($n = 18$), com auxílio de uma draga de Ekman modelo B5023 (Figura 4). No ponto de coleta CAP2 não foi possível coletar o sedimento devido às características do fundo do rio e a forte correnteza apresentada neste local.



Figura 3: Entrada da ETA Capivari, local de coleta das amostras da interface sedimento-água.

5.2.1- Draga de Ekman modelo B5023

A draga de Ekman tem formato de caixa, possui sistema de fechamento e acesso ao sedimento amostrado. O amostrador de Ekman desce ao fundo com as tampas superiores e também as duas mandíbulas em forma de segmento de cilindro aberto. Assim que toca o fundo é lançado o mensageiro e espera-se o fechamento da draga por meio da liberação da tensão em duas potentes molas de aço que ficam instaladas nas laterais do equipamento além do fechamento das tampas superiores. Este amostrador tem a vantagem de preservar a

superfície da interface sedimento-água referente à aproximadamente 5 cm na coluna sedimentar (FIGUEIREDO & BREHME, 2001).



Figura 4: Draga de Ekman modelo B5023 utilizada para as coletas da interface sedimento-água.

5.3- Análise parasitológica

As análises parasitológicas incluíram todas as amostras de água bruta superficial e da interface sedimento-água, como segue:

5.3.1- Recuperação de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. da água bruta superficial, a partir do material filtrado

A metodologia empregada foi a de filtração em membrana de ésteres mistos de celulose, 47,0 mm de diâmetro e 3,0 μm de porosidade nominal, utilizando bomba de vácuo, de acordo com Franco et al. (2001).

Após filtração, os oocistos e cistos eventualmente presentes nas diversas amostras foram eluídos da membrana filtrante por meio de extração mecânica e alternadamente, por lavagem da superfície da mesma com solução Tween 80 (0,01%), por 20 minutos. A seguir,

o líquido resultante foi transferido para tubos de centrífuga, após centrifugações sucessivas com água ultrapura (Milli-Q[®]) a 1050 x g, por 10 minutos, o sobrenadante final foi descartado e o sedimento ressuspensado para um volume de 1 mL; uma alíquota de 10 µL foi examinada mediante o emprego da reação de imunofluorescência direta (RID), num prazo máximo de 24 horas.

Para amostras de água bruta com valores de turbidez acima de 50 NTU e abaixo de 100 NTU, após a etapa de centrifugação e raspagem da membrana, utilizou-se a separação imunomagnética (IMS) para purificação dos organismos-alvo.

5.3.1.1- Procedimento para separação imunomagnética (IMS), utilizado para as amostras de água bruta superficial, com turbidez acima de 50 NTU.

A separação imunomagnética consiste na separação seletiva de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* spp., a partir de concentrados de amostras de água, usando-se esferas microscópicas, uniformes, monodispersas, paramagnéticas, recobertas com anticorpos purificados contra cistos e oocistos. Neste estudo, foi usado o Kit comercial Dynabeads[®] que contém os seguintes reagentes: Dynabeads anti-*Cryptosporidium*; Dynabeads anti-*Giardia*; Tampão A 10X; Tampão B 10X.

A partir do volume final de 1 mL e o sedimento de até 500 µL, de acordo com a técnica de concentração usada (filtração em membranas), e após o preparo dos tampões requeridos (A 10X e B 10X fornecidos com o kit comercial), à amostra (volume final de 10 mL com sedimento) foi transferida para o tubo Dynal L10 contendo os tampões. As microesferas paramagnetizadas (Dynabeads anti-*Cryptosporidium* e anti-*Giardia*) foram agitadas por 10 segundos e adicionadas (100 µL) ao tubo de Lyton e colocado no “mixer” rotatório (Dynal MX – 1) por uma hora. Após esse período, este tubo foi transferido para o

concentrador magnético de partículas (MPC 1) com o lado reto do tubo voltado para o magneto e procedendo à agitação manual longitudinalmente num ângulo de 90° por 2 minutos. Após descarte cuidadoso do sobrenadante, a amostra foi ressuspensa, adicionando-se 1 mL de tampão (A 10 X), e todo o volume presente foi transferido gentilmente para um tubo de centrífuga.

A seguir, este tubo de centrífuga foi colocado no concentrador magnético MPC-S, efetuando-se nova agitação manual por 1 minuto, com aproximadamente um giro por segundo. Após este tempo, retirou-se todo o sobrenadante com auxílio de pipeta. Foi removida a fita magnética do concentrador e conduziu-se a dissociação ácida adicionando-se 50 µL de ácido clorídrico (HCl) 0,1 N. Após agitação por 10 s, o tubo foi colocado novamente no concentrador de partículas – MPC-S, sem a fita magnética. Após o tempo de espera necessário (10 minutos), levou-se o tubo de centrífuga novamente para agitação por 10 s e depois foi inserido novamente no concentrador MPC-S, agora com a fita magnética por 10 s. Finalmente, todo o volume presente no tubo de centrífuga foi transferido para o poço da lâmina de imunofluorescência, que foi previamente preparado adicionando-se 10 µL da solução de hidróxido de sódio 1 N. Em seguida, a alíquota da amostra purificada por IMS foi espalhada cuidadosamente na lâmina para visualização em microscópio de fluorescência, após a coloração com os anticorpos monoclonais, com aumento de 630X.

5.3.2- Recuperação de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. a partir das amostras da interface sedimento-água

A técnica de detecção de oocistos e cistos em amostras de sedimento foi adaptada a partir de Kepner e Pratt (1994), que utiliza a solução de pirofosfato de tetrassódio para a dispersão de bactérias no solo. Dessa forma, visando a desagregação dos oocistos e cistos

das outras partículas do sedimento, empregou-se nesse estudo a combinação de tratamentos físicos e químicos, como o agente dispersante pirofosfato tetrassódio 0,001 M e TRIS.

No laboratório foram transferidos 5 mL do material colhido na interface sedimento - água (250 mL), após homogeneização, para o tubo de centrifuga e adicionados 1 mL de solução de pirofosfato tetrassódio (0,001 M) e 4 ml de tampão TRIS. O tubo de centrifuga foi levado ao aparelho vortex para agitação por 30 s e deixado em repouso refrigerado à 4°C.

Após 24 horas, levou-se o tubo de centrifuga novamente ao aparelho vortex por 2 minutos e após a homogeneização, centrifugou-se o tubo contendo a amostra 2 vezes a 1050 x g por 10 minutos, entre cada centrifugação foi desprezado o sobrenadante até 1 ml e elevado o volume para 10 mL com água ultrapura e reduzido para 1mL. As 12 amostras iniciais foram processadas desta forma, as 06 amostras finais tiveram mais uma etapa adicionada no procedimento com a finalidade de melhorar a recuperação dos cistos e oocistos, considerada a média obtida no período de 12 meses. Assim, introduziu-se um passo de desagregação de partículas empregando o ultrassom, durante 60 s, após a segunda centrifugação.

Após esta etapa, transferiu-se uma alíquota de 10 µL para o poço da lâmina de imunofluorescência direta (RID) para a reação com anticorpos anti-*Cryptosporidium* e anti-*Giardia* para visualização.

5.3.3- Visualização e quantificação de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp., através da RID com anticorpos monoclonais específicos

As alíquotas obtidas foram transferidas para o poço da lâmina de imunofluorescência, espalhadas com o auxílio de uma ponteira e após 10 minutos foram adicionadas à superfície

de cada poço da lâmina 10 µL de metanol, e esperou-se 10 minutos. Após este período foi colocada uma gota do reagente de detecção anti-*Cryptosporidium* e anti-*Giardia* e, em seguida o contra corante em cada poço da lâmina, que foi transferida para a câmara escura e úmida a temperatura ambiente por 30 minutos. A retirada do excesso de reagente foi feita com uma solução de eluição do kit 1 vez e 1 vez com água ultrapura e, após a secagem da lâmina com papel macio, foi colocado o meio de montagem (1 gota no centro de cada poço) e por último a lamínula.

5.3.4- Teste para confirmação das estruturas observadas utilizando o corante fluorogênico 4 – 6 – diamidino – 2 – phenilindol (DAPI)

A utilização do corante fluorogênico vital DAPI foi empregada nas mesmas lâminas da RID como teste confirmatório das estruturas, e foram coradas da seguinte maneira:

A solução de trabalho diluída foi preparada no dia da análise, no momento do uso e protegidas da luz, sendo a solução estoque restante do corante DAPI guardada sob refrigeração. Nas lâminas foram aplicados 50 µL da solução de DAPI (1/5000 em PBS), após o corante da RID a cada poço da lâmina e mantida em temperatura ambiente por aproximadamente 10 minutos. Após este período, foi aspirado o líquido superficial, cuidadosamente, inclinando-se a lâmina e utilizando uma pipeta Pasteur para retirada do excesso do DAPI, sem escarificar o poço da lâmina. Foi aplicado 50 µL de PBS (pH 7,2 150 mM) a cada poço esperando que reagisse por 5 minutos, logo após foi aspirado o PBS repetindo este passo mais duas vezes. Após esta etapa foi colocado uma gota de água ultrapura por 1 minuto e após este tempo, o líquido do poço da lâmina foi aspirando cuidadosamente.

As lâminas foram colocadas no dessecador e protegidos da luz durante 1 hora; logo após, foi colocado o meio de montagem, cobertas com lamínula e as lâminas estavam prontas para visualização.

As preparações foram examinadas em microscópio de epifluorescência Zeiss Axiolab que contém um filtro de excitação no comprimento de onda de 450 - 490 nm que emite luz azul e observação feita com aumento de 400, 630 e 1000 X.

5.3.5- Controle positivo para as amostras de água bruta superficial

Foram realizados experimentos-controles positivos, a cada três amostras de água superficial (n = 6), nos dois pontos de coleta. Para isso foi semeado uma quantidade conhecida de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp., utilizando-se o Kit Color Seed® que contém aproximadamente 100 cistos e 100 oocistos ($100 \pm 1DP$) gama-irradiados.

Para cada 1 L das amostras de água superficial foi inoculado o ColorSeed®, que após adicionar 2 mL de Tween 20 - 0,05 % (v/v) o tubo foi tampado e agitado vigorosamente. Após esta etapa, foi novamente adicionado ao tubo 3 mL de água ultrapura, este agitando vigorosamente e após verter a amostra, esta última etapa foi repetida novamente.

Os cistos e oocistos do controle Color Seed® quando observado em comprimento de onda específico, emitem a fluorescência vermelha enquanto que os cistos e oocistos naturais da amostra corados pela RID não emitirão esta fluorescência.

5.3.6 - Controle negativo para as amostras de água bruta superficial

Para os controles negativos, foram submetidas 6 amostras de 1 L de água ultrapura ao mesmo processamento que as amostras de água superficial nos meses que se efetuou os controles positivos.

5.3.7 - Controle positivo para as amostras da interface sedimento-água

Foram realizados experimentos-controles positivos a cada 3 meses (n = 6), onde foi semeada uma quantidade conhecida de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. do kit comercial Color Seed®. O procedimento de inoculação dos cistos e oocistos foi o mesmo utilizado para as amostras de água bruta superficial.

Não foi possível efetuar os controles negativos para as amostras da interface sedimento água devido às características da amostra.

5.3.8 - Critérios de positividade dos protozoários

Para a identificação dos cistos e oocistos foram considerados os seguintes indicadores durante a leitura microscópica das preparações:

a) Imunofluorescência (RID).

Grau de fluorescência definida pela intensidade verde-maçã brilhante, mais acentuado na parede do cisto e também do oocisto (aspecto em anel). Esta fluorescência foi comparada àquele exibido por mais de 50,0 % dos oocistos e cistos presentes nas suspensões de controles positivo

b) Tamanho e formato

Compatíveis: 2,94 - 8,4 µm de diâmetro e forma esférica para oocistos; 6-12 µm e forma oval para cistos.

c) Contraste de fase.

Estruturas internas: presença de sutura para oocistos; a presença de axonemas e visualização dos núcleos para cistos.

d) Teste confirmatório utilizando DAPI.

Observação do núcleo (1 a 4) corados em azul-céu, visualizados dentro de um único oocisto/cisto, em geral, apresentando coloração azul intensa, de acordo com o Método 1623 (NANCY et al, 2008).

5.4- Estimativa da concentração de cistos e oocistos

a) Para a estimativa do número de cistos e oocistos em água bruta superficial, foi utilizada a seguinte fórmula para o cálculo da concentração na água superficial (USEPA, 2005):

$$X = \frac{A}{B} \times \frac{C}{D} \quad (1)$$

Sendo:

A = Número de cistos e oocistos visualizados no poço da lâmina.

B = Volume da alíquota semeada no poço da lâmina (μ L).

C = Volume de sedimento final (mL).

D= Volume total de amostra filtrada (L).

b) Para as amostras de sedimento, foi utilizada a seguinte fórmula para o cálculo da concentração de oocistos/cistos (BARROS et al. 2010):

$$Y = \frac{F \times G \div H}{I} \quad (2)$$

Sendo:

F = Número de cistos e oocistos visualizados no poço da lâmina.

G = Volume do sedimento final (μL).

H = Volume da amostra inoculado no poço da lâmina (μL).

I = Volume de amostra analisado (L).

5.5 - Eficiência de recuperação

Apenas as formas que apresentaram a coloração verde-maçã foram consideradas como naturalmente presentes nas amostras, as formas que apresentaram fluorescência vermelha foram consideradas como provenientes do kit ColorSeed®, fornecendo assim a estimativa da sensibilidade da metodologia empregada, com base no número de oocistos e cistos visualizados e enumerados mediante a RID.

a) Para isso utilizou-se a seguinte formula (USEPA, 2005):

$$\text{ER} = \frac{\text{J}}{\text{K}} \times 100 \times \text{Fc} \quad (3)$$

Sendo:

J = Número de cistos e oocistos recuperados (encontrado em 10 μL).

K = Número de cistos e oocistos semeados na amostra (esperado em 10 μL).

Fc = Fator de correção: utilizado somente para as amostras de sedimento. Refere-se à região onde possivelmente estão concentrados os cistos e oocistos, é formado após a centrifugação e corresponde a aproximadamente 100 μL na superfície do sedimento. O

cálculo é efetuado por meio da divisão do valor da área de concentração (100 μ L) dividido pelo volume total do sedimento formado no fundo do tubo de centrifuga.

5.6 - Análises microbiológicas e físico-químicas e estatísticas das amostras de água bruta

Em relação aos parâmetros físico-químicos (pH, turbidez e cor) e microbiológico (coliformes termotolerantes), foram realizadas análises da água bruta superficial do rio Capivari de acordo com os procedimentos descritos no STANDARD METHODS 21^a edição (APHA, AWWA, WEF, 2005), estas análises não foram efetuadas para a interface sedimento-água pois não era possível aplicar os métodos utilizados neste tipo de amostra.

Para verificar se houve diferença significativa entre as médias dos valores dos parâmetros físico-químicos e microbiológico entre os pontos de coleta CAP1 e CAP2, foi realizada a Análise de Variância (ANOVA) entre dois fatores com nível de significância de 5,0 %.

Nos testes significativos foi feito o Teste de Comparação Múltipla de Médias (Teste de Duncan); para testar as diferenças entre as médias das concentrações encontradas, que é um teste paramétrico que as localiza por meio de diferentes agrupamentos (Letras A e B), sendo adotado o nível de significância de 5,0 %.

A escolha deste teste fundamentou-se na comparação múltipla de médias dos parâmetros analisados de cada ponto de coleta, testando a homogeneidade do grupo (CAP1, CAP2 e interface sedimento-água), cuja diferença entre os pontos pode ser significativa ou não.

Também foi utilizada a análise de Correlação de Pearson ou Coeficiente r de Pearson para verificar a existência de correlação (positiva ou negativa e probabilidade

menor que 5 %) entre os parâmetros físico-químicos e biológicos analisados referentes a cada ponto de coleta (CAP1, CAP2 e interface sedimento-água).

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

6.0- Resultados

Os resultados parasitológicos referentes à ocorrência e concentração de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. estão apresentados juntamente com a discussão de cada ponto. Os resultados dos parâmetros físico-químicos (cor, turbidez e pH) e microbiológico (coliformes termotolerantes) também são apresentados separadamente pelos pontos de coleta CAP1, CAP2 e interface sedimento-água juntamente com a discussão de cada ponto.

6.1- Análises estatísticas

Os resultados das análises estatísticas foram utilizados nas respectivas discussões e demonstrados integralmente a partir do item 7.

6.2- Experimento controle da água bruta superficial (CAP1)

A eficiência de recuperação média foi de 34,6 % para cistos e 16,7 % para oocistos (Tabela 3), sendo que o maior valor de recuperação foi de 50,0 % para cistos e 40,0 % para oocistos, ambos no mês de agosto de 2010. As menores porcentagens de recuperação ocorreram no mês de novembro de 2009 apenas para oocistos de *Cryptosporidium* spp. quando a turbidez apresentou valores acima de 50 NTU (Prancha 1, Figura A2).

Tabela 3: Porcentagem de recuperação de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. nos experimentos controles positivos realizados nos meses de agosto 2009, novembro 2009, fevereiro 2010, maio 2010, agosto 2010 e novembro 2010, para as amostras de água bruta superficial do ponto CAP1 do rio Capivari.

| Data das coletas | Turbidez (NTU) | Recuperação de cistos de <i>Giardia</i> spp. (%) | Recuperação de Oocistos <i>Cryptosporidium</i> spp. (%) |
|------------------|----------------|--|---|
| 11/agosto/09 | 29,0 | 42,0 | 27,0 |
| 18/novembro/09* | 75,9 | 40,0 | 0,0 |
| 10/fevereiro/10 | 46,6 | 32,5 | 15,0 |
| 18/maio/10 | 19,8 | 25,0 | 0,0 |
| 17/agosto/10 | 15,8 | 50,0 | 40,0 |
| 18/novembro/10 | 49,9 | 18,0 | 18,0 |
| Médias/± DP | 39,5 ± 22,3 | 34,6 ± 11,8 | 16,7 ± 15,6 |

Legenda: * = Amostra com IMS, DP = Desvio Padrão.

6.3- Experimento controle da água bruta superficial (CAP2)

A eficiência de recuperação média foi de 48,9 % para cistos e 12,2 % para oocistos (Tabela 4), sendo que o maior valor de recuperação encontrado foi de 96,0 % para cistos e 32,0 % para oocistos, ambos na amostra do mês de agosto de 2009, os menores valores encontrados foram no mês de novembro de 2009 e maio de 2010 (Prancha 1, Figura B2).

Tabela 4: Recuperação de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. nos experimento controle positivos realizados nos meses de agosto 2009, novembro 2009, fevereiro 2010, maio 2010, agosto 2010 e novembro 2010, para as amostras de água bruta superficial do ponto CAP2 do rio Capivari.

| Data das coletas | Turbidez (NTU) | Recuperação de cistos de <i>Giardia</i> spp. (%) | Recuperação de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. (%) |
|--------------------|--------------------|--|---|
| 11/agosto/09 | 32,9 | 96,0 | 32,0 |
| 18/novembro/09* | 91,1 | 19,0 | 0,0 |
| 10/fevereiro/10* | 79,3 | 39,0 | 2,0 |
| 18/maio/10 | 40,4 | 70,0 | 0,0 |
| 17/agosto/10 | 38,4 | 45,0 | 15,0 |
| 18/novembro/10 | 49,5 | 24,0 | 24,0 |
| Médias/± DP | 52,3 ± 41,0 | 48,9 ± 29,3 | 12,2 ± 11,7 |

Legenda: * = Amostra com IMS, DP = Desvio Padrão.

6.4- Discussão: experimentos controles da matriz de água bruta superficial dos pontos de coleta CAP1 e CAP2.

Os valores das médias de recuperação de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. para o ponto CAP1 obtidos neste estudo, com o uso do Color Seed®, estão dentro da faixa dos valores estabelecidos para aceitação propostos pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) (Tabela 5). Para o ponto CAP2, a média dos resultados para a recuperação de cisto também se encontra dentro da faixa limite porém, a média de recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. foi de 12,2% ± 11,7, sendo este valor muito próximo ao proposto para o protozoário *Cryptosporidium* spp. em água bruta, que é de 13,0 % (USEPA, 2005).

Tabela 5: Critérios de aceitação para os experimentos controle positivos - USEPA.

| Matrizes semeadas | Cistos de <i>Giardia</i> spp. (%) | Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. (%) |
|-------------------|-----------------------------------|---|
| Recuperação média | 15,0 – 118,0 | 13,0 – 111,0 |

Fonte: USEPA, 2005. MS = Matrizes semeadas.

A recuperação de cistos e oocistos depende tanto da separação física quanto da interação química entre organismos e partículas em suspensão, tais como a argila, relatados por trabalhos onde se comprovou que existe uma correlação linear negativa entre a recuperação de cistos e oocistos e a concentração de argila em amostras de água bruta superficial (KUCZYNSKA & SHELTON, 1999).

De acordo com a CETESB (2008), a água bruta superficial do rio Capivari tem elevada concentração de argila. Esta característica, em conjunto com a carga superficial negativa dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. e a hidrofobicidade dos cistos de *Giardia* spp. atua nas ligações entre as estruturas, bem como, na bioquímica da parede externa dos cistos e oocistos (distribuição e função dos lipídeos, proteínas e carboidratos), além de mudanças de pH, o que pode afetar diretamente a recuperação dos cistos e oocistos (PEREIRA, 2008).

Nos ensaios controles de alguns meses como no mês de novembro de 2009, foi empregada a separação imunomagnética (IMS). De acordo com Cantusio (2008), os valores de turbidez acima de 50 NTU influenciam diretamente na metodologia empregada. Além disso, o processamento das amostras por IMS não ocasionou aumento da recuperação, ao contrário, não houve recuperação quando empregado nas amostras de água bruta superficial, pois as partículas de argila provavelmente impregnadas com hidróxidos de ferro

aderiram aos oocistos interferindo diretamente na ligação das esferas magnetizadas com anticorpos de captura (RYBICKA et al., 1995; INOUE et al., 2006).

Os resultados obtidos nos ensaios controles mostram a variabilidade da eficiência de recuperação da técnica, com valores de 10,0 % a 42,0 % para cistos de *Giardia* spp. e de 0,0 % a 40,0 % para oocistos de *Cryptosporidium* spp. no ponto CAP1 e valores de 19,0 % a 96,0 % para cistos de *Giardia* spp. e de 0,0 % a 32,0 % para oocistos de *Cryptosporidium* spp. no ponto CAP2. A baixa reprodutibilidade ainda é um dos pontos críticos comum a todas as metodologias existentes para detecção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em amostras hídricas e refletem o efeito da matriz no comportamento dos métodos (FRANCY et al, 2004).

Francy et al. (2004) observaram que a recuperação média de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. empregando o método 1623 variou de 2,9 a 56,0 % , relatando que houve correlação inversa entre o aumento da turbidez das amostras (acima de 100 NTU) e a eficiência do método, sendo que o método se comportou de maneira diferente em amostras coletadas no mesmo local com valores diferentes de turbidez. Da mesma maneira as porcentagens de recuperação deste trabalho foram afetadas diretamente pela turbidez, podendo se observar que nos meses onde os valores de turbidez foram maiores as porcentagens de recuperação foram as mais baixas (Tabelas 3 e 4).

Segundo Davies et al. (2003) a eficiência de recuperação pode ser afetada se ocorrer um desvio de apenas 0,12 unidades do pH 7,0 considerado como ótimo, as taxas de recuperação que podem variar de 3,0 a 24,0 %, razão pela qual as recuperações tiveram variações de 0,0 a 40,0% para oocistos (Tabela 3) e de 18,0 a 96,0 % para cistos (Tabela 4),

os variações dos valores de pH podem ser observadas nas tabelas 8 e 9 nos meses referentes aos controles.

6.5- Resultado do experimento controle negativo da água bruta superficial

Não foram detectados cistos de *Giardia* spp. ou oocistos de *Cryptosporidium* spp. nos controles negativos, atestando que não houve contaminação durante todo o processamento das amostras.

6.6- Ocorrência de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. na água bruta superficial do ponto de coleta CAP1.

Ao todo, foram analisadas 18 amostras quanto aos parâmetros físico-químicos e microbiológico e somente 15 amostras foram analisadas quanto ao parâmetro parasitológico devido à alta turbidez. Destas, quatorze amostras foram positivas para cistos de *Giardia* spp. e somente uma amostra positiva no mês de setembro 2010 para oocistos de *Cryptosporidium* spp. (Tabela 6). A positividade de cistos neste ponto foi de 94,1 % e de 6,7 % para oocistos (Prancha 1, Figuras A1 e A3). O mês no qual se observou maior concentração de cistos foi em outubro de 2010; ressalte-se que somente no mês de fevereiro 2010 não foram encontrados cistos de *Giardia* spp. Nestas amostras, a concentração média de cistos foi de 19,3 /L e 0,7 oocistos/L .

Tabela 6: Parâmetros parasitológicos (cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp.) para as amostras de água bruta superficial no ponto de coleta CAP1, Rio Capivari, Campinas, SP, no período de Agosto de 2009 à Janeiro de 2011.

| Data das coletas | Cistos de <i>Giardia</i> spp./L | Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp./L |
|-------------------|---------------------------------|---|
| 11/agosto/09 | 32,0 | ND* |
| 21/setembro/09 | 4,0 | ND* |
| 20/outubro/09 | 14,0 | ND* |
| 18/novembro/09*** | 20,0 | ND* |
| 14/dezembro/09 | NA** | NA** |
| 13/janeiro/10 | 32,0 | ND* |
| 10/fevereiro/10 | ND* | ND* |
| 16/março/10 | 18,0 | ND* |
| 14/abril/10 | 7,0 | ND* |
| 18/maio/10 | 15,0 | ND* |
| 17/junho/10 | 10,0 | ND* |
| 16/julho/10 | 12,0 | ND* |
| 18/agosto/10 | 40,0 | ND* |
| 15/setembro/10 | 30,0 | 10,0 |
| 10/outubro/10 | 45,0 | ND* |
| 10/novembro/10 | 6,0 | ND* |
| 15/dezembro/10 | NA** | NA** |
| 18/janeiro/11 | NA** | NA** |
| Médias/ ± DP | 19,3 ± 13,0 | 0,7 ± 1,4 |

*ND - não detectado, **NA - não analisado. *** amostra com IMS.

6.7- Ocorrência de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. na água bruta superficial do ponto de coleta CAP2.

Ao todo, foram coletadas 18 amostras de água bruta superficial nas quais foram analisados os parâmetros físico-químicos e microbiológicos. Para as amostras do CAP2 ocorreu o mesmo problema com relação aos meses de maior precipitação sendo que somente 15 amostras foram analisadas no parâmetro parasitológico. Destas, todas foram positivas para cistos de *Giardia* spp. e em duas amostras detectou-se a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (Tabela 7).

Com relação aos cistos de *Giardia* spp., o mês no qual se detectou maior concentração foi agosto de 2009. Neste ponto, a concentração média de cistos foi de 77,2 cistos/L. Oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram encontrados nos meses de outubro 2009 e junho 2010, a concentração média foi de 1,9 oocistos/L (Prancha1, Figuras B1 e B3).

Tabela 7: Parâmetros parasitológicos (cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp.) para as amostras de água bruta superficial no ponto de coleta CAP2, Rio Capivari, Campinas, SP, no período de Agosto de 2009 à Janeiro de 2011.

| Data das coletas | Cistos de <i>Giardia</i> spp./L | Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp./L |
|--------------------|---------------------------------|---|
| 11/agosto/09 | 162,0 | ND* |
| 21/setembro/09 | 130,0 | ND* |
| 20/outubro/09*** | 25,0 | 16,0 |
| 18/novembro/09*** | 57,0 | ND* |
| 14/dezembro/09 | NA* | NA** |
| 13/janeiro/10 | 30,0 | ND* |
| 10/fevereiro/10*** | 120,0 | ND* |
| 16/março/10 | 40,0 | ND* |
| 14/abril/10 | 70,0 | ND* |
| 18/maio/10 | 80,0 | ND* |
| 17/junho/10 | 117,0 | 13,0 |
| 16/julho/10 | 32,0 | ND* |
| 18/agosto/10 | 75,0 | ND* |
| 15/setembro/10 | 144,0 | ND* |
| 16/outubro/10 | 60,0 | ND* |
| 18/novembro/10 | 16,0 | ND* |
| 15/dezembro/10 | NA* | NA** |
| 18/janeiro/11 | NA* | NA** |
| Médias/± DP | 77,2 ± 46,9 | 1,9 ± 2,1 |

Legendas: *ND - não detectado, **NA - não analisado. * amostras com IMS.**

6.8- Caracterização físico-química e microbiológica do ponto de coleta CAP1.

As amostras de água bruta superficial deste ponto apresentaram altos valores de cor e turbidez, devido à ocorrência de chuvas nos dias que antecederam as coletas nos meses de dezembro 2009, dezembro 2010 e janeiro 2011.

Neste ponto a média dos resultados do parâmetro cor foi de 1089,5 *PtCO*, fora dos padrões de classificação para mananciais de captação segundo (CONAMA 357, 2005). Em relação ao parâmetro cor, os maiores valores foram observados nos meses citados acima, exercendo influência na média dos valores obtidos, gerando um desvio padrão de 1902,1 (Tabela 8).

A média dos valores de turbidez do ponto CAP1 (372,9 NTU) foi superior à média do ponto CAP2 (310,2 NTU) (Tabela 9). Da mesma maneira, os meses mais chuvosos influenciaram nos valores de turbidez, gerando um desvio padrão de 372,1 (Tabela 8).

Na análise dos valores de pH, verificou-se que nas amostras de 12 meses este não se distanciou da neutralidade, sempre com uma pequena elevação, 7,1 a 7,7. Nos meses de março 2009, agosto 2009, maio 2010 e junho 2010, ocorreu diminuição dos valores de pH, tendendo para a acidez (6,90).

Os valores das concentrações de coliformes termotolerantes variaram de 10^3 a 10^7 NMP/100 mL e no mês de setembro de 2010, registrou-se a maior concentração de coliformes.

Tabela 8: Parâmetros físico-químicos (pH, cor, turbidez) e microbiológico (coliformes termotolerantes) para as amostras de água bruta superficial no ponto de coleta CAP1, Rio Capivari, Campinas, SP, no período de agosto 2009 a janeiro 2011.

| Data da coleta | pH | Cor (PtCO*) | Turbidez (NTU**) | Coliformes termotolerantes (NMP/100 mL) |
|-----------------|-----------------|--------------------|---------------------|--|
| 11/agosto/09 | 6,90 | 329 | 29,0 | 3,0X10 ⁴ |
| 21/setembro/09 | 7,35 | 182 | 23,8 | 3,0X10 ⁴ |
| 20/outubro/09 | 7,22 | 277 | 34,7 | 1,7X10 ³ |
| 18/novembro/09 | 7,51 | 511 | 75,9 | 5,0X10 ³ |
| 14/dezembro/09 | 7,10 | 5750 | 810,0 | 3,0X10 ⁴ |
| 13/janeiro/10 | 7,25 | 239 | 33,6 | 1,3X10 ⁵ |
| 10/fevereiro/10 | 7,35 | 341 | 46,6 | 4,0X10 ⁴ |
| 16/março/10 | 6,92 | 252 | 38,8 | 2,0X10 ⁴ |
| 14/abril/10 | 7,05 | 235 | 40,7 | 2,0X10 ³ |
| 18/maio/10 | 6,80 | 165 | 19,8 | 2,8X10 ⁵ |
| 17/junho/10 | 6,94 | 122 | 18,4 | 4,0X10 ³ |
| 16/julho/10 | 7,10 | 149 | 19,1 | 5,0X10 ⁵ |
| 18/agosto/10 | 7,58 | 166 | 15,8 | 5,0X10 ³ |
| 15/setembro/10 | 7,31 | 243 | 38,1 | 7,0x10 ⁷ |
| 10/outubro/10 | 7,13 | 545 | 49,0 | 1,1x10 ⁴ |
| 10/novembro/10 | 7,70 | 344 | 49,9 | 1,7x10 ³ |
| 15/dezembro/10 | 7,01 | 5526 | 750,0 | 2,3x10 ³ |
| 18/janeiro/11 | 7,12 | 4235 | 550 | 5,0x10 ⁵ |
| Médias ± DP | 7,1 ± DP 7,2 | 1089,5 ± 1902,1 | 372,9 ± 372,1 | 8,9x10 ⁴ ± 1,6x10 ⁵ |

Legendas: *PtCO – miligramas de Platina Cobalto **NTU – unidades de turbidez pelo método nefelométrico, NMP – número mais provável por 100 ml.

6.9- Caracterização físico-química e microbiológica do ponto de coleta CAP2.

As amostras de água bruta superficial deste ponto de coleta apresentaram variações nos valores de cor e turbidez, devido à ocorrência de chuvas nos dias que antecederam as coletas nos meses de dezembro 2009, dezembro 2010 e janeiro 2011. Os valores de turbidez que foram registrados nos meses de maior precipitação de chuvas, também exerceram influência na média gerando desvio padrão de $\pm 346,5$ NTU. A turbidez do ponto CAP2 (310,2 NTU) apresentou média inferior ao ponto CAP1 que é o ponto de captação de água bruta.

Em relação ao parâmetro cor os maiores valores foram nos meses de maior precipitação de chuvas, exercendo influência na média e gerando desvio padrão de $\pm 1872,6$ e média de 1216,6 PtCO (Tabela 9).

Na análise dos resultados de pH, verificou-se que em 7 amostras do total os valores de pH ficaram próximos à neutralidade e no mês de novembro 2010 registrou-se pH de 7,2 (Tabela 9). No restante dos meses ocorreu a queda dos valores ficando o pH entre 6,5 e pH 6,9.

Quanto ao monitoramento dos coliformes termotolerantes foram observadas, durante o período do estudo, concentrações que variaram de 10^3 NMP/100 mL a 10^7 NMP/100 mL com média de 10^6 NMP/100 mL.

Tabela 9: Parâmetros físico-químicos (pH, cor, turbidez) e microbiológico (coliformes termotolerantes) para as amostras de água bruta superficial no ponto de coleta CAP2, Rio Capivari, Campinas, SP, no período de agosto 2009 a janeiro 2011.

| Data da coleta | pH | Cor aparente (PtCO*) | Turbidez (NTU**) | Coliformes termotolerantes (NMP/100mL) |
|--------------------|------------------|------------------------|----------------------|--|
| 11/agosto/09 | 6,90 | 379 | 32,9 | 9,0X10 ⁴ |
| 21/setembro/09 | 6,98 | 360 | 35,9 | 3,3X10 ⁵ |
| 20/outubro/09 | 7,00 | 562 | 79,0 | 1,1X10 ⁶ |
| 18/novembro/09 | 7,06 | 720 | 91,1 | 1,3X10 ⁶ |
| 14/dezembro/09 | 7,04 | 6012 | 885 | 2,2X10 ⁵ |
| 13/janeiro/10 | 7,00 | 259 | 37,1 | 8,0X10 ⁵ |
| 10/fevereiro/10 | 7,07 | 684 | 79,3 | 3,0X10 ⁵ |
| 16/março/10 | 6,88 | 304 | 42,8 | 5,0X10 ⁵ |
| 14/abril/10 | 6,71 | 265 | 37,7 | 3,0X10 ⁵ |
| 18/maio/10 | 6,70 | 323 | 40,4 | 8,0X10 ⁵ |
| 17/junho/10 | 6,51 | 383 | 40,5 | 4,0X10 ³ |
| 16/julho/10 | 6,80 | 345 | 33,0 | 8,0X10 ⁵ |
| 18/agosto/10 | 6,84 | 362 | 38,4 | 1,7X10 ⁶ |
| 15/setembro/10 | 6,62 | 515 | 41,9 | 2,2X10 ⁷ |
| 16/outubro/10 | 7,06 | 655 | 49,0 | 7,0X10 ⁵ |
| 18/novembro/10 | 7,20 | 401 | 49,5 | 2,0X10 ⁵ |
| 15/dezembro/10 | 6,89 | 5920 | 630,0 | 3,0X10 ⁴ |
| 18/janeiro/11 | 6,91 | 3450 | 450,0 | 2,2X10 ⁵ |
| Médias ± DP | 7,1 ± 0,1 | 1216,6 ± 1872,6 | 310,2 ± 346,5 | 1,7x10⁶ ± 5,1x10⁶ |

Legendas: *PtCO – miligramas de Platina Cobalto, **NTU – Unidades de turbidez pelo método nefelométrico, NMP – número mais provável por 100 ml.

6.10- Discussão: matriz de água bruta superficial dos pontos de coleta CAP1 e CAP2 do rio Capivari.

Não foi possível analisar amostras de água bruta superficial do rio Capivari em alguns meses devido a alguns adventos climáticos (tempestades). De acordo com a Defesa Civil, o ano de 2009 encerrou-se com altos índices pluviométricos na cidade de Campinas, onde o volume de chuvas registrado no município durante o ano foi o maior nos últimos 21 anos. O mês de dezembro deste mesmo ano terminou como sendo o mais chuvoso desde 1988 com um total de chuva acumulada no ano que foi superior a 2.000 mm, sendo que a média anual é normalmente de 1.420 mm (DEFESA CIVIL, 2011).

Isto ocorreu também nos anos de 2010 e 2011 nos mesmos meses. Esta precipitação aumenta a quantidade de material em suspensão nas águas superficiais dos mananciais, e provoca o revolvimento do leito dos rios, aumentando a concentração de patógenos e metais potencialmente tóxicos, bem como a cor e a turbidez (DEFESA CIVIL, 2011).

O método 1623 validado pela USEPA, apesar de ter sido desenvolvido visando contemplar tanto amostras de águas brutas quanto tratadas (CLANCY et al., 2003), nele não é levado em conta a influência da turbidez da água dos mananciais. No entanto, procedimentos alternativos para a concentração inicial dos organismos são permitidos desde que sejam atestados os níveis similares de recuperação de organismos (CLANCY et al., 2003). Smith e Nichols (2010) obtiveram variações da recuperação em matrizes de água deionizada e água bruta, onde a maior recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. foi de 8,3 % em amostras com até 50 NTU.

Outra técnica por filtração em membranas, propostas por Aldom e Chagla (1995), foi desenvolvida para detecção de oocistos e cistos em água tratada, posteriormente este método também passou a ser utilizado para determinação destas formas em água bruta; a

técnica consiste na captura dos cistos e oocistos nas membranas, seguida de eluição por raspagem e lavagem da sua superfície alternadamente, sendo que a turbidez da água é um fator limitante, pela rápida obstrução da malha filtrante. Similar a técnica usada neste estudo.

De acordo com Medeiros, (2010), a recuperação de cistos e oocistos depende do método empregado e das características da amostra analisada e, a recuperação de cistos e oocistos e o desempenho do método são afetados negativamente pelo aumento da turbidez.

Desta maneira as amostras coletadas nos meses de dezembro 2009, dezembro 2010 e janeiro 2011, nas quais os valores de turbidez ultrapassaram 100 NTU, tanto do ponto de coleta CAP1 como do ponto de coleta CAP2, não puderam ser processadas pela metodologia empregada neste estudo, pois o monitoramento da turbidez feito diariamente pela ETA Capivari demonstrou que os valores de turbidez permaneceram acima dos 100 NTU durante todo o mês.

Feng et al. (2003) verificaram o efeito da turbidez e das partículas em suspensão na recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. a partir de matrizes de água bruta. Em amostras que apresentavam turbidez de 1,8 NTU a recuperação de oocistos foi de 63,3 %. Quando a turbidez subiu para 5,0 NTU, o valor de recuperação foi de 85,0 %. Porém houve um decréscimo na recuperação para 24,9 % quando a turbidez foi de 40 NTU. Tais resultados comprovam que a turbidez pode influenciar na detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. o que também foi evidenciado neste estudo.

Em diferentes condições ambientais, as forças de interação entre os cistos e oocistos e a adesão dos mesmos às partículas se alteram entre eletrostáticas e hidrofóbicas, além do potencial zeta que representa o potencial eletrocinético em sistemas coloidais, onde os

oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. tem sua dispersão no meio líquido alterada como, demonstrados em estudos realizados por Hsu et al. (2002).

Os autores inferiram que a medição do potencial zeta é sensível à alteração da resistência iônica e, assim, diferem diante de distintos valores de condutividade e de pH. Demonstraram que oocistos e cistos apresentaram cargas superficiais dependentes do pH, com os potenciais zeta menos negativos à medida que o pH era reduzido (ácido). Assim, o potencial zeta de zero foi alcançado em pH 3,3 e pH 2,2 para oocistos e cistos respectivamente, sendo que a recuperação deste estudo também pode ter sido afetada pelas variações de pH (HSU et al., 2002; PEREIRA, 2008).

A correlação linear de Pearson demonstrou correlação moderada negativa ($r = -0,52245$) (Tabela 18) entre cistos de *Giardia* spp. e o pH. De acordo com o trabalho de Cook et al, (2007) o pH influencia na recuperação dos cistos e oocistos, pois interfere com características da superfície da célula e altera a estabilidade das ligações antígeno-anticorpo. Em pH ligeiramente baixo, há melhores recuperações sendo que há o aumento ao redor de pH 5,5 favorece a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em amostras ambientais. O potencial Zeta dos oocistos também é influenciado pelo pH e, esta força de adesão fica mais negativamente carregada quanto maior for o pH.

Desta maneira, de acordo com Kuhn et al. (2002) que testaram o efeito do pH em solução salina durante a captura de oocistos de *Cryptosporidium* spp. a recuperação mais alta foi de 26,3 % quando o pH foi ajustado para 7,0, considerado como ótimo em relação aos valores de pH que variaram em relação ao neutro.

Outras propriedades dos oocistos que podem afetar a recuperação são as bioquímicas e físicas, que podem mudar dependendo das condições ambientais e do tempo de persistência no ambiente, ocasionando perda de oocistos durante o processamento

laboratorial das amostras (INOUE et al., 2006). Por outro lado, oocistos recém-eliminados nas fezes e imediatamente expostos ao corante vital DAPI não se impregnam com o corante (INOUE et al., 2006), o que provoca críticas ao uso do DAPI como teste confirmatório da morfologia, como descrito no Método 1623, afetando também diretamente na observação.

Nos meses onde se utilizou a IMS não foi possível detectar oocistos de *Cryptosporidium* spp., mesmo com a sua utilização (Tabelas 6 e 7). Isto pode ser explicado devido ao fato que, com a utilização da separação imunomagnética, características da amostra tais como, as presenças de alguns sais de ferro possivelmente interferiram na etapa de formação dos complexos microesferas anticorpos e epítomos dos oocistos durante o procedimento IMS (SANTOS et al., 2011).

Os dois pontos de coleta apresentaram positividade muito alta para cistos de *Giardia* spp. (94,1 % - CAP1 e 100,0 % - CAP2), o que atesta a influência de lançamentos de efluentes domésticos e industriais ocasionando a alteração da qualidade da água. Achados similares foram observados em amostras de esgoto bruto no Canadá, Itália e no Brasil com positividade de 73,0 a 100,0 % dos cistos de *Giardia* spp. (WALLIS et al., 1996; HEITMAN et al., 2002; CACCIO et al., 2003; SANTOS et al., 2011).

De acordo com os resultados obtidos, foi verificado que a concentração de cistos de *Giardia* spp. foi maior no ponto CAP2 durante todo o estudo. Neste local ocorrem lançamentos de efluentes domésticos e industriais (Figura 7 e 8), com altas concentrações de coliformes termotolerantes neste ponto de coleta ($7,0 \times 10^7$) (Tabela 9) apesar de não ter sido observado correlação positiva entre cistos e coliformes. A calha do rio apresenta varias curvas e quedas de velocidade de correnteza em alguns pontos o que pode favorecer a sedimentação dos cistos durante seu percurso até o ponto CAP1 onde ocorre a captação de água.

Cistos de *Giardia* spp. possuem taxa de sedimentação de 0,84 mm/s além de hidrofobicidade que proporciona afinidade com outras partículas de matéria orgânica e minerais, este fenômeno aumenta sua taxa de sedimentação, e conseqüentemente sua concentração no leito do rio (MEDEMA et al, 1998; DAI & BOLL, 2006).

Além disso, no ponto de coleta CAP1 (local de captação de água bruta superficial) há uma barragem artificial (Figura 9 e 10), modificação esta que proporciona captação de água bruta superficial mesmo em meses de estiagem. A barragem pode favorecer a sedimentação dos cistos de *Giardia* spp. pois em ambientes onde não existe correnteza os cistos sedimentam e sua concentração aumenta na interface sedimento-água (MEDEMA et al, 1998).

Mesmo sendo o rio Capivari um manancial de captação de água para consumo humano, vale ressaltar que valores das concentrações médias de coliformes termotolerantes em suas águas variaram, tendo em destaque o mês de setembro 2010 aonde a concentração no ponto CAP2 chegou a $7,0 \times 10^7$ NMP/100 mL, concentração muito acima do enquadramento para águas de captação e consumo humano de acordo com a Resolução CONAMA N°357, de 17 de março de 2005.

Wu et al. (2009) detectaram valores de $7,1 \times 10^2$ a $6,4 \times 10^3$ NMP/100 mL, em três pontos de coleta de águas superficiais e variações de $2,0$ a $3,3 \times 10^2$ NMP/ 100 mL no sedimento. Esses autores relataram que a concentração de *E. coli* aumentou durante tempestades e retornou para valores menores durante o período de estiagem. A correlação entre a concentração de *E. coli* entre a superfície e o sedimento foram : $r = 0,298$; $p = <0,01$, todavia, a sua concentração tende a aumentar durante a estiagem sendo assim, os sedimentos são considerados como fonte destas bactérias.

A comparação múltipla de médias (Teste de Duncan), entre o ponto CAP1 e a interface sedimento-água registrou diferença significativa para cistos de *Giardia* spp. (médias de 19,0 e 52,1 cistos/L respectivamente) e não houve diferença para oocistos de *Cryptosporidium* spp. detectados em ambas as amostras (Tabela 16). Tais achados podem ser devidos ao processo de sedimentação que ocorre em ambientes de barragens. Brookes et al. (2005), demonstraram que oocistos de *Cryptosporidium* spp. exibem maior afinidade com a matéria orgânica (efluentes de esgoto) que por partículas inorgânicas.

Ainda que cistos de *Giardia* spp. sejam mais detectados que oocistos de *Cryptosporidium* spp., Oliveira (2005) relatou de 1 a 2 amostras positivas por ano de oocistos de *Cryptosporidium* spp., no verão e início de outono, durante o monitoramento destes protozoários no rio Atibaia na cidade de Campinas. Os dados obtidos neste trabalho são similares, sendo 1 amostra positiva para *Cryptosporidium* spp. no CAP1 e 2 amostras positivas no CAP2 (uma delas no outono e a outra no inverno, que são períodos de estiagem) (Tabelas 6 e 7).

Com relação ao parâmetro cor, a correlação linear de Pearson foi moderada com cistos de *Giardia* spp. ($r = 0,41327$), provavelmente devido a maior quantidade de partículas em suspensão as quais os cistos exibem maior tendência de se agregar (Tabela 18). Com relação aos oocistos de *Cryptosporidium* spp. isto não pode ser correlacionado pois não houve correlação estatística.

A correlação de Pearson entre o parâmetro oocisto de *Cryptosporidium* spp., e o parâmetro microbiológico e os físico-químicos demonstraram que houve correlação negativa com o pH ($r = - 0,15706$), correlação moderada com a Turbidez ($r = 0,24729$) e moderada forte com os coliformes termotolerantes ($r = 0,37817$) (Tabela 19).

Quanto à correlação entre a presença oocistos de *Cryptosporidium* spp. e a concentração de coliformes termotolerantes, Le Chevalier & Norton (1992) verificaram que havia correlação moderada entre oocistos de *Cryptosporidium* spp. e coliformes termotolerantes. Entretanto, Lipp et al. (2001) não constataram correlação entre *Cryptosporidium* spp. e coliformes totais em amostras de águas superficiais, embora *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., *E. coli* e os outros coliformes tenham a mesma origem (fezes de animais homeotérmicos) e de serem diluídos igualmente no corpo hídrico.

A ausência de correlação entre estes parâmetros possivelmente se deve as taxas de sedimentação que são diferentes para cada espécie e, do tempo de sobrevivência no meio ambiente, sendo maior para as formas císticas vegetativas dos protozoários *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. que são conhecidos por sua capacidade de sobrevivência por vários meses em comparação com os indicadores fecais que morrem mais rapidamente (HORMAN et al., 2004).

6.11- Resultado dos experimentos controles para as amostras da interface sedimento-água

As médias foram 19,8 % de recuperação para cistos de *Giardia* spp. e 4,0 % para oocistos de *Cryptosporidium* spp. em 5 experimentos (Tabela 10). Nos 3 experimentos restantes, onde foi acrescentado mais uma etapa onde acrescentou-se o aparelho de ultrassom, as médias de recuperação encontradas foram de 16,9 % para cistos de *Giardia* spp. e 10,0 % para oocistos *Cryptosporidium* spp. (Tabela 10) (Prancha 1, Figura C1).

Tabela10: Porcentagens de recuperação de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. nos experimentos controles, nas amostras da interface sedimento-água, utilizando-se metodologia com desagregação química (agosto 09 a agosto 10) e acrescida de desagregação físico-química (setembro 10 a janeiro 11).

| Amostras | Sedimento no poço (µL) | Sedimento total (µL) | Nº de org. recuperados em 10 µL (cistos) | Nº de org. recuperados em 10 µL (oocistos) | *Fc | E.R. cistos (%) | E.R. oocistos (%) |
|--|------------------------|----------------------|--|--|------|-----------------|-------------------|
| Etapa I - metodologia: centrifugo concentração com desagregação química | | | | | | | |
| 11/agosto/09 | 10,0 | 210,0 | 3,0 | 2,0 | 0,48 | 30,2 | 20,1 |
| 18/novembro/09 | 10,0 | 1800,0 | 0,0 | 0,0 | 0,05 | 0,0 | 0,0 |
| 10/fevereiro/10 | 10,0 | 100,0 | 2,0 | 0,0 | 1 | 20,0 | 0,0 |
| 18/maio/10 | 10,0 | 300,0 | 1,0 | 0,0 | 0,33 | 9,0 | 0,0 |
| 17/agosto/10 | 10,0 | 200,0 | 4,0 | 0,0 | 0,5 | 40,0 | 0,0 |
| Médias ± DP | 10,0 | 522,0 ± 750,0 | 2,0 ± 1,8 | 0,4 ± 0,7 | | 19,8 ± 22,0 | 4,0 ± 15,0 |
| Etapa II - metodologia: centrifugo concentração acrescida de desagregação física (por ultrassom) | | | | | | | |
| 15/setembro/10 | 10,0 | 1300,0 | 3,0 | 2,0 | 0,07 | 29,9 | 19,9 |
| 16/novembro/10 | 10,0 | 2200,0 | 1,0 | 1,0 | 0,05 | 11,0 | 11,0 |
| 18/janeiro/11 | 10,0 | 3500,0 | 1,0 | 0,0 | 0,03 | 10,0 | 0,0 |
| Médias ± DP | 10,0 | 2333,0 ± 1700,0 | 1,6 ± 1,4 | 1,0 ± 1,4 | | 16,9 ± 17,0 | 10,0 ± 12,0 |

Legendas: *Fc = Fator de correção, E.R.= Eficiência de recuperação

6.12- Discussão: experimentos controles da matriz interface sedimento-água do rio Capivari.

Os valores de recuperação obtidos neste estudo, com o uso do Color Seed®, foram comparados com os dados da literatura, em relação aos resultados de ensaios encontrados em amostras de lodos condicionados. Neste estudo, a aplicação de dispersantes químicos e físicos (que permitem a dissociação dos cistos e oocistos das outras partículas) foi a etapa crítica do protocolo (KEPNER & PRATT, 1994).

De acordo com Molloy et al. (2006), existe uma vantagem em se utilizar colorações como a RID para se estudar a presença de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. no sedimento, que são ricos em ácidos húmicos e fúlvicos e estes afetam a performance de métodos moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizada para análises de DNA, levando a resultados falso-negativos pois são interferentes que atuam no processo da reação em cadeia para duplicação das fitas de DNA.

De uma forma geral, as médias de recuperação encontradas de cistos de *Giardia* spp. foram boas, porém, para oocistos de *Cryptosporidium* spp foram baixas (Tabela 10). A variabilidade na recuperação de oocistos em sedimentos foi documentada por Kuczynska e Shelton (1999), que avaliaram amostras de solo usando flutuação em carbonato de cálcio e aplicando também, dispersantes químicos, tendo encontrado médias de recuperação de 6,0% de oocistos. Molloy et al. (2006), relataram médias de recuperação de 20,0 a 60,0 % para oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de sedimentos. Eles consideraram que a sensibilidade do método depende da quantidade de sedimento processado, bem como da quantidade de volume examinado na lâmina, pois, quanto mais amostra no poço da lâmina mais difícil fica a visualização.

Tal fato pode ser explicado, pela interação dos cistos e oocistos não completamente dissociada do material particulado, podendo ser arrastados durante a centrifugação para o fundo do tubo, fora da área de concentração superficial do pellet que será analisado (MEDEMA et al., 1998; CONSIDINE et al., 2002; BONATTI et al., 2007). Vale ressaltar que a utilização de pirofosfato tetrassódio $1,0 \times 10^4 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) foi adaptado neste estudo, para estas amostras de acordo com o trabalho de Anguish & Ghiorse (1997), no qual relataram aumento da recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras de solo quando adicionado pirofosfato tetrassódio como agente dispersante. Os autores obtiveram aumento de 25,5 % para 43,1 % ($p = 0,05$) após modificação da solução de eluição, constituída de pirofosfato de sódio a 0,02 %, além de Tween 80 0,01 % e EDTA 0,03 %.

Davies et al. (2003), também observaram significativa diferença nos níveis de recuperação quando diferentes agentes dispersantes foram empregados. Considerando a dosagem do inóculo de oocistos de *Cryptosporidium* spp. de 10^2 a $10^4/\text{mL}$, e incluía duas etapas, sendo a primeira por dispersão química com pirofosfato tetrassódio e a segunda com dispersão física por agitação em aparelho vortex similar ao empregado neste trabalho.

Assim, neste estudo a opção de uma segunda etapa com o objetivo de uma melhoria no método, com a aplicação do ultrassom, foi elaborada devido à queda da porcentagem de recuperação (KUCZYNSKA & SHELTON, 1999), porém, não foi observada uma melhora significativa nas taxas de recuperação de cistos de *Giardia* spp. (Tabela 10), mas houve melhora na recuperação de oocistos *Cryptosporidium* spp. devido à maior desagregação entre os oocistos e as sujidades presentes na amostra, quebrando a adesão entre as partículas de argila e a sua superfície. Observou-se que o uso desta solução de eluição,

promoveu também menor adesão de partículas de argila aos oocistos comparativamente ao uso de PBS associado ao Tween (INOUE et al., 2003).

A comparação com diferentes matrizes permite visualizar a dificuldade de recuperação das diferentes metodologias utilizadas. No caso de amostras hídricas, o inoculo (Color Seed[®]) apresenta também a característica de produzir uma pequena queda na eficiência de recuperação para cistos e oocistos, provavelmente pelo aumento da hidrofobicidade dos organismos, causada pela adesão aos marcadores de hidrocarbonetos, resultando no aumento da aderência nas superfícies, o que pode ter ocorrido nas amostras analisadas neste estudo (CANTUSIO et al., 2010).

No que tange a recuperação de cistos e oocistos em amostras de sedimento, um dos principais problemas, observado neste estudo, foi o mascaramento das estruturas coradas com anticorpos monoclonais pelo material particulado presente nas lâminas, impossibilitando sua detecção durante a leitura das preparações no microscópio, além da diminuição de 3,0 % que pode ocorrer na recuperação de oocistos com o uso do Kit Color Seed[®], quando comparado com o uso de oocistos não marcados por sulforodamina (Texas Red) em amostras de água, registrados por Davies et al. (2003).

6.13- Ocorrência de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. na interface sedimento-água do rio Capivari.

Foram examinadas 18 amostras da interface sedimento-água; 17 positivas para cistos de *Giardia* spp. (94,4 %), sendo que a maior concentração de cistos ocorreu no mês de outubro de 2010 (160 cistos/mL); e, 2 amostras positivas para oocistos de *Cryptosporidium* spp. (11,1 %) com maior concentração no mês de setembro de 2010 (130 oocistos/mL de sedimento) (Tabela 11) (Prancha 1, Figuras C2 e C3).

Tabela 11: Concentrações de cistos de *Giardia* spp. e de oocistos de *Cryptosporidium* spp./mL, encontrados nas amostras da interface sedimento - água do ponto de coleta CAP1, Rio Capivari, Campinas, SP, no período de Agosto 2009 a Janeiro 2011.

| Data das coletas | Cistos de <i>Giardia</i> spp./mL | Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp./mL |
|--|----------------------------------|--|
| Etapa I - metodologia: centrifugo concentração com desagregação química | | |
| 11/agosto/09 | 12,6 | ND* |
| 21/setembro/09 | 70,0 | ND* |
| 20/outubro/09 | 10,0 | ND* |
| 18/novembro/09 | 72,0 | ND* |
| 14/dezembro/09 | 32,0 | ND* |
| 13/janeiro/10 | 10,0 | ND* |
| 10/fevereiro/10 | 2,0 | 10,0 |
| 16/março/10 | 0,0 | ND* |
| 14/abril/10 | 1,40 | ND* |
| 18/maio/10 | 12,0 | ND* |
| 17/junho/10 | 24,0 | 13,0 |
| 16/julho/10 | 128,0 | ND* |
| 18/agosto/10 | 8,0 | ND* |
| Medias ± DP | 29,4 ± 38,1 | 1,7 ± 4,4 |
| Etapa II - metodologia: centrifugo concentração acrescida de desagregação física (por ultrassom) | | |
| 15/Setembro/10 | 182,0 | 130,0 |
| 16/Outubro/10 | 160,0 | ND* |
| 18/Novembro/10 | 88,0 | ND* |
| 15/Dezembro/10 | 60,0 | ND* |
| 18/Janeiro/11 | 48,0 | ND* |
| Médias ± DP | 107,6 ± 60,2 | 26,0 ± 58,1 |

Legendas: *ND - não detectado.

6.14- Discussão: ocorrência de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. na interface sedimento-água do rio Capivari.

No Brasil, a presença dos protozoários *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. já foi assinalada em águas superficiais, subterrâneas, tratadas, de fontes naturais, em águas minerais, esgotos brutos e tratados, além de esgoto hospitalar (PEREIRA, 2008; LEAL, 2008; CANTUSIO et al., 2010; SANTOS et al., 2011).

Entretanto não há estudos objetivando a pesquisa de cistos e oocistos em interface sedimento-água. Considerando que esta área do rio constitui uma importante fonte de patógenos e que os sedimentos podem afetar os fenômenos de transporte e sobrevivência destes protozoários patogênicos na coluna d'água, bem como influenciar a ocorrência destes na água superficial, esse estudo é inovador.

Para tanto, tornou-se necessário delinear uma metodologia de detecção para protozoários que fosse adequada a este tipo de amostra, que representa uma matriz complexa, com partículas floculadas contendo componentes inorgânicos e orgânicos como argila, bactérias, fungos, vírus e protozoários. Levando-se em conta que as amostras da interface sedimento-água possuem teores umidade de 77,0 % aproximadamente.

Vários fatores devem ser levados em consideração para se realizar a coleta adequada que permita a obtenção de resultados significativos e que expressem a condição dos sedimentos do rio em questão; neste sentido, destaca-se o tipo de equipamento utilizado neste estudo (Draga de Ekman modelo B-5023); tal equipamento escolhido é leve e indicado para coletar amostras de sedimento com estas características, ou seja, fundo menos compacto e mais macio, em até 5 cm de profundidade (MEDEIROS et al., 2008).

A presença de cistos foi constante em todo o período do estudo, estando de acordo com o trabalho de Bonatti et al. (2007), que descreve a interface sedimento-água como um dos segmentos ambientais mais estáveis em termos físicos e químicos e de concentração de algumas espécies de bactérias como a *E. coli* e de protozoários como *Giardia* spp. Quanto à presença de oocistos, as médias foram de 1,7 e 26,0 oocistos/mL (Tabela 11). Com o objetivo de uma melhoria para a detecção de cistos e oocistos, a etapa com ultrassom foi utilizada, de acordo com o Kuczynska e Shelton (1999), confirmando neste estudo que para cistos e oocistos, houve uma melhora, de acordo com os dados da análise de variância (ANOVA), com vantagem para a recuperação de ambos os protozoários ($p = 0,0715$ para cistos e $p = 0,0140$ para oocistos) (Tabela 14).

A necessidade de se promover a adequada separação entre os organismos alvo das outras partículas já havia sido reconhecida quando estudos objetivando a recuperação e enumeração de bactérias em amostras de sedimento, o pirofosfato tetrassódio foi utilizado como agente dispersante e sequestrante de íons cálcio e magnésio, com sucesso. A adição de pirofosfato tetrassódio tem sido amplamente utilizada pelos bacteriologistas para promover a dispersão de bactérias em amostras de solo e sedimento, bem como para aumentar a recuperação de oocistos em fezes e solo (Mc DANIEL & CAPONE, 1985).

Cabe ressaltar que o pirofosfato tetrassódio, atua na desagregação dos cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. entre outras partículas (metais, areia e argila), através da sua ação como um agente tamponador e emulsificante, o íon pirofosfato tem sua ação melhorada quando empregado em conjunto com o ultrassom, pois as ondas sonoras emitidas pelo equipamento são capazes de romper as interações entre os cistos, oocistos e as partículas em suspensão (VEJI & ALBRIGHT, 1985).

De acordo com o trabalho de Davies et al. (2003), foi utilizado pirofosfato tetrassódio 2 mM associado ao aparelho vortex, seguido de separação imunomagnética para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. O objetivo foi de variar combinações e tratamentos físicos e químicos para otimizar a recuperação destes. Os níveis de recuperação encontrados subiram de 31,0 % para 46,0 %.

O procedimento IMS não foi utilizado para as amostras da interface sedimento-água, devido aos metais presentes neste tipo de amostra, pois interferem na ligação entre anticorpos de captura e os protozoários. A interação entre as partículas de ferro e a superfície dos cistos e oocistos presentes na matriz da interface sedimento-água compromete impede que ocorra a captura dos cistos e oocistos pelas microesferas utilizadas para recuperação dos organismos (SMITH e NICHOLS, 2010; SANTOS et al., 2011).

De acordo com Crockett (2004), o número de cistos e oocistos aumenta no período de chuvas com o forte revolvimento da água e diminuem na época da estiagem, concentrando-se no sedimento. Porém neste estudo, isso não foi observado devido às concentrações de cistos se manterem durante todo o período do estudo, e foram poucas as amostras nas quais os oocistos foram detectados.

Os dados obtidos pela comparação múltipla de médias (Teste de Duncan) dos parâmetros parasitológicos entre o ponto CAP1 e a interface sedimento-água, evidenciaram que há diferença significativa para cistos de *Giardia* spp., com média de 52,1 cistos/mL na interface e 19,0 cistos/mL na água superficial ($p = 0,0320$); o que não ocorreu com relação aos oocistos de *Cryptosporidium* spp. ($p = 0,3102$) (Tabela 16). Estes dados estão de acordo com Jiang, (2005), Haller et al., (2009) e Crockett, (2004) que encontraram concentrações próximas a estas, destes organismos no sedimento.

De acordo com o trabalho de Courtois et al., (2008) que trabalhou com recuperação de *Legionella pneumophila* em amostras de esgoto, conclui-se que após a dispersão do material sedimentado com utilização de ultrassom, associado aos tratamentos ácido (HCl) e térmico (banho termostático), a recuperação e reprodutibilidade de quantificação da *L. pneumophila* foi aumentada de $35,0 \pm 2,4$ % para $48,0 \pm 4,0$ %, após otimização da metodologia.

Quanto à correlação linear de Pearson entre a detecção de cistos de *Giardia* spp. e quantidade de sedimento formado no sedimento do tubo de centrifuga, a recuperação foi afetada quando associado ao ultrassom. Houve correlação moderada positiva na etapa sem a utilização do ultrassom, ou seja, a quantidade de sedimento não interfere nesta etapa. Porém houve correlação forte negativa com o volume do sedimento formado ($r = - 0,911$), mostrando que quanto maior o volume do sedimento, menor a recuperação de cistos, o que pode ser explicado pela hidrofobicidade dos cistos de *Giardia* spp. proporcionando a adesão destes a partículas em suspensão (Tabela 20).

Por meio de uma séries de experimentos laboratoriais Kristin et al. (2006), demonstraram que oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. são carreados da superfície para o sedimento devido a interação com outras partículas em suspensão quando o fluxo da água superficial é baixo, caso contrário estes protozoários permanecem em suspensão na coluna d`água. Sendo esta outra essa razão pela qual não se justificaria a análise de protozoários na interface sedimento-água no ponto CAP2.

Porém, no ponto CAP1 pode ocorrer concentração de patógenos, que podem permanecer infectantes nos sedimentos por vários meses, e a ressuspensão do sedimento, quer seja por chuvas ou turbulência da água lançariam estes protozoários na coluna d`água

contribuindo para elevar o risco à saúde humana (HALLER et al., 2009). Desse modo, ao se delinear um programa de monitoramento de protozoários patogênicos em mananciais, torna-se relevante a investigação de sua ocorrência no sedimento.

7- Análises estatísticas

7.1- Análise de variância (ANOVA)

De um total de 48 amostras, 41 foram positivas para cistos de *Giardia* spp. e 6 positivas para oocistos de *Cryptosporidium* spp., como a positividade foi pequena para oocistos, os valores foram demonstrados como logaritmos evidenciando as diferenças entre os pontos de coleta (CAP1 X CAP2 e CAP1 X interface sedimento-água).

Quanto ao parâmetro cistos de *Giardia* spp., houve diferença significativa entre os pontos CAP1 e CAP2 (Tabela 12). Também houve diferença significativa entre o ponto de coleta CAP1 e a interface sedimento-água com $p = 0,0320$ e $f = 5,0$ (Tabela 13).

Para oocistos de *Cryptosporidium* spp., não houve diferença significativa entre os pontos CAP1 e CAP2 (Tabela 12), assim como também não houve diferença significativa entre o ponto de coleta (CAP1) e interface sedimento-água (Tabela 13).

Com relação aos parâmetros físico-químicos (pH, cor e turbidez), houve diferença significativa entre os pontos (CAP1 e CAP2) com $p = 0,0008$; $f = 14,2$ para o parâmetro pH, $p = 0,039$; $f = 9,9$ para cor, bem como $p = 0,0497$; $f = 4,2$ para turbidez (Tabela 12).

Considerando a metodologia de detecção empregada (com desagregação química na primeira etapa e acrescida de desagregação física na segunda etapa), houve diferença significativa entre os resultados das amostras com aplicação de ultrassom e as amostras sem aplicação de ultrassom para oocistos de *Cryptosporidium* spp. ($p = 0,0140$; $f = 2080,33$) e não houve diferença significativa para cistos de *Giardia* spp (Tabela 14).

Tabela 12: Valores de ANOVA (teste *f*) e probabilidade (*p*) entre os pontos de coleta CAP1 e CAP2, para os parâmetros físico-químicos, microbiológico (coliformes termotolerantes) e parasitológico (cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp.).

| Variável dependente | Fatores dependentes | Teste <i>F</i> | <i>p</i> < 0,05 |
|----------------------------|---------------------|----------------|-----------------|
| Cistos | CAP1 X CAP2 | 11,6 | 0,0020 |
| Oocistos | CAP1 X CAP2 | 0,7 | 0,4005 |
| pH | CAP1 X CAP2 | 14,2 | 0,0008 |
| Cor | CAP1 X CAP2 | 9,9 | 0,0039 |
| Turbidez | CAP1 X CAP2 | 4,2 | 0,0497 |
| Coliformes termotolerantes | CAP1 X CAP2 | 0,3 | 0,5875 |

Legendas: Valores em negrito = Probabilidade, *p* < 0,05

Tabela 13: Valores de ANOVA (teste f) e probabilidade (p) entre o ponto de coleta CAP1 e a interface sedimento-água, para os dados parasitológicos (cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp.).

| Variável dependente | Fatores dependentes | Teste F | $p < 0,05$ |
|---------------------|---------------------------------|-----------|---------------|
| Cistos | CAP1 X interface sedimento-água | 5,4 | 0,0320 |
| Oocistos | CAP1 X interface sedimento-água | 0,9 | 0,3311 |

Legenda: resultados em negrito demonstrando a probabilidade $< 0,05$

Tabela 14: Valores de ANOVA (teste f) e probabilidade (p) para a eficiência de recuperação da metodologia empregada com desagregação química e acrescida da etapa de desagregação física (ultrassom).

| Variável dependente | Fatores dependentes | Teste F | $p < 0,05$ |
|---------------------|-------------------------------|-----------|---------------|
| Cistos | Com Ultrassom x Sem Ultrassom | 78,7 | 0,0715 |
| Oocistos | Com Ultrassom x Sem Ultrassom | 2080,3 | 0,0140 |

Legenda: resultados em negrito demonstrando a probabilidade, $p < 0,05$.

7.2- Comparação múltipla de médias (teste de duncan) dos parâmetros, físico-químicos, microbiológicos (coliformes termotolerantes) e parasitológicos (cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp.), entre os pontos CAP1 e CAP2 do rio Capivari

Quando comparado à concentração de organismos nos diferentes pontos de coleta observou-se que a concentração de cistos de *Giardia* spp. foi significativamente maior no ponto CAP2 (Tabela 15). Quanto aos oocistos de *Cryptosporidium* spp. a concentração foi similar entre os pontos de coleta, sendo que as médias foram de 0,7 cistos/L para CAP1 e 1,9 oocistos/L para o CAP2 (Tabelas 6 e 7).

Quando considerados os indicadores microbiológicos, para coliformes termotolerantes, as médias entre os pontos CAP1 ($1,6 \times 10^5$ NMP/100 mL) e CAP2 ($5,1 \times 10^6$ NMP/100 mL) não diferem. Para o parâmetro pH, houve diferença significativa entre os dois pontos, com uma probabilidade de 0,0008 (Tabela 15).

Quanto à cor e turbidez houve diferença significativa entre os dois pontos, sendo que, no ponto CAP1 a média de cor foi 273,3 PtCO e no ponto CAP2, 434,0 PtCO ($p = 0,0039$). Quanto à turbidez a média dos valores no ponto CAP1 foi de 35,5 NTU e no ponto CAP2 48,6 NTU ($p = 0,0497$) (Tabela 15).

Tabela 15: Comparação múltipla de médias (Teste de Duncan) dos parâmetros microbiológicos, físico - químicos e parasitológicos entre os pontos CAP1 e CAP2.

| Parâmetros | Média | n | Pontos de coleta | Agrupamento de Duncan* | <i>p</i> |
|--|-----------|----|------------------|------------------------|---------------------|
| Cistos/L | 19,0 | 15 | CAP1 | A | 0,001 ^a |
| | 77,2 | 15 | CAP2 | B | |
| Oocistos/L | 0,7 | 15 | CAP1 | A | 0,4005 |
| | 1,9 | 15 | CAP2 | A | |
| Coliformes termotolerantes (NMP/100mL) | 4737360,0 | 15 | CAP1 | A | 0,5875 |
| | 2061600,0 | 15 | CAP2 | A | |
| pH | 6,9 | 15 | CAP1 | A | 0,0008 ^a |
| | 7,2 | 15 | CAP2 | B | |
| Cor (PtCO) | 273,3 | 15 | CAP1 | A | 0,0039 ^a |
| | 434,0 | 15 | CAP2 | B | |
| Turbidez (NTU) | 35,5 | 15 | CAP1 | A | 0,0497 ^a |
| | 48,6 | 15 | CAP2 | B | |

Legendas: * = Letras iguais não apresentam diferenças significativas. *p* = probabilidade. ^a = $p < 0,05$

7.3- Comparação múltipla de médias (Teste de Duncan) dos parâmetros parasitológicos (cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp.), entre o ponto CAP1 e a interface sedimento-água do rio Capivari.

Quando analisada a concentração de organismos considerando a presença de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas amostras da interface sedimento-água e água bruta superficial, observou-se que diferem entre si, sendo que a concentração de cistos foi maior na interface sedimento-água. Houve diferença significativa na concentração de cistos de *Giardia* spp. no ponto CAP1 e interface sedimento-água, onde a média (52,1 cistos/mL) foi maior na interface sedimento-água, ($p = 0,0320$) (Tabela 16).

Para oocistos de *Cryptosporidium* spp., houve diferença significativa entre o ponto de coleta CAP1 e a interface sedimento-água, sendo que as médias foram similares (Tabela 16).

7.4- Comparação múltipla de médias (Teste de Duncan) entre as duas etapas das análises da interface sedimento-água para e cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp

Não houve diferença significativa entre as duas etapas empregadas nas amostras de sedimento para cistos de *Giardia* spp. ($p = 0,0715$); entretanto, para oocistos de *Cryptosporidium* spp. houve diferença significativa entre as duas etapas com $p = 0,0140$ (Tabela 17).

Tabela 16: Comparação múltipla de médias (Teste de Duncan) dos parâmetros parasitológicos entre o ponto CAP1 e a Interface Sedimento-água.

| Parâmetros | Média | n | Pontos de coleta | Agrupamento de Duncan* | <i>p</i> |
|------------|-------|----|------------------|------------------------|---------------------------|
| Cistos/L | 19,0 | 15 | CAP1 | A | 0,0320^a |
| | 52,1 | 18 | Interface* | B | |
| Oocistos/L | 0,7 | 15 | CAP1 | A | 0,3102 |
| | 8,5 | 18 | Interface* | B | |

Legendas; * = Letras iguais não apresentam diferenças significativas.*Interface sedimento-água, *p* = Probabilidade, ^a < 0,05

Tabela 17: Comparação múltipla de médias (Teste de Duncan) entre as duas etapas das análises da Interface sedimento-água para e cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp.

| Parâmetros | Média | N | Pontos de coleta | Agrupamento de Duncan* | <i>p</i> |
|------------|-------|----|------------------|------------------------|---------------------------|
| Cistos/L | 13,0 | 13 | Sem Ultrassom | A | 0,0715 ^a |
| | 182,0 | 5 | Com Ultrassom | B | |
| Oocistos/L | 11,5 | 13 | Sem Ultrassom | A | 0,0140^a |
| | 130,0 | 5 | Com Ultrassom | B | |

***Letras iguais não apresentam diferenças significativas, *p* = probabilidade, ^a = *p* < 0,05.**

7.5- Teste de correlação de Pearson entre as concentrações de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. e parâmetros físico-químicos e biológicos dos pontos de coleta (CAP1- CAP2 e CAP1 - interface sedimento-água)

Com relação aos cistos de *Giardia* spp. observa-se a existência de correlação negativa entre a concentração de cistos na água bruta superficial e o pH ($r = -0,52245$), ou seja com a diminuição dos valores de pH ocorre o aumento da detecção de cistos (Tabela 18). Em relação ao parâmetro cor, houve correlação moderada entre cor da água bruta superficial e o aumento da concentração de cistos ($r = 0,41327$).

Quanto aos oocistos de *Cryptosporidium*, houve correlação moderada entre as concentrações de coliformes termotolerantes ($r = 0,37817$) e correlação fraca entre turbidez e as concentrações de oocistos ($r = 0,24729$) (Tabela 19).

7.6- Teste de correlação de Pearson entre a concentração de cistos de *Giardia* spp. nas amostras que se empregou a metodologia com desagregação química acrescida de desagregação físico-química da interface sedimento-água

Com relação aos cistos de *Giardia* spp., houve correlação moderada entre o sedimento da amostra e os cistos ($r = 0,590$), quando se empregou a metodologia com desagregação química e correlação forte (negativa) entre o volume do sedimento das amostras e os cistos ($r = - 0,911$) na metodologia acrescida de desagregação física (Tabela 20).

Tabela 18: Matriz da correlação linear de Pearson (r) entre cistos de *Giardia* spp. e parâmetros físico-químicos e microbiológicos das amostras de água bruta superficial dos pontos de coleta CAP1 e CAP2 do rio Capivari, Campinas, São Paulo.

| | Cistos | pH | Cor | Turbidez | Coliformes termotolerantes |
|----------------------------|------------------|----------|----------------|----------|----------------------------|
| Cistos | 1,0 | | | | |
| pH | -0,52245* | 1,0 | | | |
| Cor | 0,41327* | -0,06393 | 1,0 | | |
| Turbidez | 0,13393 | 0,11546 | 0,85713 | 1,0 | |
| Coliformes termotolerantes | 0,05237 | 0,07345 | -0,05708 | -0,02863 | 1,0 |

Legendas: *Resultados com correlação moderada em negrito. Caracterização das correlações: até 0,29 = correlação fraca, de 0,3 à 0,69 = correlação moderada e de 0,7 à 1,0 = correlação forte.

Tabela 19: Matriz da Correlação linear de Pearson (r) entre oocistos de *Cryptosporidium* spp. e parâmetros físico-químicos e microbiológicos das amostras de água bruta superficial dos pontos de coleta CAP1 e CAP2 do Rio Capivari, Campinas, São Paulo.

| | Oocistos | pH | Cor | Turbidez | Coliformes termotolerantes |
|----------------------------|------------------|----------|----------------|----------|----------------------------|
| Oocistos | 1,0 | | | | |
| pH | -0,15706 | 1,0 | | | |
| Cor | 0,13910 | -0,06393 | 1,0 | | |
| Turbidez | 0,24729** | 0,11546 | 0,85713 | 1,0 | |
| Coliformes termotolerantes | 0,37817* | 0,07345 | -0,05708 | -0,02863 | 1,0 |

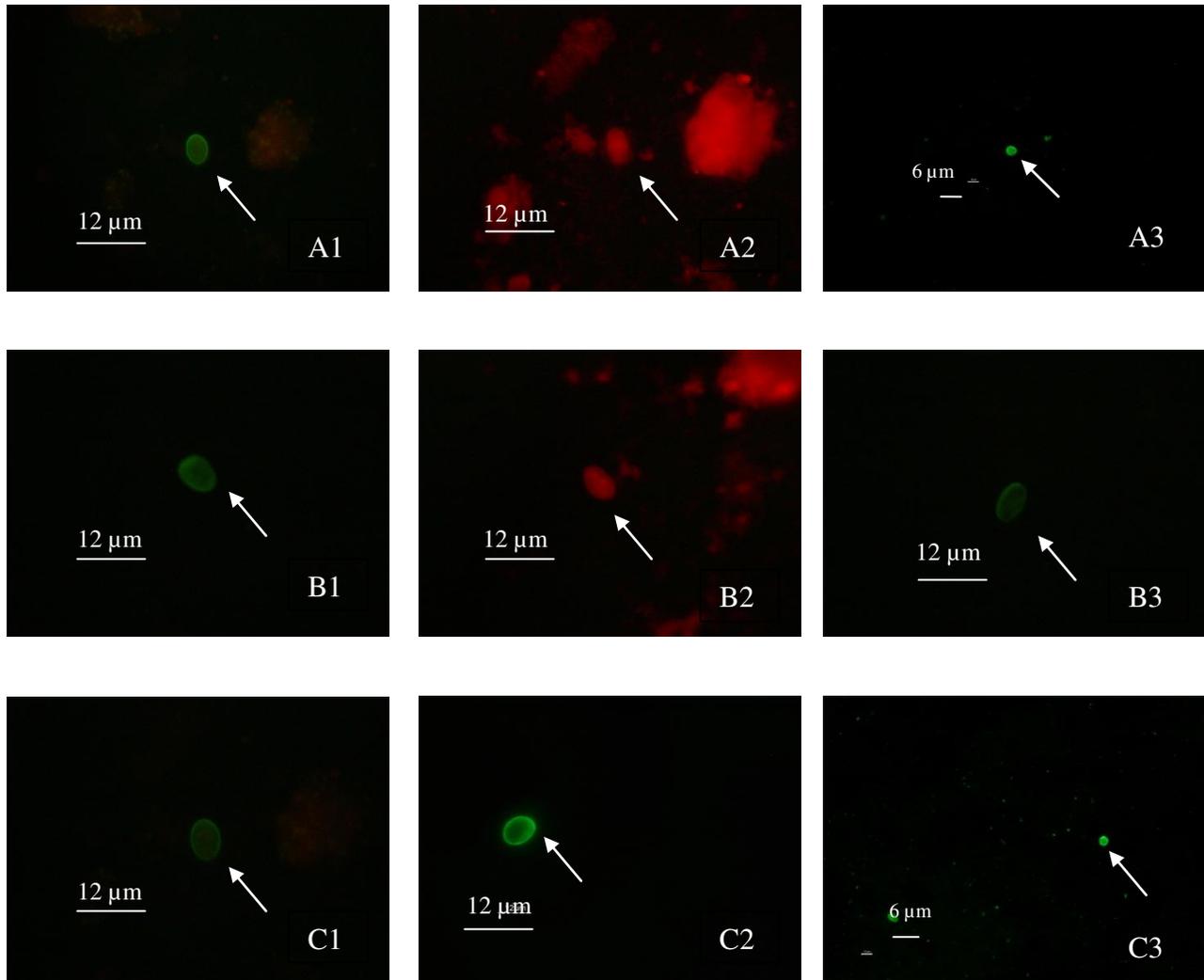
Legendas: Resultados com correlação moderada* e correlação fraca em negrito. Caracterização das correlações: até 0,29 = correlação fraca, de 0,3 à 0,69 = correlação moderada e de 0,7 à 1,0 = correlação forte.**

Tabela 20: Matriz da correlação linear de Pearson (r), entre a concentração de cistos de *Giardia* spp. e o volume do sedimento (Pellet) das amostras da Interface sedimento-água, com o uso da metodologia empregando desagregação física por ultrassom.

| | |
|--------|----------------|
| | Cistos |
| Pellet | - 0,911 |

Legenda: Valor da correlação forte negativa

Prancha 1- Oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. naturais e do controle positivo em amostras de água bruta superficial e da interface sedimento-água do rio Capivari:



Figuras: (A1) cisto natural de *Giardia* spp. presente no ponto CAP1, aumento de 630x, (A2) cisto de *Giardia* spp. - Color Seed[®] no experimento de controle positivo nas amostras do ponto CAP1, aumento de 630x, (A3) oocisto natural de *Cryptosporidium* spp. presente na amostra do ponto CAP1 (RID) aumento de 630x; (B1) cisto natural de *Giardia* spp. presente no ponto CAP2, aumento de 630x, (B2) cisto de *Giardia* spp. - Color Seed[®] no experimento de controle positivo nas amostras do ponto CAP2, aumento de 630x, (B3) cisto natural de *Giardia* spp. na amostra do ponto CAP2 (RID); (C1) cisto de *Giardia* spp. - Color Seed[®] no experimento de controle positivo da amostra de interface sedimento-água do rio Capivari, (C2) cisto natural de *Giardia* spp. presente na amostra de interface sedimento-água, aumento de 630x (RID), (C3) oocisto natural de *Cryptosporidium* spp. presente na amostra da interface sedimento-água, aumento de 630x (RID).

8- Conclusões

1. Ambos os protozoários patogênicos de veiculação hídrica, *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp., foram detectados nas amostras de água do rio Capivari, no município de Campinas, São Paulo.
2. As concentrações de cistos de *Giardia* spp. foram maiores que as concentrações de oocistos de *Cryptosporidium* spp. que foram detectados somente em setembro/2010 no ponto CAP1 e Outubro/2009 e junho/2010 CAP2.
3. De acordo com a correlação linear de Pearson, entre oocistos de *Cryptosporidium* spp. e os coliformes termotolerantes houve correlação moderada, o que pode ter ocorrido devido a lançamento pontuais de esgotos domésticos neste corpo hídrico. Entre os Coliformes Termotolerantes e cistos de *Giardia* spp., não houve correlação indicando que não são bons indicadores para este protozoário em águas brutas superficiais.
4. Quanto aos parâmetros físico-químicos, houve correlação inversa com o pH, bem como com a turbidez, onde pode se observar que alterações nos valores de pH afetavam diretamente na recuperação, da mesma maneira, o aumento da turbidez também influenciou na recuperação de cistos e oocistos em amostras de água bruta superficial.
5. Com relação às amostras da interface sedimento-água, cistos de *Giardia* spp. foram detectados em 94,0 % das amostras e oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram detectados em apenas 3 meses (16,6 % das amostras) em concentrações menores, com destaque para o mês de setembro/2010 onde a concentração foi de 130,0 oocistos/mL.
6. A interface sedimento-água é um local onde se concentram os as formas ambientais dos protozoários *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp.

9- Referências Bibliográficas

ALDON, J.E.; CHAGLA, A.H. Recovery of *Cryptosporidium* oocysts from water by a membrane filter dissolution method. **Letters in Applied Microbiology**, vol. 20, p.186-187, 1995.

ANGUISH, L. J.; GHIORSE, W. C. Computer-Assisted Laser Scanning and Video Microscopy for Analysis of *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Soil, Sediment and Feces. **Appl. Environ. Microbiology**, vol. 63, p. 724, 1997.

APHA, AWWA, and WEF, 2005. Standard methods for the examination water and wastewater 21st ed. American public health association, washington, D.C.

BARROS, A.L.JR.; CANTUSIO, R.N.; OLIVEIRA, D.P.; FRANCO, R.M.B. Investigação da presença dos protozoários *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., em sedimento do rio Capivari, Campinas, São Paulo, Brasil. **Revista Saúde –UNG**, Vol. 4, n.1, 2010.

BAISCH, P.; MIRLEAN N.; LIMA, G. Protocolos de coleta e análise dos sedimentos e material em suspensão. **Instituto do Mil nio**, Rio Grande/RS, 2003.

BONATTI, T. R.; FRANCO R. M. B.; CANTUSIO R. N. Comparison of two methodologies for detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts in activated sludge samples from a sewage treatment plant in the city of Campinas, São Paulo, Brazil. **Journal of Water and Health**, vol.5, p. 1-7, 2007.

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

CACCIO, S.M.; De GIACOMO, M.; AULICINO, F.A.; POZIO, E. *Giardia* cysts in wastewater treatment salutes in Italy. **Applied Environmental**, vol. 69, p. 3393 – 3398, 2003.

CANTUSIO, R.N. Estudo dos métodos: Flocculação em carbonato de cálcio e adaptação das técnicas de filtração em membrana e separação imunomagnética para a detecção de *Cryptosporidium* e *Giardia* em amostras hídricas. Tese de doutorado, Instituto de Biologia, Unicamp. Campinas, 2008.

CANTUSIO, R.N.; URBANO, L. S.; SATO, M.I.Z.; FRANCO, R.M.B. *Cryptosporidium* spp. in surface water supply of Campinas, Southeast Brazil. **Water Science &Tecnology**. vol.62, p. 217-222, 2010.

CARRARO, E.; FEA, E.; SALVA, S.; GILLI, G. Impact of wastewater treatment plant on *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts occurring in surface water. **Water Science and Technology**, vol. 47 (7), p. 31-37, 2000.

CETESB, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, Qualidade das águas interiores no Estado de São Paulo, 2010.

CLANCY, J.L.; CONNELL, K.; McCUIN, R.M. Implementing PBMS improvements to USEPA'S *Cryptosporidium* and *Giardia* methods. **Journal of American WaterWorks Association**, vol.95 (9), p.80 – 90, 2003.

CONAMA, Resolução nº 357, de Março de 2005, Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente - **CONAMA**, p. 01-23, 2005.

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

COOK, N.; NICHOLS, R.A.B.; WILKINSIN, N.; PATON,C.A.; BARKER, K.; SMITH, H.V. Development of a method for detection of *Giardia duodenalis* cysts on lettuce and for simultaneous analysis of salad products for the presence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 73, n. 22, p 7388 – 7391, Nov. 2007.

COURTOIS, C.; BESSON, A.; DAHAN, J.; BOURQUE, S.; DOBROWOLSKA, G.; PUGIN, A.; WENDEHENNE, D.. Nitric oxide signalling in plants: interplays with Ca²⁺ and protein kinases. **Journal of Experimental Botany**, vol. 59, p. 155-163, 2008.

CROCKETT, C.S. Determination of Sources and Impacts of Giardia and Cryptosporidium in A Major Metropolitan Watershed Master's Thesis, Drexel University, Philadelphia, **Parasitology Research**, p. 90-94, 1995.

CROCKETT, C.S. The significance of streambeds sediments as a reservoir of *Cryptosporidium* oocysts. A dissertation submitted to the Faculty of Drexel University by Crockett, C.S. in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy, 2004.

DAI, X.; BOLL, J. Settling velocity of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia*. **Water Research**, vol. 40, p. 1321-1325, 2006.

DAVIES, C.M.; KAUCNER, C.; DEERE, D.; ASHBOLT, N.J. Recovery and enumeration of *Cryptosporidium parvum* from animal fecal matrices, **Applied and Environmental microbiology**, vol.69, n. 5, p. 2842-2847, 2003.

DEFESA CIVIL, <http://www.defesacivil.gov.br/index.asp>, Acesso em 01 de março de 2011.

ESCOBEDO, A. A.; ALMIRALL P.; ROBERTSON J. L.; FRANCO R.M.B.; HANEVIK K.; MORCH K.; CIMERMAN S.; *Giardia*: the ever-present threat of a neglected disease. **Drug Diseases and Disorders**, vol.10, p. 329-348, 2010.

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

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

FAYER, R.; SANTÍN, M.; TROUT, J.M. *Cryptosporidium ryanae*. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos Taurus*). **Veterinary Parasitology**, vol. 156, 191-198, 2008.

FAYER, R.; SANTÍN, M. *Cryptosporidium xiaoi*. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovisaries*). **Veterinary Parasitology**, vol. 164, p. 192-200, 2009.

FAYER, R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. **Experimental Parasitology**, vol.124 (1) p. 90-97. 2010.

FELICE, F.P. Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. **University California Public Zoology**, vol. 57 p. 53 – 146, 1952.

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

FENG, Y. e XIAO, L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, vol. 24 n 1, p. 110-140, 2011.

FIGUEIREDO, A.G.JR. & BREHME, I. Amostragem geológica na pesquisa mineral. **Brazilian Journal of Geophysics**. Universidade Federal Fluminense, vol. 18, p. 269-280, 2001.

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

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

FRANCO, R.M.B.; CANTUSIO, R.N. Occurrence of Cryptosporidial oocysts and *Giardia* cysts in bottled mineral water commercialized in the city of Campinas, State of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, vol. 92(2), p. 205-207, 2002.

FRANCY, D.S.; SIMMONS III, O.D.; MICHAEL, W.W.; EMMA, J.G.; SOBSEY, M.D.; SCHAEFER III, F.W. Effects of Seeding Procedures and Water Quality on Recovery of

Cryptosporidium Oocysts from Stream Water by Using U.S. Environmental Protection Agency Method 1623. **Appl. Environ. Microbiol.** 7:4118-4128, 2004.

GAJADHAR, A. A.; FORBES, L. B.; An internationally recognized quality assurance system for diagnostic parasitology in animal health and food safety, with example data on trichinellosis. **Veterinary Parasitology**, vol. 103, p.133 – 140, 2002.

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

GAMBA, R.C.; CIAPINA, E.M.P.; ESPINDOLA, R.S.; PACHECO, A.; PELLIZARI V.H. Detection of *Cryptosporidium* spp. Oocysts in groundwater for human consumption in Itaquaquecetuba city, São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol.40 p. 151-153, 2000.

GLABERMAN, S. Three drinking water-associated cryptosporidiosis outbreaks, Northern Ireland. **Emerging Infectious Diseases**, vol.8 (6), p. 631-633, 2002.

GUIMARÃES, S.; SOGAYAR, M. J. Detection of anti-*Giardia lamblia* serum antibody among children of day care centers. **Revista Saúde Pública**, vol.36 (1), p. 63-68, 2002.

GRACZYK, T. K.; DEIRDRE, S.; LEENA, T.; FRANCES, E. L.; PATRICK, N. B. Bather density and levels of *Cryptosporidium*, *Giardia*, and pathogenic microsporidian spores in recreational bathing water. **Parasitology Research.**, vol. 101, p. 1729-1731, 2007.

HACHICH, E.M.; SATO, M.; GALVANI, A.T.; MENEGON, N.; MUCCI J.L.N. *Giardia and Cryptosporidium* in source waters of São Paulo State, Brazil. **Water Science and Technology**, vol. 50, p239-245, 2004.

HALLER, L.; POTÉ, J.; LOIZEAU, J.LUC; WILDI, W. Distribution and survival of faecal indicator bacteria in the sediments of the Bay of Vidy, Lake Geneva, Switzerland. **Ecological Indicators**, vol. 9, p. 540-547, 2009.

HEITMAN, T.L.; FREDERICK, L.M.; VISTE, J.R.; GUSELLE, N.J.; MORGAN, U.M.; THOMPSON, R.C.A.; OLSON, M.E., Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* and characterization of *Cryptosporidium* spp. Isolated from wildlife, human, and agricultural sources in the north Saskatchewan, River Basin in Alberta, Canada. **Journal of Microbiology**, vol. 48, p. 530 – 541, 2002.

HORMAN, A.; RIMHANEN-FINNE, R.; MAUNULA, L.; VON BONSDORFF, C.H.; TORVELA, N.; HEIKINHEIMO, A.; HANNINEN, L. *Campylobacter* spp., *Cryptosporidium* spp., noroviruses, and indicator organisms in surface water in southwestern Finland. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 70, n. 1, p. 95-105, 2004.

HSU, B-M.; HUANG, C.; HSU, Y-F. AND HSU, C-L.L. Examination of *Giardia* and *Cryptosporidium* in water samples and fecal specimens in Taiwan. **N.I.E.A Taiwan, R.O.C.** 9, p. 313-320, 2002.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores de Desenvolvimento Sustentável**, Brasil, Capítulo – Água doce, p. 83-92 2010.

INOUE, M.; UGA, S.; ODATA, T. RAI, S.K.; VERSEY, G. HOTTA, H. Chances of physical and biochemical properties of *Cryptosporidium* oocysts with various storage condition. **Water research**, vol. 40, p. 8881 – 886, 2006.

JIANG, J. Distribution of *Cryptosporidium* in Storm Event Water Samples from Three Watersheds UN New York. **Applied and Environmental Microbiology**, vol.34, p. 4446-4454, 2005.

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

KEPNER, R.L.JR. e PRATT JR. Use of Fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: pasta and present. **Microbiology Reviews**, vol.5, p. 603- 615, 1994.

KRAMER, M. H.; HERWALDT, B. L.; CALDERON, R. L.; JURANEK, D. D. Surveillance for waterborne-disease outbreaks – United States, 1993-1994. In: **CDC Surveillance Summaries, MMRW**, 1996.

KRISTIN, E.S.; AARON, I.P.; EDWARD, R. A. AND THOMAS, H. Deposition of *Cryptosporidium* oocysts in streambeds. **Applied and Environmental Microbiology**, vol.72, N. 3, p. 1810-1816, 2006.

KUCZYNSKA, E., & SHELTON, D.R. Method for detection and enumeration of *Cryptosporidium* oocysts in feces, manures, and soils. **Applied and Environmental Microbiology**, vol.65, p. 2820 – 2826, July 1999.

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

LEAL, D.A.G. Avaliação da contaminação de ostras (*Crassostrea* spp.) por espécies de *Cryptosporidium* e *Giardia* em um ambiente de estuário do litoral de São Paulo. Dissertação de Mestrado. Unicamp, Campinas, 2008.

LECHEVALIER, M.W.; NORTON, W.D. Examining relationships between, particle counts and *Giardia*, *Cryptosporidium* and turbidity. **Journal of Water Works Association.**, vol. 84 n. 12, 54-60, 1992.

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

LIPP, E.K.; SCHMIDT, N.; LUTHER M.E.; ROSE, J.B. Determining the Effects of El Niño-Southern Oscillation Events on Coastal Water Quality. **Estuaries**, vol. 24, n. 4, p. 491-497, 2001.

Mc DANIEL, J.A.; CAPONE, D.G. A comparison of procedures for the separation of aquatic bacteria from sediment for subsequent direct enumeration. **Journal of Microbiol. Methods**, vol. 3, p. 291 – 302, 1985.

MACKENZIE, W.R.; HOXIE, N.J.; PROCTER, M.E.; GRADSUS, M.S.; BLAIR, K.A.; PETERSON, D.E. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. **New England Journal of Medicine**, vol. 331, n3, p. 161-167, 1994.

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

MEDEIROS, A.O.; KOHLER, L.M.; HAMDAN, J.S.; MISSAGIA, B.S.; BARBOSA, F.A.R.; ROSA, A. Diversity and antifungal susceptibility of yeasts from tropical freshwater environments in Southeastern Brazil. **Water Research**, n.42, p. 3921-3929, 2008.

MEDEIROS, R.C. Comparação da resistência de protozoários patogênicos, e *Cryptosporidium* spp. e de microrganismos indicadores à desinfecção sequencial, cloro, radiação ultravioleta e ozônio, Dissertação de Mestrado, São Carlos, 2010.

MEDEMA, G.J.; SCHETS, F.M.; TEUNIS; HAVELAAR, A.H. Sedimentation of free and attached *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 64 n. 11, p. 4460 – 4466, Nov. 1998.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000. RDC nº 54, 15/6/2000.

(MMA, 1998) MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Recursos Hídricos no Brasil - dos recursos hídricos e da Amazônia legal, **Relatório da Secretaria Recursos Hídricos**, p. 28 – 33, 1998.

MOLLOY, S.L.; MONTGOMERY, A.E.; HUFFMAN, D.E.; ROSE, J.B. Detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in sediment and biosolids by immunomagnetic separation. **PubMed – Indexed for MEDLINE – 17120461**, vol. 79, p. 1013 – 1016, Sep 2006.

MONIS, P. T. CACCIO, S.M.; THOMPSON, A. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. **Trends in Parasitology**, vol.25, p. 93-100, 2009.

MONS, C.; AURELIEN, D.; GOSSELIN, S.; CHRISTELLE, G.; LAURENT, Monitoring of *Cryptosporidium* and *Giardia* river contamination in Paris area. **Water Research**, vol.43, p. 211-217, 2008.

MONTE VERDE, D.T.; MARTINS, G.M.; ANDRADE, C.A. Giardiase aspectos gerais. **Revista do Instituto Médico legal**. N.43, p. 56-65, 2007.

MORAES, D. S. L.; JORDÃO B. Q. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. **Saúde pública**, vol.36 (3), p. 370-4, 2002.

MORAIS, R. C. Reenquadramento e Plano de Recursos Hídricos: Estudo de Caso da Bacia PCJ. Dissertação de Mestrado, Instituto de Engenharia civil e urbanismo, Unicamp, Campinas, 2009.

MORGAN-RYAN, U.M.; FALL, A.; WARD, L.A.; HIJAWI, N.; SULAIMAN, I.; FAYER, R.; THOMPSON, R.C.A.; OLSON, M.; LAL, A.; XIAO, L. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, vol.49(6), p. 433-440, 2002.

NANCY, J.S.; LEAH, F.V.; BRADLEY, J.E.; DEBORAH, H.G.; PAUL, S. W.B.V. P. Modification to EPA Method 1623 to address a unique seasonal matrix effect encountered in some U.S. source waters. **Journal of Microbiological Methods**, vol.75, p 445-448, 2008.

NETO, J.J.G.C.; SIQUEIRA, L.F.S.; BARBIERI, R.; CAVALCANTE, P.R.S.; ROJAS, M.O.A.I.; Análise físico-química do sedimento da Laguna da Jansen, São Luiz, MA, VI Congresso de Meio Ambiente da AUGM, São Carlos – SP. Anais de eventos da UFSCAR, vol.5, 2009.

O'DONOUGHUE, P.J. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis in man and animals. **International Journal Parasitology**, vol.85, 525-530, 1995.

OLIVEIRA, P.V. Ocorrência de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. no Rio Atibaia, Bacia do rio Piracicaba, Campinas, São Paulo. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biologia, Unicamp, Campinas, 2005.

OMS- World Health Statistics, 2008. <http://www.oms.com>, acesso em 10 de novembro de 2010.

ONU- Relatório da Organização das Nações Unidas, 2008. <http://www.onu.com>, acesso em 10 de novembro de 2010.

ORTEGA, Y.R.; ADAM R.D.; *Giardia*: Overview and update. **Clinical Infectious Diseases** vol.25, p. 545-50, 1997.

PENG, M.M.; XIAO, L.; FREEMAN, A.R.; ARROWOOD, M.J.; ESCALANTE, A.A.; WELTMAN, A.C.; ONG, C.S.L.; MAC K.; LAL, A.A.; BEARD, C.B. Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: evidence of two distinct human transmission cycles. **Emerging Infectious Diseases**, vol.3(4), p. 567-573, 1997.

(PCJ, 2007) PLANO DAS BACIAS HIDROGRÁFICAS- PCJ, 2004-2007, Relatório Final, Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo, 2007.

(PCJ, 2008-2020) PLANO DAS BACIAS HIDROGRÁFICAS CO PCJ, 2008-2020, Encontros setoriais, Americana, São Paulo, dias 22,23 e 24 de setembro de 2008.

PLUTZER, J.; KARANIS, P.; Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: An update. **Veterinary Parasitology**., vol.165, p. 187-199, 2009.

PEREIRA, J. T.; SOCCOL, V. T.; COSTA, A. O.; CASTRO, E. A.; OSAKI, S. C.; PAULINO, R. C. *Cryptosporidium* spp. para controlar é necessário conhecer. Departamento de Patologia Básica – Universidade Federal do Paraná. **Revista Saúde e Ambiente**, vol.10, p. 13-25, 2009.

PEREIRA, M.A. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e em hortaliças da região metropolitana de Campinas, S.P., sua relação com a comunidade de trabalhadores e com a área agrícola. Tese de doutorado, Instituto de Biologia, Unicamp. Campinas, 2008.

PORTARIA M/S N. 518, DE 25 DE MARÇO DE 2004. Ministério da Saúde, p. 266.

ROBERTSON, L.J.; HERMANSEN, L.; GJERDE, B.K.; Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in sewage in Norway. **Applied Environmental Microbiology**, vol.8, p. 5297-5303, 2006.

ROEFER, P.A.; MONSCVITZ, J.T.; REXING, D.J. The Las Vegas cryptosporidiosis outbreak. **Journal of American Water Works Association**, vol.23 p. 95-106, 1996.

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

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

RYBICKA, E.H.; CALMANO, W.; BREEGER, A. Heavy metals sorption/desorption on competing clays minerals: an experimental study. **Applied Clay Science**, vol. 9, p. 369 – 381, 1995.

SANTOS, L.U.; BONATTI, T.R.; CANTUSIO, R.N.; FRANCO, R. M.B. Occurrence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in activated sludge samples in Campinas, SP, and Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, vol. 46(6), p. 309-313, 2004.

SANTOS, L.U.; BONATTI, T.R.; NETO, R.C.; FRANCO, R.M.B. Protozoários patogênicos de veiculação hídrica: as metodologias de detecção em amostras de esgoto e a eficiência dos tratamentos de remoção e desinfecção. **Higiene Alimentar**. Edição temática n.1, vol. 22., Outubro, 2008.

SANTOS, L.U. Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em um estação de tratamento de esgoto: avaliação das eficiências do processo de lodo ativado na remoção e de desinfecção por luz ultravioleta na inativação desses patógenos., Tese de Doutorado, Unicamp, Campinas, 2007.

SANTOS, L.U.; NETO, R.C.; FRANCO, R.M.B.; GUIMARÃES, J.R. Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em amostras de esgoto bruto ou tratado: avaliação crítica dos métodos. **Engenharia Sanitária Ambiental**, vol. 16, n. 12, p. 115-120, Junho, 2011.

SILVA, G.S. Avaliação do Estado de Degradação e Capacidade de Suporte da Bacia do Rio Atibaia- região de Campinas/Paulínia-SP. Tese de Doutorado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, 2004.

SMITH, H.V. AND GRIMASON, A. M. *Giardia* and *Cryptosporidium* in water and wastewater. In the handbook of water and wastewater microbiology. **Elsevier**, p. 619-781, 2003.

SMITH, H.V.; NICHOLS, R. A. B. *Cryptosporidium*: Detection in water and food. **Experimental Parasitology**, vol.124, p. 61-79, 2010.

SNEL, S.J.M.G.; BAKER, V.; KAMALESH, N. F.; LEARMONTH, J. A tale of two parasites: the comparative epidemiology of cryptosporidiosis and giardiasis. **Epidemiology and Infections**, vol.137 p. 1641-1650, 2009.

SODRÉ, F.C.; FRANCO, R.M.B.; Novos aspectos sobre um tema bem conhecido: *Cryptosporidium*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, vol.33 (2), p. 97-107, 2001.

THOMPSON, R.C.A. Presidential address: rediscovering parasites using molecular tools-towards revising the taxonomy of *Ecchinococcus*, *Giardia* and *Cryptosporidium*. **International Journal for Parasitology**, vol.32, p. 493-496, 2002.

THOMPSON, R.C.A. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and Giardiasis. **Veterinary Parasitology**, vol. 126, p. 15-35, 2004.

UMA-Universidade Livre da Mata atlântica 2001. Acesso em 10 de Novembro de 2010, <http://www.worldwatch.org.br/,2001>.

USEPA, Manual for the certification of the laboratories analyzing drinking water; criteria and procedures; quality assurance, fifth. EPA 815-R-05-004. Office of ground water and drinking water, U.S. **Environmental Protection Agency, 26 West Martin Luther King Drive**, Cincinnati, OH 45268, 2005.

VASCONCELOS, Y. A purificação das águas. **Engenharia Sanitária Ambiental**, vol.75, p. 65-69, 2002.

VEJI, M.I.; ALBRIGHT, L.T. Microscopic enumeration of attached marine bacteria of seawater, marine sediment, fecal matter and kelp blade samples following pyrophosphate and ultrasound treatments. **Canadian Journal of Microbiology**, vol. 32, p. 121-126, 1985.

XIAO, L.; SINGH, A.; LIMOR, J.; GRACZYK, T. K.S.; LAL, A. molecular characterization of *Cryptosporidium* oocysts in samples of raw surface water and wastewater. **Applied Environmental Microbiology**, vol.67 (3), p. 1097 – 1101, 2001.

XIAO, L.H.; FAYER, R.; RYAN, U.; UPTON, S.J. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implication for public health. **Clinical Microbiology Reviews**, vol.17, p. 72-97, 2004.

XIAO, L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. **Experimental Parasitology**, vol. 124 p. 80-89, 2010.

WANG, R.; ZHANG, X.; ZHU, H.; ZHANG, L.; FENG, Y.; JIAN, F.; NING, C.; QI, M.; ZHOU, Y.; FU, K.; WANG, Y.; SUN, Y.; WANG, Q.; XIAO, L.; Genetic characterizations of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in humans Henan, China, **Experimental Parasitology**, vol.127, p. 42-45, 2011.

WALLIS, P.M.; ERLANDSEN, S.L.; ISSAC-RENTON, J.L.; OLSON, M.E.; ROBERTSON, W.J.; VAN KEULEN, H. Prevalence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts and characterization of *Giardia* spp. isolate from drinking water in Canadá. **Appl. Environ. Microbiol.** vol. 62, p. 2789 – 2797, 1996.

WU, J.; REES, P.; STORRER, S.; ALDERSIO, K. AND DORNER, S., Fate and transport modeling of potential pathogens: the contribution from sediments. **Journal of the American Water Resources Association**, vol. 45, n. 1, p. 35-44, 2009.