

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
ENGENHARIA AMBIENTAL**

**MÉTODO PARA ENUMERAÇÃO DE OVOS DE  
HELMINTOS E OOCISTOS DE PROTOZOÁRIOS NA  
RIZOSFERA DE UMA MACRÓFITA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Daniela Almeida Rodrigues**

**Santa Maria, RS, Brasil.**

**2015**

**MÉTODO PARA ENUMERAÇÃO DE OVOS DE HELMINTOS  
E OOCISTOS DE PROTOZOÁRIOS NA RIZOSFERA DE UMA  
MACRÓFITA**

**Daniela Almeida Rodrigues**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Área de Concentração em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Engenharia Ambiental.**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Delmira Beatriz Wolff**  
**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvia Gonzalez Monteiro**

**Santa Maria, RS, Brasil.**

**2015**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Rodrigues, Daniela Almeida  
Método para enumeração de ovos de helmintos e oocistos de protozoários na rizosfera de uma macrófita. / Daniela Almeida Rodrigues.-2015.  
79 f.; 30cm

Orientadora: Delmira Beatriz Wolff  
Coorientadora: Silvia Gonzalez Monteiro  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, RS, 2015

1. Esgoto doméstico 2. Verminoses 3. Protozoonoses 4. Typha domingensis I. Wolff, Delmira Beatriz II. Monteiro, Silvia Gonzalez III. Título.

---

© 2015

Todos os direitos autorais reservados a Daniela Almeida Rodrigues. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: biologadanielarodrigues@gmail.com

---

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Tecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**MÉTODO PARA ENUMERAÇÃO DE OVOS DE HELMINTOS E  
OOCISTOS DE PROTOZOÁRIOS NA RIZOSFERA DE UMA  
MACRÓFITA**

Elaborada por  
**Daniela Almeida Rodrigues**

Como requisito para obtenção do grau de  
**Mestre em Engenharia Ambiental**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Delmira Beatriz Wolff, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**  
(Presidente/Orientadora)

---

**Elvis Carissimi, Dr. (UFSM)**

---

**Noeli Júlia Schussler de Vasconcellos, Dr<sup>a</sup>. (UNIFRA)**

Santa Maria, 20 de janeiro de 2015.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço os meus pais Odilon e Neila pela força e empenho pela minha formação. Vocês me ensinaram todos os caminhos e me direcionaram sempre pensando no meu bem e no meu sucesso como ser humano e como profissional. Tudo o que sou e tudo o que tenho eu devo a vocês.

Meu agradecimento à família que formei, meu esposo Leandro carinhoso e incentivador, que sempre me apoiou e nunca deixou que eu pensasse em desistir, ao meu filho Miguel que é a força que faz com que eu levante todos os dias e por suportar a minha ausência em função dos estudos.

Agradeço ao meu primeiro orientador Demétrio Luis Guadagnin pela força e orientação.

Agradeço à minha orientadora Delmira Beatriz Wolff, por me acolher e orientar, pelos ensinamentos e cobranças que me fizeram crescer e aprender muito na área de saneamento, e pelas palavras de conforto nas horas de desespero durante a pesquisa.

À minha co-orientadora Silvia González Monteiro pela confiança, pela disponibilidade e por sempre abrir as portas do conhecimento e do laboratório para que eu pudesse concluir a minha pesquisa.

Meu agradecimento em especial aos meus colegas Elis Deon, Olimpio Rafael Cardoso, Renata Azevedo Xavier, José Astério, Diego Balestrin, Cibele Rebolho e Alice Falleiro. Vocês foram muito mais que colegas, vocês são os meus amigos e fizeram por mim coisas que guardarei para sempre no meu coração.

À Mariangela Facco de Sá por toda ajuda na execução dessa pesquisa, pela disposição em meio à correria do seu Doutorado e principalmente pela confiança e de acreditar que tudo daria certo no final.

Agradeço aos colegas de pesquisa Ronaldo e Samara pelo auxílio e compreensão durante a realização do trabalho.

Agradeço aos meus professores especiais Maria do Carmo Cauduro Gastaldini, João Batista Dias Paiva, Daniel Allasia e Elvis Carissimi. Vocês foram mais que professores, foram grandes Mestres, me ensinaram além de uma sala de aula e sempre me auxiliaram e apoiaram durante toda a minha caminhada pelo mestrado, cada um da sua forma e conforme sua disponibilidade.

Agradeço a minha orientadora de docência Marilise Mendonça Krügel pela grande dedicação em passar conhecimentos. Admiração e carinho são as palavras que guardo da minha experiência como professora na docência orientada por você professora.

Aos colegas do mestrado, servidores e professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, pelo companheirismo, momentos de aprendizagem e apoio.

Aos funcionários especiais que sempre me auxiliaram e trataram com carinho e respeito: Marília Goulart que se tornou grande amiga, André Colasiol que sempre foi prestativo e coerente no laboratório e a Rosa Maria atual secretária do programa da Pós-Graduação em Engenharia Ambiental que sempre está a nossa disposição com o intuito de ajudar e facilitar nossos processos pelo mestrado.

À primeira secretária do programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental Claudiane Brito de Almeida pela força, pelo empenho, pelos esclarecimentos e pela amizade.

À Rede Nacional de Tratamento Descentralizado (RENTED).

À Capes pelo apoio financeiro durante o mestrado.

Muito obrigado!

“Só sei que nada sei por completo  
Só sei que nada sei que só eu saiba  
Só sei que nada sei que eu não possa vir a saber  
Só sei que nada sei que outra pessoa não saiba  
Só sei que nada sei que eu e outra pessoa não saibamos juntos”.

“É necessário fazer outras perguntas, ir atrás das indagações que produzem o novo saber, observar com outros olhares através da história pessoal e coletiva, evitando a empáfia daqueles e daquelas que supõem já estar de posse do conhecimento e da certeza.”

*(Mario Sergio Cortella)*

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental  
Universidade Federal de Santa Maria

### MÉTODO PARA ENUMERAÇÃO DE OVOS DE HELMINTOS E OOCISTOS DE PROTOZOÁRIOS NA RIZOSFERA DE UMA

**MACRÓFITA** AUTORA: DANIELA ALMEIDA RODRIGUES

ORIENTADORA: DELMIRA BEATRIZ WOLFF

CO-ORIENTADORA: SILVIA GONZALEZ MONTEIRO

Data e local da defesa: Santa Maria, 20 de janeiro de 2015.

O Brasil possui um serviço de saneamento com maior *déficit* de cobertura, fator esse, relacionado a poluição das águas que recebe o lançamento de efluentes sem tratamento, principalmente os de origem doméstica, uma vez que a coleta e o tratamento não existe ou é inadequado. O lançamento de efluentes diretamente no solo, sem tratamento adequado pode acarretar a contaminação dos cursos hídricos, do solo e da água subterrânea, de acordo com as características do local. Em meio a essa realidade, a degradação de recursos naturais no Campus da UFSM, devido ao aumento da população acadêmica, tem chamado atenção de pesquisadores e gestores da instituição. Há uma considerável extensão de plantas como macrófitas muito próximas aos lançamentos domésticos no Campus da Universidade, tais como a *Typha domingensis*, que são responsáveis por uma boa parte de retenção de microrganismos presentes em lançamentos de águas residuais e que no local estudado não existe até o momento um controle microbiológico. O presente trabalho justifica-se pela importância de análises de amostras ambientais desses lançamentos e de preconizar metodologias que possibilitem comprovar a presença de ovos de helmintos e oocistos de protozoários presentes no rizoma dessas plantas. Esse fator torna-se importante pelo fato que helmintos e protozoários são grande causadores de doenças gastrointestinais, podendo, em função das condições de *habitat*, saúde e idade, levar o indivíduo a morte. A área estudada foi próxima a dois prédios da casa do estudante com lançamento de águas residuais. O objetivo geral desse trabalho foi desenvolver metodologia para verificar a presença de ovos de helmintos e oocistos de protozoários na rizosfera de macrófitas em ambiente natural, com lançamento de efluentes sanitários. O estudo foi desenvolvido em duas fases, tendo como primeira fase a análise de ovos de helmintos e oocistos de protozoários presentes em doze amostras de lançamentos de águas residuais através do método de Bailenger que ocorreu durante um período de três meses, com análise realizadas semanalmente. A segunda fase foi detectar a presença de ovos de helmintos e oocistos de protozoários com uma metodologia modificada neste trabalho, denominada de Rodrigues & Wolff, para análise da rizosfera do rizoma da macrófitas *Typha domingensis* em 10 exemplares da planta, também com um tempo aproximado de análise de três meses. Os resultados da primeira fase coincidem com dados de alguns estudos realizados com águas residuais. Os resultados da segunda fase, mesmo sendo positivos para a presença de ovos de helmintos e oocistos de protozoários não tornam possível a comparação, visto que não existe na literatura resultados de análise de ovos de helmintos e oocistos de protozoários presente na rizosfera da macrófitas *Typha domingensis*. Como resultado das análises da primeira fase obteve-se um valor médio da presença de ovos de helmintos de 112,4 ovos/L na FP35 e 113,5 ovos/L na FP50. Nas amostras de *Cryptosporidium* sp todas as amostras deram positivas para a presença desse oocisto e *Giardia* sp todas deram negativas. Na segunda fase, obteve-se um maior número de ovos encontrados em uma das amostras de um dos exemplares analisados e as demais amostras mantiveram valores muito próximos de ovos de helmintos. Nas amostras de *Cryptosporidium* sp somente as dos últimos três exemplares deu negativo e *Giardia* sp somente em uma amostra de um exemplar deu positivo.

**Palavras-chave:** Esgoto doméstico. Verminoses. Protozoonoses. *Typha domingensis*.



## ABSTRACT

Master Course Dissertation  
Professional Graduation Program in Ambiental Engineering  
Universidade Federal de Santa Maria

### METHOD FOR HELMINTH EGG AND LISTING PROTOZOAN OOCYSTS IN A MACROPHYTE RHIZOSPHERE

AUTHOR: DANIELA ALMEIDA RODRIGUES

ADVISOR: DELMIRA BEATRIZ WOLFF

CO-ADVISOR: SILVIA GONZALEZ MONTEIRO

Defense place and date: Santa Maria, January 20, 2014.

Brazil has a sanitation service with greater deficit coverage, this factor, related to water pollution that receives the discharge of effluents untreated, mainly from domestic sources, as the collection and treatment do not exist or are inadequate. Discharging effluents directly into the ground without proper treatment can lead to contamination of water resources, soil and groundwater, according to local characteristics. Amid this reality, the degradation of natural resources on the campus of UFSM, due to increased academic population, has drawn attention of researchers and managers of the institution. There is a considerable extension of plants as weeds very close to launch domestic Campus of the University, such as *Typha domingensis*, which are responsible for much of retention of microorganisms in waste water releases and the study location does not exist until the when a microbiological control. This work is justified by the importance of analysis of environmental samples such releases and advocate methodologies for proving the presence of helminth eggs and oocysts of protozoa present in the rhizome of these plants. This factor becomes important by the fact that helminths and protozoa are great cause of gastrointestinal diseases and may, depending on habitat conditions, health and age, cause the individual to death. The study area was next to two buildings in the student's home with release of wastewater. The aim of this study was to develop a methodology to verify the presence of helminth eggs and oocysts of protozoa in the rhizosphere of weeds in natural environment, with release of sewage. The study was conducted in two phases, with the first phase analysis of helminth eggs and oocysts of protozoa present in twelve samples of waste water releases through Bailenger method that occurred during a period of three months, with analysis performed weekly. The second phase was to detect the presence of helminth eggs and oocysts of protozoa with a modified methodology in this paper, called Roberts & Wolff, for analysis of the rhizosphere of the rhizome of macrophyte *Typha domingensis* in 10 specimens of the plant, also with an approximate time of analysis of three months. The results of the first stage coincide with the data of some studies with wastewater. The results of the second phase even being positive for the presence of helminth eggs and oocysts of protozoa do not make it possible to compare, since there is the analysis results literature helminth eggs and oocysts of protozoa present in the rhizosphere of macrophyte *Typha domingensis*. As a result of the analysis of the first phase gave an average value of the presence of helminth eggs 112.4 eggs/ L FP35 and 113.5 eggs/ L FP50. Samples of *Cryptosporidium* sp all samples tested positive for the presence of oocysts and *Giardia* sp all were negative. In the second phase, we obtained a greater number of eggs found in a sample of one of the analyzed samples and other samples remained very close values of helminth eggs. In *Cryptosporidium* sp samples only the last three specimens was negative and *Giardia* sp only a sample of a specimen was positive.

**Keywords:** Domestic sewage. Worm disease. Protozoal diseases. *Typha domingensis*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Rizoma da <i>Typha domingensis</i> .....	21
Figura 2 – Localização da área de estudo na Universidade Federal de Santa Maria.....	39
Figura 3 – (a) caixa de passagem, onde foram realizadas as coletas da FP35. (b) Localização da caixa de passagem próximo ao prédio 33. ....	41
Figura 4 – (a) Tubos de passagem de águas residuais do prédio 36. (b): Local onde está a passagem do fluxo de esgoto bruto lançado pelos tubos da FP 50.....	41
Figura 5 – (a) Frascos para amostras de esgoto das FPs para análise de ovos de helmintos. (b) Frascos para amostras de esgoto das FPs para análise oocistos de protozoários. ....	41
Figura 6 – Procedimento para a preparação da amostra para análise biológica de ovos de helmintos; (a) frascos com 1L de esgoto bruto; (b) frasco com 100mL com sedimento. ....	46
Figura 7 – Amostras para o processo de centrifugação. (a) falcons com 50 mL cada de sedimento; (b) processo de centrifugação das amostras.....	47
Figura 8 – Procedimento pós-centrifugação das amostras; (a) falcon com as três fases (gordura, solução tampão e sedimento; (b) falcon com sedimento após descarte do sobrenadante; (c) falcon com sedimento homogeneizado com sulfato de zinco 33% frasco com 100mL de sedimento.....	47
Figura 9 – Procedimento para visualização dos ovos de helmintos no microscópio óptico. (a) placas de McMaster; (b) placas de McMaster com sedimento homogeneizado com sulfato de zinco 33%. ....	48
Figura 10 – (a) e (b) oocisto de <i>Cryptosporidium</i> sp visualizado com aumento de 1000x microscópio óptico. ....	54
Figura 11 – FP50 de lançamento de água residual do prédio 36. (a) tubulação de passagem de água residual do prédio 36 até a FP50. (b) vegetação local da área de coleta das macrófitas.....	56
Figura 12 – Local com macrófitas. (a) macrófitas próximas ao local de coleta. (b) <i>Typha domingensis</i> coletadas para análise do sedimento da rizosfera. ....	56
Figura 13 – (a) rizoma de um exemplar de <i>Typha domingensis</i> (b) rizoma submerso em solução contendo água da torneira homogeneizada com 10mL de tween 80. ....	57
Figura 14 – (a) retirada de sedimentos da rizosfera da <i>Typha domingensis</i> (b) rizoma limpo depois da escovação.....	58
Figura 15 – Processo de filtração de sedimento. (a) balde com 10% de sedimento; (b) gaze sobre o funil acoplado em um Erlenmeyer para filtra a amostra do sedimento. ....	59
Figura 16 – Processo de filtração de sedimento. (c) sedimento retido após a primeira filtragem; (d) processo de repetições de filtragem. ....	59
Figura 17 – Fluxograma do Método Rodrigues & Wolff .....	64

Figura 18 – Oocisto de *Giardia* sp. presente na análise de sedimento da rizosfera do rizoma da *Typha domingensis* indicados pelas flechas. .... 66

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tamanho, densidade e velocidade de sedimentação de algumas espécies de ovos de helmintos.....	43
Tabela 2 – Valore médios da concentração de ovos de helmintos nas amostras das duas FPS 35 e 50 respectivamente. ....	52
Tabela 3 – Resultados do número de ovos encontrados na rizosfera do rizoma da planta <i>Typha domingensis</i> . ....	65
Tabela 4 – Resultados da presença de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> sp. e <i>Giardia</i> sp. nas análises da rizosfera do rizoma da <i>Typha domingensis</i> .....	67

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANA	Agência Nacional de Águas
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
EPA	Agência de Proteção ambiental
FDA	Food and Drug Administration
FP	Fonte pontual
L	Litro
M	Metro
n	Número
NBR	Norma Brasileira de regulamentação técnica
OMS	Organização Mundial de Saúde
PLANSAB	Plano Nacional de Saneamento Básico
PNAD	Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílio
UFES	Universidade Federal de Santa Maria
SNIS	Sistema Nacional de Informação Sobre Saneamento Básico

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>1 OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
1.1 Objetivo geral.....	18
1.2 Objetivos específicos.....	18
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>19</b>
2.1 Saneamento básico.....	19
2.2 Sistemas de tratamento com filtros plantados com macrófitas.....	20
2.3 <i>Wetlands</i> naturais.....	22
2.4 Remoção de ovos de helmintos em sistemas convencionais de tratamento .....	24
2.5 Helmintos.....	27
2.5.1 Remoção de ovos de helmintos em sistemas de escoamento superficial no solo .....	29
2.6 Protozoários .....	31
2.7 Metodologias para identificação e enumeração de ovos de helmintos.....	33
2.7.1 Métodos para enumeração de ovos de helmintos .....	35
2.7.2 Considerações em relação ao método de BAILENGER modificado .....	37
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
3.1 Caracterização da área de estudo .....	39
3.2 - 1ª Fase da pesquisa .....	40
3.2.1 Amostragem .....	40
3.2.2 Pontos de coleta .....	40
3.3 Enumeração de ovos de helmintos .....	42
3.3.1 Fundamento da metodologia .....	42
3.3.2 Preparação de soluções.....	43
3.3.3 Procedimentos para enumeração dos ovos de helmintos.....	43
3.3.4 Expressão de resultados.....	45
3.3.5 Procedimento para enumeração de ovos de helmintos.....	46
3.4 Técnica para detectar oocistos de <i>Cryptosporidium</i> sp.....	48
3.4.1 A técnica de Ziehl-Neelsen.....	48
3.5 Método para detectar oocisto de <i>Giardia</i> sp.....	49
3.5.1 Método de Willis-Mollay (1921).....	49
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>51</b>
4.1 Resultados da 1ª fase para a presença e enumeração de ovos de helmintos .....	51
4.1.1 Resultado da presença de oocisto de <i>Cryptosporidium</i> sp. e <i>Giardia</i> sp. ....	54
4.2 - 2ª fase método Rodrigues & Wolff.....	56
4.2.1 Coleta da macrófita <i>Typha domingensis</i> .....	56
4.2.2 Desenvolvimento do método Rodrigues & Wolff.....	57
4.3 Método Rodrigues & Wolff .....	60

4.3.1 Preliminares .....	60
4.3.2 Equipamentos, materiais e reagentes.....	61
4.3.3 Procedimento para enumeração dos ovos de helmintos .....	61
4.3.4 Fluxograma da metodologia Rodrigues & Wolff.....	63
4.3.5 Resultados para ovos de Helmintos no rizoma da <i>Typha dominigensis</i> .....	64
4.3.6 Resultados da Presença de Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> sp. e <i>Giárdia</i> sp. ....	66
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>68</b>
<b>RECOMENDAÇÕES.....</b>	<b>69</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>70</b>

## INTRODUÇÃO

As atividades antrópicas sobre o meio ambiente nas últimas décadas tornaram-se preocupante com os impactos negativos decorrentes. Pode-se perceber a perturbação que o homem causa ao modificar ou destruir um ecossistema, interrompendo o equilíbrio biológico. Suportam-se cada vez menos os problemas ambientais que interferem na qualidade de vida, especialmente a poluição dos corpos d'água, devido ao lançamento e acúmulo de efluentes industriais e esgotos domésticos sem tratamento.

A Pesquisa Nacional de Saneamento Básico (PNSB 2008), mostra que apenas 44% dos 57,7 milhões de domicílios do País (dados da Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios de 2008) tinham acesso à rede geral de esgoto em 2008 segundo dados do IBGE (2010).

A Lei 11.445 de 2007, que dispõe sobre diretrizes nacionais para o saneamento básico, determina que todas as cidades devam elaborar seus respectivos planos municipais. No entanto, 4.060 municípios (73%), em 2010, ainda não aprovaram normas neste sentido, para qualquer um dos serviços de saneamento básico segundo a pesquisa divulgada pelo IBGE (2010).

A falta de tratamento de esgoto tem consequências graves para a saúde pública do país. “Nos dejetos há diversos organismos patogênicos, como bactérias, vírus, protozoários e vermes, que causam uma série de doenças”, segundo Von Sperling (2005). Ainda que o tratamento da água seja realizado corretamente, há outros usos dos recursos hídricos que podem disseminar doenças. “Se a pessoa nadar em um rio sujo, comer alimentos lavados ou irrigados com água contaminada, ela pode ser infectada” (Von SPERLING 2005).

Estudos afirmam que as parasitoses intestinais são ainda um grave problema na saúde pública por seu alto índice de prevalência segundo Espinoza et al. (2012).

Em relação aos fatores de exposição às parasitoses, pode-se mencionar a falta de higiene. A infância é uma fase mais susceptível em adquirir os parasitas porque as crianças possuem maior contato com meios contaminados, falta de consciência de cuidados com a higiene pessoal e dos alimentos e ainda o sistema imunológico que está em formação (NEVES, 2011).

A transmissão das parasitoses ocorre na maioria das vezes por via oral, por meio da ingestão de hortaliças, legumes e frutas contaminadas (CUNHA & AMICHI, 2014).



Segundo o estudo do Instituto Trata Brasil, foram notificadas 340 mil internações por infecções gastrointestinais no Brasil em 2013, destas, mais de 170 mil foram de crianças de até 14 anos de idade. A pesquisa aponta que a universalização do saneamento traria uma economia anual de 27,3 milhões de reais para os cofres públicos apenas com as internações.

De acordo com Von Sperling (2005) o esgoto doméstico contém aproximadamente 99,9% de água e 0,1% de sólidos orgânicos e inorgânicos, suspensos e dissolvidos, bem como microrganismos patogênicos ou não o que torna necessário realizar tratamento no esgoto.

Por ser comum a presença de microrganismos patogênicos em esgoto, cada vez mais buscam-se novas e eficientes alternativas para a remoção dos mesmos. Essas alternativas devem, além de retirar esses organismos nocivos ao homem, apresentar baixo custo de implantação e baixo impacto ambiental.

Neste contexto, sistemas naturais de tratamento de efluentes se apresentam como tecnologias interessantes, como por exemplo, sistemas de terras alagadas (*wetlands*) ou banhados naturais, ou ainda os *wetlands* construídos (filtros plantados com macrófitas). Um estudo realizado por Sezerino e Philippi (2000), com um sistema de tratamento composto de Tanque Séptico seguido por filtros plantados com macrófitas indica uma eficiência de remoção de 87% da matéria orgânica e de 99,96% de coliformes totais o qual, segundo Bird (2004) este sistema de tratamento de efluentes domésticos além de tecnologicamente avançados possuem baixo custo de implantação.

A degradação dos recursos naturais, em função do processo histórico de ocupação do Campus da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) tem chamado atenção de pesquisadores e gestores da instituição. Segundo Reckziegel (2012) não era previsto o crescimento contínuo e acelerado da comunidade do campus, por tanto os sistemas de tratamento de efluentes não estão adaptados para essa crescente demanda de lançamentos de águas residuais.

Conforme verificado por Marion (2009) o sistema de esgotamento sanitário da UFSM é subdividido em duas grandes redes de coleta principais. Tais redes atendem a grande parte da Cidade Universitária e apenas alguns prédios isolados não estão ligados a ela, possuindo suas redes individuais e contando com estações de tratamento constituídas por tanque séptico e filtro anaeróbio e/ou sumidouro.

A área estudada neste trabalho constitui-se de efluentes líquidos provenientes de prédios no campus como é o caso da FP33 e da FP-50 (numeração dada as fontes pontuais), encontrada no final do mês de maio de 2012, após a última campanha de amostragem estudada por Reckziegel (2012), nesta mesma área.

Para Araújo (2013) essa fonte pontual não é apresentada na planta digital do Campus da UFSM e está localizada à direita das demais fontes, atrás de uma garagem de carros de funcionários da UFSM, onde também há espaço para armazenagem de ferramentas e materiais diversos. A FP-50 é composta por duas tubulações de 100,0 mm de diâmetro dispostas em paralelo, que lançam efluentes a 50,0 metros do provável ponto de origem (prédio 36 da Casa do Estudante) diretamente no solo. É uma área aberta, úmida, com cobertura vegetal rasteira, pequenos arbustos e grande quantidade de macrófitas, incluindo a taboa (*Typha* sp).

O crescimento da população acadêmica faz com que seja necessário um desenvolvimento de uma infraestrutura que acompanhe esse aumento populacional, mas que não foi possível até os dias de hoje. Desta forma, os sistemas de tratamento de efluentes existentes apresentam-se subdimensionados e obsoletos à realidade do consumo de água e da produção de efluentes líquidos do campus.

Autores como Angnes (2004), Moreira (2005), D'Ávila (2009), Reckziegel (2012) e Araújo (2013) em seus estudos relatam que o solo e as águas superficiais e subterrâneas do Campus da UFSM enfrentam perdas significativas de qualidade, reflexo este que é perceptível pelo seu aspecto visual e da formação de gases que proporcionam maus odores.

D'Ávila (2009) já indicava a necessidade de atenção especial aos locais de lançamento de efluentes no solo, pela possibilidade de proliferação de organismos nocivos à saúde e pelo alto potencial para a poluição da água subterrânea no Campus da UFSM.

A partir do modelo conceitual de poluição desenvolvido por Reckziegel (2012) para esta área de lançamento de efluentes, e da dinâmica da contaminação estudada por (ARAÚJO, 2013), observou-se que nas áreas, coberta por macrófitas, ocorre uma remoção de matéria orgânica e coliformes termotolerantes.

No entanto, como as águas residuais domésticas são também constituídas por diferentes organismos patogênicos, como helmintos e protozoários, torna-se importante investigar o papel das macrófitas na retenção de ovos de helmintos e oocistos de protozoários.

Assim, neste estudo foi desenvolvido uma adaptação de um método aplicado para outros tipos de material orgânico, na rizosfera da *T. domingensis*, Método este, não aplicado anteriormente em plantas, tornando assim a pesquisa importante para futuros estudos, servindo de base obtenção de dados nesta área da microbiologia de águas residuais.

# 1 OBJETIVOS

## 1.1 Objetivo geral

Desenvolver uma metodologia para verificar a presença de ovos de helmintos e oocistos de protozoários na rizosfera da *Typha domingensis* em ambiente natural, com lançamento de efluentes sanitários.

## 1.2 Objetivos específicos

- Verificar e quantificar ovos de helmintos e oocistos de protozoários nas fontes pontuais;
- Desenvolver uma metodologia para detectar a presença e enumerar ovos de helmintos da rizosfera da macrófita *Typha domingensis*;
- Adaptar metodologia para sedimentar oocistos de protozoários;
- Padronizar etapas de um método de detecção de ovos de helmintos na rizosfera da planta;

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Saneamento básico

O Brasil possui quatro serviços básicos de saneamento, o primeiro é o abastecimento de água potável, o segundo é o esgotamento sanitário, gestão de recursos vem como terceiro e o manejo das águas pluviais como o quarto serviço oferecido no país (SANTONI, 2010).

O tratamento do esgoto doméstico que é realizado através das coletas, transporte, tratamento e disposição final, existem para evitar a possibilidade de contato de humano, com águas de abastecimentos e até mesmo alimentos aos dejetos que são lançados no esgoto (RIBEIRO & ROOKE, 2010).

Segundo os dados do sistema Nacional de Informações sobre Saneamento Básico (SNIS) do Ministério das cidades com referências em 2010, apenas cinco das cem maiores cidades brasileiras são contempladas com a coleta de esgoto. Outro dado relatado é que destas cem maiores cidades, o tratamento do esgoto não chega a todos os domicílios. Estes dados expressos em porcentagem mostram que 54% da população brasileira não possuem coleta de esgoto, 38% somente usufruem do tratamento desse esgoto. Outro dado interessante ligado ao saneamento básico brasileiro é o da água encanada que deveria chegar a toda população, mas que somente 81% são abastecidas e ainda existe uma perda desta água no sistema, causada por vazamentos e ligações irregulares de 36% conforme dados do Instituto Trata Brasil (2014).

Dados do Censo Demográfico de 2010 apontam que aproximadamente metade da população do País dispõe esgotos domésticos em rede coletora de esgotos ou de águas pluviais (IBGE, 2010).

Sobre o volume de esgotos sanitários coletados e tratados pelos serviços públicos, conforme já mencionado anteriormente, dados da PNSB 2008 diferem em 1%, permitindo inferir que somente 53% dos esgotos coletados no País são tratados. É interessante observar que essa proporção é menor no Sudeste (46%), seguida pelo Sul, Norte e Nordeste (respectivamente, 59, 62 e 66%) e apresenta melhor desempenho no Centro-Oeste, com 90% dos esgotos coletados recebendo tratamento. Salienta-se que não é considerado nesses valores o volume de esgotos das redes coletoras clandestinas, não operadas por prestadores

autorizados pelo Poder Público municipal, e o lançado in natura no ambiente. Ademais, as bases de dados disponíveis não permitem identificar os níveis de tratamento de esgotos aplicados, informação fundamental, dado seu rebatimento não só na saúde pública, mas também na qualidade da água dos corpos receptores para usos como o próprio abastecimento humano segundo o Plano Nacional de Saneamento Básico- PLANSAB –(2013).

O saneamento brasileiro de acordo com a pesquisa Nacional por amostra de domicílios de 2009 – PNAD (2009) durante os anos de 1995 a 2009 andou em um ritmo lento. A coleta de esgoto aumentou apenas 11,6 pontos percentuais e durante os anos de 2003 a 2009 fora somente 04 pontos.

O esgoto antes de ser tratado possui diversos macro e microrganismos que podem ser patogênicos para animais, plantas e humanos. Para a remoção destes organismos possíveis de transmissão de doenças é preciso um tratamento adequando com cuidados. Daí vem a grande dificuldade em dar a esse esgoto um tratamento e um destino adequado que tenha um custo baixo, mínimo impacto ambiental e de total eficiência na remoção desses organismos, onde possa diminuir consideravelmente o contágio. Muitos países estão com essa dificuldade e investindo cada vez mais em pesquisas que possam melhorar esses tratamentos, inclusive o Brasil (PAULINO et al., 2001).

As macrófitas vem sendo cada vez mais utilizados, por demonstrarem, em períodos longos de estudo, a sua eficiência na remoção e interceptação dos microrganismos patogênicos em águas residuais. Há muitos registros na literatura, de estudos e experiências sobre a utilização de *wetlands* construídas para remoção de substâncias indesejáveis presentes tanto em efluentes domésticos, como em efluentes industriais (SALATI et al., 1999). Os resultados destas experiências são bastante variados e são dependentes diretamente da característica do efluente a ser tratado, da carga aplicada ao sistema, e também do tipo de sistema utilizado (SALATI et al. 1999).

## **2.2 Sistemas de tratamento com filtros plantados com macrófitas**

Sistemas de tratamento aquático são Wetlands (terras úmidas) construídos ou naturais com sistemas de plantas aquáticas. Na primeira metade do século XX segundo Metcalf e Eddy (2004) esses sistemas naturais passaram a serem utilizados para tratamento de águas residuais. O sucesso já foi comprovado pelo seu histórico, pois os primeiros estudos sobre

esses sistemas iniciaram-se na Europa na década de 1950 e nos Estados Unidos em 1960 (EPA, 1999) aumentando as pesquisas entre 1970 e 1980. No Brasil, a utilização desses sistemas vem sendo difundida lentamente, e estudada por diversas instituições de pesquisa.

A aplicação desta tecnologia no Brasil é favorecida pelo clima tropical onde melhora o desempenho dos microrganismos responsáveis pela despoluição das águas residuais, tornando a eficiente o substrato-microrganismo-plantas (SILVESTE E PEDRO-DE-JESUS, 2002).

As macrófitas aquáticas emergentes mais frequentemente utilizadas são: *Typha spp*, *Phragmites*, *Juncus ingens* e *Schoenoplectus validus*.

A *Typha domingensis* é uma espécie rizomatosa, com uma raiz principal, predominando por um período curto de tempo, prevalecendo um sistema radícula, com raízes adventícias originadas do caule, formando uma raiz fasciculada que está presente em vários locais no Brasil (Figura 1). Para Irgang (1999) a espécie é dominante na área onde está inserida, em relação a outras espécies de macrófitas aquáticas, mas pode conviver normalmente.



Figura 1 – Rizoma da *Typha domingensis*.

Do gênero cosmopolitano de quinze espécies de plantas monocotiledôneas da família Typhaceae, a *Typha dominigensis* é a que apresenta uma larga distribuição e pode ser encontrada em áreas úmidas, margens, águas doces e salgadas, e de fácil tolerância a água salobra (CARDAZZO & SEELINGER, 1995).

Segundo Esteves (2011), as macrófitas aquáticas influenciam ecossistemas aquáticos de diversas formas e determinam sua estrutura e funcionamento. Essas plantas alteram a

estrutura espacial desses ecossistemas pelo aumento da complexidade espacial dos habitats. Essa função seria desempenhada mesmo por outras estruturas inertes, como rochas e galhos. Porém, por serem extremamente dinâmicas, as macrófitas aquáticas representam estruturas que mudam os habitats continuamente ao longo do tempo.

Além de crescerem rápido e de serem de fácil cultivo, a sua diversidade ecológica, que ocorre na rizosfera é capaz de aumentar a sua capacidade de purificação da água, por promoverem várias reações tanto químicas como biológicas segundo Hadad et al. (2006).

Sabe-se que plantas acumulam metais pesados em seus tecidos vegetais, podendo, dessa forma, serem utilizadas com sucesso na técnica de fitorremediação (SALT et al., 1998).

Diversos autores utilizam a macrófita aquática *Typha domingensis* em filtros plantados com macrófitas para o tratamento avançado de efluentes líquidos. O único problema associado à fitorremediação é o longo tempo necessário para a descontaminação do solo ou da água. As plantas primeiramente solubilizam o contaminante na rizosfera para depois ser transportado para as partes aéreas. Em geral as plantas crescem naturalmente (BROOKS, 1998). Entretanto a absorção pode ser igualmente significativa pelas folhas (VARDANYAN & INGOLE, 2006).

Análises fitoquímicas foram realizadas com rizoma da *Typha domingensis*, onde revelaram a presença de catequinas, flavanonas, flavonas, flavononóis, xantonas e taninos flobabênicos (taninos condensados), este último muito importante devido o seu papel de ligação com as proteínas, onde ocorre, provavelmente, pela formação de pontes de hidrogênio entre os grupos fenólicos dos taninos e determinados sítios das proteínas, conferindo uma duradoura estabilidade a estas substâncias. Ao precipitar proteínas, os taninos propiciam um efeito antimicrobiano e antifúngico (MONTEIRO et al., 2005). Efeito que poderá agir na fauna microbiana presente no biofilme da rizosfera, diminuindo assim parasitas patogênicos, como os estudados nesse trabalho.

### **2.3 Wetlands naturais**

Segundo Tiner (1999), *Wetland* é um termo genérico utilizado para definir um universo de habitats úmidos que são conhecidos sob diversas denominações como: pântanos, brejos, zonas alagadiças, charcos, manguezais, e áreas similares. Estas áreas estão sujeitas a inundações periódicas, ou permanentes, que mantém o solo suficientemente saturado de forma

a permitir o estabelecimento de plantas macrófitas e o desenvolvimento de solos hidromórficos. Algumas *wetlands* estão entre os maiores sistemas naturais produtivos da terra e são de vital importância para a manutenção da biodiversidade do planeta (ANJOS, 2003).

A definição de *Wetlands* naturais já foi dada por diversos autores, onde em 1890, no *USGS-United States Geological Survey* foi publicada a primeira definição por Nathaniel Shaler, que as denominava como solos inundados. Até a década de 90, vários autores definiram de maneiras diferentes o termo *wetlands* naturais. De acordo com Cowardin et al (1979), estes eram ecossistemas de transição entre sistemas aquáticos e terrestres, onde era periodicamente o habitat de plantas aquáticas. Já Junk (1988) afirmava que eram ecossistemas sujeitos a alagamentos periódicos, de curta ou longa duração, as quais selecionam a adaptação de organismos e comunidades ali existentes.

Porém alguns autores afirmam que não existe uma definição única para o termo. De acordo com Mistch & Gosselink (1993), as *wetlands* existem em condições hidrológicas amplas, e numa grande variedade de tamanhos, localidades e influências antrópicas. Por fim, em 1998 um grupo de cientistas representando 90 países estabeleceu uma definição mais ampla para estes ecossistemas, denominada *Ramsar Wetland definitions*.

A Convenção de Ramsar ou Convenção sobre zonas úmidas é um tratado intergovernamental, assinado em 1971 na cidade de Ramsar no Irã, que tem como objetivo, promover e estimular a conservação e o uso racional de zonas úmidas em todo o mundo. Segundo a Convenção de Ramsar são consideradas zonas úmidas “toda extensão de pântanos, charcos e turfas ou superfícies cobertas de água, de regime natural ou artificial, permanentes ou temporárias, com água parada ou corrente, doce, salobra ou salina. As áreas marinhas são consideradas também como zonas úmidas desde que sua profundidade não exceda os seis metros. Também ficou estabelecido que essas zonas úmidas também abrangessem áreas ribeirinhas ou costeiras adjacentes, assim como as ilhas ou extensões de áreas marinhas de uma profundidade superior aos seis metros na maré baixa. Como resultado desta convenção, as zonas úmidas se estendem a uma ampla variedade de ecossistemas aquáticos, incluindo rios, zonas costeiras/marinhas e zonas úmidas artificiais, como lagos, represas ou açudes (THE RAMSAR CONVENTION, 1971).

Contudo, o que interessa para a engenharia sanitária e ambiental, é que dentre as diversas funções exercidas pelas *wetlands*, elas tem a capacidade de tratar e melhorar a qualidade das águas, através de processos biológicos e físico-químicos, além de participarem dos ciclos biogeoquímicos, por meio da transformação do nitrogênio e do fósforo (RICHARDSON, 1996). Portanto, estes sistemas têm importante papel no aprisionamento e



reprocessamento de nutrientes e contaminantes, se certas condições forem mantidas, podendo assim funcionar como um sistema depurador, reciclando elementos e tratando cargas poluentes.

Segundo Brix (1993), o alto potencial em acumular e transformar materiais orgânicos e nutrientes é devido à ação de variadas populações de microrganismos que são de particular importância na remoção da DBO. Em termos de reuso para agricultura, as condições de baixa velocidade e longo tempo de detenção da água levam a sedimentação de partículas sólidas o que inclui microrganismos causadores de doenças.

Em vista deste fato vantajoso, o emprego de *wetlands* naturais ou construídas estão se tornando uma tecnologia global para o controle da poluição das águas. Levantamentos indicam que mais de 6000 *wetlands* construídas estão tratando efluentes domésticos e industriais na Europa. Nos países em desenvolvimento como o Brasil, a utilização desta tecnologia aos poucos vem ganhando espaço para tratamento e controle da poluição (KNIGHT & KADLEC, 2000).

## **2.4 Remoção de ovos de helmintos em sistemas convencionais de tratamento**

Os sistemas de tratamento de esgotos sanitários foram originalmente concebidos para remover matéria orgânica e sólidos. Posteriormente, surgiu a preocupação em reduzir outros constituintes, como nutrientes e organismos patogênicos (FEACHEM et al., 1983). Vários processos biológicos têm sido estudados para determinar a efetividade na inativação dos parasitos provenientes de água residuária domésticas. A eficiência de sistemas de tratamento convencionais na remoção de ovos de helmintos varia consideravelmente, dependendo da unidade de processo incluída no sistema de tratamento e das espécies de ovos de helmintos presentes no esgoto.

O conhecimento dos fatores que interferem na mortalidade de ovos de helmintos em processos de tratamento de esgotos é importante, no sentido de se poderem propor medidas que tornem tais processos mais eficientes, com repercussões positivas sobre a saúde da população. As causas mais citadas como responsáveis pela remoção de parasitos em processos anaeróbios são (GASI et al., 1993):

- temperatura;
- tempo de detenção;

- efeito da sedimentação;
- morte natural em ambiente anaeróbio.

Os ovos de helmintos são amplamente removidos pela sedimentação, onde o efeito de um sistema de tratamento convencional é simplesmente a transferência dos ovos de helmintos do efluente para a parte sólida – lodo (FEACHEM et al., 1983). Por essa razão, a percentagem de remoção citada nos processos de tratamento de águas residuárias não é um indicador real da destruição dos parasitos, uma vez que uma grande parcela desses ovos de helmintos continuam ainda presentes no lodo.

Quando se estuda a remoção de parasitos em unidades de tratamentos de esgotos, deve-se preferencialmente referir à sobrevivência dos mesmos ao sistema empregado. Dependendo do sistema de tratamento, podem ser esperados diferentes tempos de sobrevivência para os diversos grupos de patógenos. Por exemplo, cistos de protozoários podem ser encontrados em pequenas concentrações no lodo bruto e não sobrevivem ao processo de digestão; por outro lado, os ovos de *Ascaris* podem ser encontrados em elevadas quantidades nos lodos e sobrevivem à maioria dos processos de tratamento de lodos (FEACHEM et al., 1983).

Processos de tratamento convencionais de águas residuárias domésticas podem não ser totalmente efetivos na ativação ou inativação dos parasitos (REIMERS et al., 1981, citado por HINDIYEH, 1995). Estudos têm mostrado que os filtros biológicos, filtros de areia e lodos ativados promovem o embrionamento dos ovos, a exemplo de *Ascaris*, *Necator* e *Ancylostoma* (CRAM, 1943; NEWTON et al., 1949; SILVERMAN & GRIFFITHS, 1955, citados por HINDIYEH, 1995). Os efeitos dos processos de tratamento de águas residuais sobre os ovos de helmintos e alguns cistos de protozoários são mostrados no Quadro 1.

	<b>Unidade</b>	<b>Eficiência</b>
<b>Processo de remoção (não destroem o parasito)</b>	Filtração Reator UASB	Retém 99% dos ovos Remoção de 70 a 99% (incorporação ao lodo; a remoção depende das condições de operação).
<b>Processos de estabilização (afetam o estágio dos ovos)</b>	Lodos ativados convencional  Aeração prolongada	Promovem o desenvolvimento dos ovos  Promovem o desenvolvimento dos ovos
<b>Processos de desinfecção</b>	Cloração	Não tem efeito

Quadro 1 – Eficiência de alguns processos de tratamento de esgotos sobre ovos de helmintos e cistos de protozoários

Fonte: Adaptado de REIMERS *et al.* (1981), citado por HINDIYEH (1995)

## 2.5 Helmintos

Os helmintos ou vermes constituem um grupo muito numeroso, com espécies de vida livre e espécies parasitas, sendo os representantes desse grupo distribuídos em três filios:

- Platyhelminthes (vermes achatados dorsoventralmente);
- Aschelminthes (vermes com o corpo em geral de forma cilíndrica);
- Acanthocephala (vermes com o corpo cilíndrico ou ligeiramente comprimido lateralmente).

Dentre esses filios, é de interesse para o presente trabalho o filo Aschelminthes, notadamente a classe Nematoda, sendo abordadas apenas as espécies *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e ancilostomídeos (*Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus* e *Ancylostoma ceylanicum*).

Os helmintos intestinais, durante a fase parasitária, vivem no trato gastrointestinal do hospedeiro (homem e/ou animal), e seus ovos chegam ao ambiente juntamente com as fezes.

As ocorrências no homem são muito comuns, causando infecções que resultam em danos para o hospedeiro. O grau de infecção e a natureza do parasito têm papel importante na patogenicidade causada no hospedeiro. A capacidade patogênica é variável, podendo-se distinguir: agentes patogênicos estritos (são frequentemente responsáveis por afecções) e agentes patogênicos oportunistas (induzem a doença em caso de diminuição de imunidade do hospedeiro).

No caso do homem, particularmente, influem no parasitismo os seguintes aspectos principais (REY, 1991):

- hábitos higiênicos, comportamento, educação e grau de informação;
- estado nutricional e imunológico;
- condições que o cercam;
- política sanitária adotada por seus dirigentes.

Nem todos os helmintos apresentam interesse médico e apenas alguns grupos apresentam uma relação epidemiológica de importância capital no saneamento. Os nematóides *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura*, e em especial os geo-helmintos que são os parasitos transmitidos por solos contaminados por larvas de *Necator americanus*, *Ancylostoma duodenale* e *Strongyloides stercoralis*, conferem maior interesse no contexto desse estudo, pelo fato dos ovos e larvas desses parasitos, possuírem um período de

embrionamento e de latência no solo, antes de atingirem o hospedeiro. Dependendo do ciclo biológico ou da rota de transmissão de cada parasito, a contaminação ocorre através da ingestão de ovos contendo a larva infectiva ou pela penetração de larvas através da pele do hospedeiro. A transmissão ocorre na maioria das vezes, através de vários veículos, especialmente pela ingestão de alimentos, água, mãos sujas, poeiras e solos contaminados.

Os principais nematóides de interesse sanitário estão classificados na categoria III (FEACHEM et al. 1983) que compreende os parasitos que não necessitam de hospedeiro intermediário, tendo como representantes dessa categoria as espécies *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e *ancilostomídeos* (*Necator americanus* e *Ancylostoma duodenale*). Além dos helmintos da categoria III, são também considerados helmintos de interesse sanitário os enquadrados na categoria IV e V. A categoria IV compreende os parasitos que necessitam de hospedeiro intermediário (suínos e bovinos), sendo os representantes desta categoria as espécies *Taenia solium* e *Taenia saginata*. Os parasitos que se enquadram na categoria V necessitam de um hospedeiro intermediário aquático (moluscos), tendo como representante o gênero *Schistosoma*.

Os parasitos geralmente apresentam especificidade do hospedeiro e podem ser representados esquematicamente como (SOCCOL, 1999):

- específicos para um hospedeiro no caso de parasitos monoxênicos (necessitam de apenas um hospedeiro para completar o ciclo biológico), como *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, que são infectantes apenas para o homem;
- específicos para os hospedeiros intermediários no caso de parasitos heteroxênicos (precisam de mais de um hospedeiro para completar o ciclo biológico). Neste caso, o risco direto é para o hospedeiro intermediário, mas, na sequência, representam risco para o hospedeiro definitivo. Exemplo disso é o ovo de *Taenia sp.*, que é infectante para bovinos e suínos (hospedeiros intermediários) num primeiro instante, porém, se o homem (hospedeiro definitivo), ingerir carne infectada destes animais vai desenvolver o parasito adulto no intestino. No caso de *Taenia solium*, o homem pode ser tanto hospedeiro intermediário como hospedeiro definitivo. Para ser hospedeiro intermediário ele deve ingerir ovos de *Taenia solium* (através de verduras, frutas, mãos e água contaminadas com ovos), enquanto que para ser hospedeiro definitivo ele deve ingerir carne de suíno contendo *Cysticercos cellulosae*;
- hospedeiros acidentais quando certos parasitos de animais, como por exemplo (*Toxocara canis*), que parasitam habitualmente os cães. No entanto, o homem, ao

ingerir ovos larvados destes parasitos, será hospedeiro acidental, uma vez que a evolução do ciclo é abortiva. Porém o início do ciclo, no homem, pode ter repercussão patológica grave, conhecida como larva migrans visceral.

Para cada helmintose, os riscos de infecção humana dependem das relações ecológicas que se estabelecem em cada caso, podendo variar de lugar para lugar, ou periodicamente no mesmo lugar. Evidentemente, há uma variabilidade na taxa de infecção nas respectivas populações.

Entre os fatores de maior importância para a distribuição e a prevalência das helmintoses encontram-se (REY, 1991; NEVES et al., 2000):

- características genéticas e fenotípicas, particularmente quanto à suscetibilidade e resistência às infecções;
- condições ambientais (temperatura, umidade e altitude favoráveis);
- os hospedeiros intermediários e os definitivos desses parasitos;
- presença de hospedeiros suscetíveis apropriados;
- sua distribuição geográfica;
- potencial biótico elevado;
- migrações humanas;
- densidade.

Além disso, hábitos religiosos, falta de conhecimento e baixas condições de vida favorecem a disseminação e podem elevar a prevalência das parasitoses em determinadas regiões. A maioria das parasitoses é ao mesmo tempo causa e consequência do subdesenvolvimento, não sendo possível dissociar a doença da subalimentação, da pobreza, e vice-versa. Portanto, a importância de um agente biológico como causador de doença está intimamente ligada ao status social do ambiente em que vive; e, para que permaneça estável numa população, há necessidade de que a mesma seja subdesenvolvida (NEVES et al. 2000).

### 2.5.1 Remoção de ovos de helmintos em sistemas de escoamento superficial no solo

Dentre os mecanismos atuantes na remoção de microrganismos em sistemas de tratamento por escoamento superficial no solo destacam-se (USEPA, 1981; PAGANINI, 1997):

- exposição dos microrganismos a condições ambientais adversas, como teor de umidade do solo, temperatura, pH e insolação;
- filtração física através do biofilme formado sobre o solo e o caule das plantas;
- dessecação durante os períodos secos;
- adsorção às partículas do solo;
- sedimentação;
- predação.

No escoamento superficial, o tratamento ocorre principalmente na interface do colo das plantas e na superfície do solo, onde se forma uma película biologicamente ativa. A percolação dos esgotos através do colo da planta propicia a formação de um filme biológico de aspecto gelatinoso, mantendo os organismos em equilíbrio suficiente para transformar as substâncias coloidais e dissolvidas (PAGANINI, 1997; CHERNICHARO & ZERBINI, 2001; ZERBINI & CHERNICHARO, 2001).

A substância gelatinosa é povoada por um grande número de espécies de bactérias, fungos, algas, protozoários, ovos e larvas de helmintos, e outros microrganismos em menor quantidade. A composição microbiana varia com a espessura da lâmina de esgotos, com a característica do esgoto e com as estações do ano. Fungos, por exemplo, podem ser observados na superfície da lâmina, enquanto microrganismos nitrificadores são encontrados nas zonas mais profundas da mesma (PAGANINI, 1997; CHERNICHARO & ZERBINI, 2001; ZERBINI & CHERNICHARO, 2001).

Os microrganismos presentes no biofilme possuem uma relação à predação biológica, as relações entre os parasitos e outros organismos vivos, tais como os fungos que atacam ovos e larvas de nematóides, os predadores das fases de vida livre, assim como os transportadores e disseminadores de ovos (minhocas, moscas e insetos coprófagos, moluscos, aves etc.), interferem de uma forma ou de outra sobre a biologia e a ecologia de muitos dos nematóides de importância médica ou veterinária.

Um fator determinante na eficiência da remoção de microrganismos dos esgotos é o tempo durante o qual ocorre a ação biológica no solo. Quanto maior for o tempo que o esgoto permanecer sob ação biológica do solo, maior será a eficiência de remoção dos microrganismos, ou seja, uma menor velocidade de percolação ou escoamento pelo solo é benéfica do ponto de vista de remoção de microrganismos.

Devido às suas dimensões relativamente maiores, os protozoários e os ovos de helmintos são removidos primeiramente por filtração física e pela atividade microbiológica na

primeira camada orgânica. As bactérias também podem ser removidas por filtração, entretanto a sua adsorção às partículas de solo e a ação biológica de predação e competição são os mecanismos mais importantes (USEPA, 1981, citado por PAGANINI, 1997).

A ação biológica é particularmente efetiva nas camadas orgânicas superficiais do solo, onde a presença de oxigênio propicia o desenvolvimento dos processos aeróbios, mais intensivos que os anaeróbios, e onde a disponibilidade de alimentos possibilita a existência de uma população maior e mais diversificada de microrganismos. Estima-se que esse mecanismo represente cerca de 92 a 97% da remoção total dos microrganismos nos sistemas de disposição no solo, já que é nesta primeira camada superficial, de cerca de 1 a 1,5 cm de espessura, que a dessecação, a radiação e a temperatura atuam de maneira mais efetiva (PAGANINI, 1997).

Essa remoção, para ser efetiva, depende de diversos fatores e, mesmo que se obtenha bons resultados, não significa a eliminação dos riscos à saúde pública de uma forma geral, pois os microrganismos estarão retidos no solo, ou percorrendo os lençóis subterrâneos e os corpos de água superficiais. Embora os cistos de protozoários e ovos de helmintos representem um grande risco sanitário, além de poderem sobreviver por meses e até anos no meio ambiente, não existem evidências conclusivas registradas que venham correlacioná-los a problemas com sistemas de disposição no solo, desde que resguardados cuidados operacionais (PAGANINI, 1997).

## 2.6 Protozoários

Em diversas regiões do mundo ocorreram surtos de diarreia em seres humanos. Estão envolvidos nestes surtos os protozoários *Cryptosporidium* spp. e *Giardia lamblia*, que são transmissíveis através da água (DUBEY et al., 2003; SMITH & ROSE, 1998).

Na última década alguns protozoários que causam doenças e que vivem na água, estão ganhando maior destaque. Entre estas enfermidades estão a Giardíase e a criptosporidiose. A *Giardia sp* e *Cryptosporidium sp*, são microrganismos que desencadeiam essas doenças, têm sido referenciados como “patógenos emergentes” e as estações de tratamento de águas brasileiras não foram projetadas para promover ou inativar estes microrganismos (DUBEY et al., 2003; SMITH & ROSE, 1998).



Os protozoários *Cryptosporidium* e *Giardia* possuem uma acentuada resistência dos oocistos e cistos à desinfecção por cloro, cloramina e outros desinfetantes químicos empregados nos processos de tratamento da água (QUINTERO-BETANCOURT & ROSE, 2004).

A pesquisa de protozoários patogênicos no Brasil está no início ainda em amostras ambientais. A Portaria nº 2.914/2011 do Ministério da Saúde (Brasil, 2011) recomenda a avaliação da presença dos protozoários *Cryptosporidium spp.* e *Giardia spp.* em água destinada ao consumo humano e ressalta a obrigatoriedade de monitoramento dos mananciais de acordo com a concentração de *Escherichia coli*. A complexidade inerente aos métodos de detecção, a falta de recursos humanos qualificados para o trabalho e a escassez de informações disponíveis sobre a ocorrência desses agentes patogênicos nos recursos hídricos nacionais, se destacam entre os maiores fatores que causam dificuldade para serem averiguados em curto prazo.

*Cryptosporidium* e *Giardia*, possuem (oo)cistos resistentes aos processos de cloração e ao aumento de temperatura, permanecendo viáveis por muito tempo no ambiente. São protozoários parasitas de veiculação hídrica que infectam uma ampla variedade de hospedeiros vertebrados, inclusive humanos. A cryptosporidiose e giardíase se caracterizam por gerar nos pacientes acometidos quadros de diarreia de diversa severidade, causando sérias morbidades em seus hospedeiros, principalmente em indivíduos imunocomprometidos (XIÃO, 2008; LOBO et al., 2009; FREGONESI et al., 2012).

A transmissão de ambos os parasitas se dá pela rota fecal-oral, por meio do contato direto com as fezes de pessoas infectadas ou por contato indireto por ingestão de água ou alimentos contaminados.

Na literatura, há relatos da presença de *Cryptosporidium* e *Giardia* em águas subterrâneas e em águas superficiais, incluindo lagos, mares e rios, bem como em água tratada (SHORTT et al., 2006; PLUTZER et al., 2008).

A análise de protozoários em água traz uma série de desafios científicos e tecnológicos, uma vez que as metodologias reconhecidas internacionalmente são de alta especificidade tecnológica.

Observa-se que a inserção desse tipo de metodologia na rotina de laboratórios certificadores da potabilidade da água ainda é incipiente no Brasil. As legislações pertinentes à temática vêm apresentando avanços recentes com a inclusão da recomendação para o monitoramento de *Cryptosporidium* e *Giardia* em associação com outros microrganismos indicadores. O método 1623 proposto pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados

Unidos (USEPA) para detecção de *Cryptosporidium* e *Giardia* em água é reconhecido internacionalmente por sua alta eficiência e inclui as fases de concentração, separação imunomagnética e microscopia de imunofluorescência. Sabe-se, porém, que para sua implementação é requerida vasta experiência por parte dos analistas e investimentos econômicos consideráveis, levando em conta o alto custo dos insumos e dos equipamentos utilizados, tornando-se, assim, pouco acessível em muitos laboratórios.

## **2.7 Metodologias para identificação e enumeração de ovos de helmintos**

Com o desenvolvimento da parasitologia médica, diversas técnicas foram propostas para a identificação de ovos de helmintos intestinais e larvas em fezes (FAUST et al., 1939; BAILENGER, 1979), com os princípios básicos destas técnicas tendo sido adaptados para a identificação e enumeração de ovos de helmintos em águas residuárias (AYRES et al., 1989; STIEN & SCHWARTZBROD, 1986; WHO, 1989; AYRES & MARA, 1996) e em lodo (MEYER et al., 1978).

Diversos métodos para a identificação e enumeração de ovos de helmintos em águas residuárias são descritos na bibliografia especializada, cada um com suas vantagens e desvantagens geralmente citadas pelo próprio autor. Alguns apresentam uma elevada percentagem de recuperação, mas demandam grande tempo de análise; muitos não foram publicados em detalhes para permitir sua aplicação, ou suas taxas de recuperação não são conhecidas; alguns demandam reagentes químicos de custo muito elevado ou não são adequados para o uso em laboratórios com limitações de equipamentos; enquanto outros são capazes de recuperar apenas um número limitado de espécies de ovos de helmintos. Fica claro, com isso, que não existe um método que seja universalmente útil, que recupere todos os ovos de helmintos de importância médica, e que tenha uma taxa de recuperação conhecida (AYRES & MARA, 1996).

Nesse sentido, os métodos empregados para análise parasitológica em águas residuais variam de laboratório para laboratório, sendo que alguns são mais específicos para esgotos brutos e outros para efluentes tratados, que podem apresentar um número menor de ovos de helmintos. Alguns métodos possuem, ainda, aplicabilidade tanto para enumeração quanto para viabilidade de ovos de helmintos. A escolha do método a ser utilizado deve ser feita unicamente quando as facilidades e exigências particulares da situação conhecidas. Deve-se

levar em consideração o objetivo da pesquisa e o tipo de sistema que está sendo utilizado para o tratamento das águas residuais, além da percentagem de recuperação e aplicabilidade do método utilizado.

Todos os métodos disponíveis baseiam-se em um dos dois princípios fundamentais: i) -os ovos dos parasitos são separados, por flutuação, dos resíduos presentes na amostra, em uma solução de maior densidade relativa; ou ii) - a gordura e outros materiais são separados em uma solução de interface (usualmente éter ou acetato de etila), enquanto os ovos sedimentam em uma solução não miscível, abaixo.

Ambos os procedimentos são baseados na força centrífuga. Os fatores que determinam se a concentração de determinadas espécies de ovos de helmintos será satisfatória dependerão do balanço hidrofílico-lipofílico dos ovos de helmintos e da densidade relativa destes em relação ao reagente de separação. Isso significa, na prática, que o pH, ou a presença de metais pesados ou álcoois nos reagentes utilizados, poderá alterar as propriedades das superfícies dos ovos de helmintos, e cada espécie responderá diferentemente a essas alterações: assim, nenhum método concentrará todas as espécies com a mesma eficiência (AYRES & MARA, 1996).

Para avaliar a contaminação por helmintos e protozoários em vegetais, é possível encontrar várias metodologias. Considerando a contaminação por helmintos, Bier (1991) apresentou o método utilizado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) e avaliou seu percentual de recuperação. Neste método, derivado de procedimentos para isolar da água protozoários parasitos, os vegetais são lavados com uma solução à base de dodecil sulfato de sódio e Tween 80, e a sonicação é utilizada para a extração dos parasitos, que são concentrados por centrifugação e, por fim, fixados em formaldeído 4%. No caso de grande quantidade de material estranho no sedimento, ainda pode ser feita a técnica de Sheather, que consiste na flutuação dos ovos e oocistos de parasitos em solução saturada de açúcar. O sobrenadante é coletado após centrifugação e lavado duas vezes em água destilada. Após, procede-se com a identificação dos parasitos.

Com tudo, estudos relatados no tópico anterior e outros trabalhos de avaliação da contaminação parasitológica em vegetais são de difícil comparação, sendo a utilização de uma diversidade de metodologias que, em geral, são derivadas de métodos eficazes para outro tipo de objeto de estudo, como água e fezes, mas que não apresentam estudos sobre o desempenho dos mesmos quando adaptados para vegetais.

### 2.7.1 Métodos para enumeração de ovos de helmintos

Diversos estudos foram efetuados comparando as metodologias para análises de ovos de helmintos em fezes, visando a sua adaptação para amostras de águas residuárias, mas a maioria apresentou desvantagens que inviabilizaram sua utilização. Bouhoum & Schwartzbrod (1989) compararam vários métodos para análises de ovos de helmintos em fezes, objetivando a adaptação destes para amostras de águas residuais. Dos cinco métodos testados, três utilizavam o princípio da flutuação: i) - Janeckso & Urbanyi; ii) - Faust; e iii) - Arther. Os outros dois métodos utilizavam o princípio da sedimentação: iv) - Bailenger; e v) - Ritchie (éter e 10% de formol).

Com base nos estudos comparativos realizados, Bouhoum & Schwartzbrod (1989) testaram uma ampla faixa de soluções de flutuação para a concentração de ovos de helmintos e chegaram às seguintes conclusões principais:

- em relação ao método Janeckso & Urbanyi, foi observado que o reagente de flutuação iodo mercurato de potássio concentrava uma grande faixa de espécies de ovos de helmintos. No entanto, concluíram que o reagente era muito tóxico, corrosivo e caro para ser utilizado em testes de rotina;
- o método de Faust, que utilizou para flutuação a solução de sulfato de zinco a 33%, mostrou-se completamente inadequado para a concentração de algumas espécies de nematóides, a exemplo de *Trichuris* spp. e *Capillaria* spp.;
- o método de Arther, que utiliza a sacarose saturada como solução de flutuação, era mais barato, porém deformava os ovos rapidamente.

Bouhoum & Schwartzbrod (1989) concluíram que o método de Bailenger, que utiliza éter e solução tampão aceto-acética com pH 5 (BAILENGER, 1979), concebido originalmente para enumeração de ovos de helmintos em fezes, adaptado para amostras de esgotos, se mostrou o mais adequado, tendo em vista que o mesmo requeria reagentes baratos e era capaz de concentrar com sucesso uma ampla faixa de espécies de ovos de helmintos rotineiramente encontradas em esgotos sanitários.

Ayres (1989) encontrou uma boa correlação entre ovos inoculados e percentagem de recuperação, e sugeriu que a percentagem de recuperação pode ser mais afetada pela quantidade e qualidade da matéria orgânica do que pelo número absoluto de ovos presentes na amostra. Assim, testaram em 1991 os seguintes métodos para a enumeração de ovos de helmintos em efluentes tratados:

- método correntemente recomendado pela WHO, mais comumente conhecido como método de Bailenger, processando 1 L e 10 L, separadamente;
- método correntemente utilizado pela Estação Experimental de Tratamentos Biológicos de Esgotos Sanitários (EXTRABES-UFPB), processando 500 mL da amostra;
- método desenvolvido especialmente para efluentes de lagoas, conhecido como método de Leeds II, onde 4 L da amostra foram processados em cada ocasião;
- método modificado de Janeckso & Urbanyi, processando 25 L da amostra, utilizando o tiosulfato de sódio (densidade específica 1,30) como solução de flutuação.

Com base nos estudos comparativos realizados, Ayres et al. (1991) chegaram às seguintes conclusões principais:

- quando foi utilizado o método de Bailenger processando 1L da amostra de esgoto tratado, este não foi eficiente, resultando em baixas contagens de ovos de helmintos. Porém, quando 10 L da amostra foram processados, observou-se taxas de detecção muito maiores, se comparadas com as taxas do método Leeds II. No método de Bailenger, a preparação da amostra é direta, e em termos de identificação no microscópio o tempo requerido é pequeno, em torno de 1 a 2 minutos, dependendo da qualidade do efluente. Podem ser feitas duplicatas e triplicatas, diminuindo assim a margem de erro. Poucos reagentes especiais são requeridos, sendo usualmente disponíveis e baratos. Utiliza-se a câmara de McMaster para a contagem dos ovos de helmintos, sendo que a câmara pode ser facilmente adquirida;
- o método da EXTRABES é o mais barato e o mais fácil de ser utilizado, sendo no entanto mais específico para amostras de esgoto bruto, onde a concentração de ovos é geralmente muito grande. Segundo Ayres et al. (1991), o método é inadequado para detectar ovos de helmintos presentes em baixas concentrações, devido ao fato de que o mesmo utiliza amostras de pequeno volume e etapa de subamostragem;
- o método Leeds II também é barato e de fácil utilização quando a concentração de sólidos suspensos totais é baixa, possibilitando que a contagem com a câmara de Doncaster seja efetuada em torno de 5 a 10 minutos. No entanto, a qualidade do efluente pode variar muito e, em algumas situações, algas e resíduos mais pesados

não flutuarão em solução salina, deixando uma amostra final muito suja, dificultando sobremaneira a identificação e contagem dos ovos, uma vez que a análise torna-se muito cansativa e consome muito tempo. A principal vantagem dessa técnica é a sua elevada taxa de recuperação, devido ao fato de que não há nenhuma etapa de subamostragem e todos os ovos de cada amostra individual são contados diretamente;

- no método modificado de Janeckso & Urbanyi, foram identificados ovos com a mesma frequência dos métodos de Bailenger (processando 10 L) e Leeds II. O método foi considerado ligeiramente mais difícil que os outros, pelo fato de manusear amostras de maiores volumes (25 L). Além disso, em sua última etapa, a eventual presença de resíduos flutuantes pode dificultar a amostragem do menisco superior que concentra os ovos;
- em trabalhos de rotina em laboratórios, o método de Bailenger, utilizando um volume de amostra de 10 L, parece ser o mais apropriado para a enumeração de ovos de helmintos em águas residuárias tratadas.

Crispim & Barbosa (1995) testaram e avaliaram o desempenho dos métodos EXTRABES e LEEDS I (citados por AYRES et al., 1989 e WHO, 1989). Observou-se que o método WHO, 1989 apresentou uma eficiência 1,5 vezes maior que o método EXTRABES e 7,8 vezes maior que o método de LEEDS I e concluíram que o percentual de recuperação de ovos diminui à medida em que se aumenta o valor de sólidos sedimentáveis.

### 2.7.2 Considerações em relação ao método de BAILENGER modificado

Em águas residuárias domésticas o método mais utilizado é aquele descrito em WHO (1989), conhecido como método da sedimentação, selecionado a partir de várias técnicas minuciosamente testadas em vários países. Das técnicas disponíveis citam-se o método da sedimentação, descrito em WHO, 1989 e o método modificado de Bailenger (AYRES & MARA, 1996). Ambos utilizam o processo físico da sedimentação da matéria orgânica contendo os ovos de helmintos.

Embora a percentagem de recuperação do método de Bailenger (1979) modificado não seja conhecida (AYRES & MARA, 1996) e este não seja adequado para a identificação de vários ovos de trematóides operculados e de alguns ovos de cestóides, estudos desenvolvidos

por Ayres et al. (1991), Bouhoum & Schwartzbrod (1989), demonstraram que o método se compara favoravelmente em relação a outras técnicas, sendo capaz de recuperar uma quantidade maior de ovos de helmintos, incluindo *Ascaris* spp., *Trichuris* spp., *Capillaria* spp., *Enterobius vermicularis*, *Toxocara* spp., *Taenia* spp., *Hymenolepis* spp e Ancilostomídeos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Caracterização da área de estudo

A área de estudo desta pesquisa está localizada no Campus da Universidade Federal de Santa Maria, na Bacia Escola Campus (Figura 2), situada entre as coordenadas geográficas 29°43'00" de latitude Sul e 53°43'45" longitude Oeste, próximo à Biblioteca Central e aos prédios da Casa do Estudante.

Nessa área, de cerca de 1.700 m<sup>2</sup>, ocorre o despejo final de efluentes líquidos, diretamente na superfície do solo, que escoam por zonas de fluxos preferenciais até atingir um curso d'água, a Sanga Lagoão do Ouro, de acordo com denominação atribuída pela Prefeitura Municipal de Santa Maria. Este córrego foi registrado no cadastro da Agência Nacional de Águas (ANA) com o nome de Arroio da Gráfica. Trata-se de uma referência ao prédio da gráfica da UFSM, localizado na entrada no Campus, onde o córrego adentra o terreno da universidade segundo Araújo (2013).



Figura 2 – Localização da área de estudo na Universidade Federal de Santa Maria.

Fonte: (ARAÚJO 2013).



## 3.2 - 1ª Fase da pesquisa

### 3.2.1 Amostragem

Amostras de lançamento direto da saída de águas residuais em tubos de polietileno, foram coletadas semanalmente, com algumas interrupções decorrentes das condições climáticas, por um período aproximado de três meses nas fontes pontuais dos prédios 35 e 36, localizados na área de estudo, onde estão demarcados como casa de estudante.

As análises microbiológicas das águas residuais foram realizadas após a chegada das amostras ao Laboratório de Saneamento Ambiental e de Parasitologia Animal da Universidade Federal de Santa Maria, conforme o protocolo para cada análise, descritos nas metodologias utilizadas.

### 3.2.2 Pontos de coleta

Foram coletadas 12 amostras de esgoto bruto na fonte pontual do prédio 33 (FP35), classificado por Reckziegel (2012) como mosta na figura 3 a-b e 08 amostras de esgoto bruto na fonte pontual do prédio 36, classificado como (FP50) por Reckziegel (2012), como mostras a figura 4 a- b. Para as amostras foram coletadas de cada fonte pontual 1L de esgoto bruto em três frascos de 1L cada, todos esterilizados, e 80 ml de do mesmo efluente em três frascos de polietileno estéril de 80 mL cada (Figura 5 a-b).



Figura 3 – (a) caixa de passagem, onde foram realizadas as coletas da FP35. (b) Localização da caixa de passagem próximo ao prédio 33.



Figura 4 – (a) Tubos de passagem de águas residuais do prédio 36. (b): Local onde está a passagem do fluxo de esgoto bruto lançado pelos tubos da FP 50.

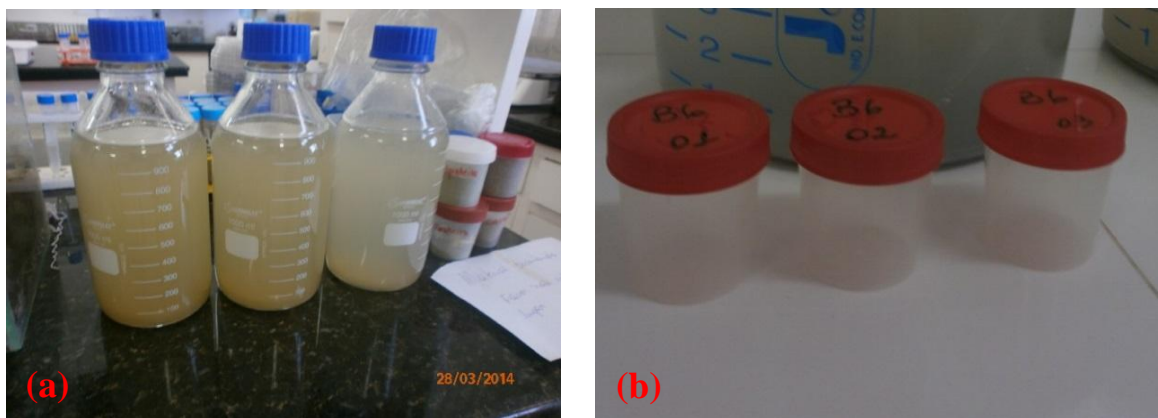


Figura 5 – (a) Frascos para amostras de esgoto das FPs para análise de ovos de helmintos. (b) Frascos para amostras de esgoto das FPs para análise oocistos de protozoários.

As amostras foram preferencialmente coletadas nas quartas-feiras entre 7 horas e 30 minutos e 9 horas da manhã. A frequência das coletas foi semanal, mas definida em função do tempo necessário para a realização dos testes com as metodologias, considerando a capacidade do laboratório em termos de equipamentos, vidrarias, armazenamento de amostras e das pessoas envolvidas no projeto, tendo semanas que não foram possíveis de coletar ou analisar material.

### 3.3 Enumeração de ovos de helmintos

Para o processamento e preparação das amostras, bem como para a enumeração de ovos de helmintos, foi utilizado o método de Bailenger (1979), modificado por Ayres & Mara (1996). Este método foi escolhido em função de sua simplicidade e baixo custo dos reagentes utilizados, além do que propicia a recuperação de uma ampla faixa de helmintos usualmente encontrados em águas residuárias (AYRES *et al.*, 1991).

#### 3.3.1 Fundamento da metodologia

As amostras de esgotos a serem processadas passam pelas seguintes etapas: sedimentação, centrifugação e flutuação. Após sucessivas centrifugações da amostra, com descarte do sobrenadante, o sedimento foi tratado com solução tampão aceto-acética (pH 4,5) e éter (ou acetato de etila) para a separação do material gorduroso. Posteriormente, com a adição de uma solução de sulfato de zinco de alta densidade ( $ZnSO_4$  densidade 1,18), os ovos flutuam. Os ovos que possuem densidade relativa menor que este valor são separados do sedimento e, portanto flutuam. A contagem é realizada utilizando-se uma câmara de McMaster com observação no microscópio em objetivas de 10x e 40x.

O tamanho, a densidade relativa e a velocidade de sedimentação de alguns ovos são mostrados na Tabela 1. Pode-se observar que, com exceção dos ovos de *S. mansoni*, os demais são ligeiramente menores que os ovos de *Ascaris suum* e suas densidades relativas são similares, exceto para os ovos de *Taenia saginata* que apresentam densidade bem mais elevada (1,30).

Tabela 1 – Tamanho, densidade e velocidade de sedimentação de algumas espécies de ovos de helmintos

Espécies	Tamanho ( $\mu\text{m}$ )	Densidade	Velocidade de Sedimentação (m/h)
<i>Ascaris suum</i>	65 x 45	1,13	0,95
<i>Ascaris lumbricoides</i>	55 x 40	1,11	0,43
<i>Schistosoma mansoni</i>	50 x 150	1,18	5,23
<i>Trichuris trichiura</i>	22 x 50	1,15	0,48
<i>Taenia saginata</i>	40 x 35	1,30	0,83
Ancilostomídeos	60 x 40	1,055	0,26

Fonte: ZERBINI & CHERNICHARO (2001).

### 3.3.2 Preparação de soluções

São os seguintes os principais procedimentos para preparação das soluções necessárias à enumeração de ovos de helmintos:

- solução de sulfato de zinco: pesar 33 g de  $\text{ZnSO}_4$  e diluir em 100 mL de água destilada (conferir a densidade utilizando um densímetro);
- solução tampão aceto-acética (pH 4,5): pesar 5 g de acetato de sódio cristalino, misturar em 3,6 mL de ácido acético glacial e completar o volume com água destilada até 1000 mL. Corrigir o pH da solução para 4,5 com os próprios reagentes;
- solução detergente Triton X-100 ou Tween 80: pipetar 1 mL da solução e adicionar em 1 litro de água de torneira.

### 3.3.3 Procedimentos para enumeração dos ovos de helmintos

De acordo com o método de BAILENGER modificado, são adotados os seguintes procedimentos para preparação das amostras e enumeração de ovos de helmintos (AYRES & MARA, 1996):

- a) Coletar uma amostra de esgoto de volume conhecido (V litros) - usualmente 1 litro para esgoto bruto ou parcialmente tratado e 10 litros para esgoto tratado.

- b) Deixar a amostra sedimentar em um béquer (esgoto bruto) ou em um balde (esgoto tratado). Usualmente, tem sido adotados tempos de sedimentação de cerca de 1 hora para o esgoto bruto e de 2 horas para o esgoto tratado.
- c) Remover aproximadamente 90% do sobrenadante usando uma bomba de sucção ou um sifão, garantindo que fique no recipiente um volume de aproximadamente 100 mL para o esgoto bruto e de 1 L para o esgoto tratado. Inclinar o recipiente, caso necessário, tendo o cuidado para não ressuspender o sedimento.
- d) Transferir cuidadosamente o sedimento para os tubos da centrífuga, enxaguando o béquer e/ou balde com solução Triton (ou Tween). Para qualquer transferência do sedimento de um recipiente para o outro, ou de um tubo para outro tubo, enxaguar com solução Triton (ou Tween).
- e) Pesar todos os tubos ajustando-os simetricamente na centrífuga e proceder a centrifugação a 1000 g por 15 minutos.
- f) Após a primeira centrifugação, descartar o sobrenadante; transferir todos os sedimentos para um único tubo e centrifugar novamente a 1000 g por 15 minutos.
- g) Descartar o sobrenadante e ressuspender o sedimento contido no tubo utilizando um volume equivalente de solução tampão aceto-acética (pH 4,5), ou seja, para um volume do sedimento igual a 2 mL, adicionar 2 mL da solução tampão. Caso o volume do sedimento seja inferior a 2 mL, adicionar solução tampão até completar um volume de 4 mL. Este volume mínimo de 4 mL visa facilitar o descarte do sobrenadante obtido durante a etapa (i), sem provocar a ressuspensão do sedimento contendo os ovos.
- h) Complementar o preenchimento do tubo com a adição de um volume de éter (ou acetato de etila) correspondente a duas vezes o volume do sedimento e homogeneizar a amostra com equipamento tipo Vortex. Ex.: se o volume do sedimento for 2 ml, adicionar 4 mL de éter ou acetato de etila.
- i) Centrifugar a 1000 g por 15 minutos. Após a centrifugação a amostra apresentará três fases distintas: i) no fundo do tubo se concentrará todo o material não gorduroso e fragmentos pesados, incluindo os ovos de helmintos, larvas e oocistos de protozoários; ii) uma fase intermediária contendo a solução tampão, que deverá ser clara (transparente); e iii) uma fase superior contendo a gordura e outros materiais, que juntamente com o éter (ou acetato de etila) formam uma camada tampão espessa e de cor escura.

- j) Descartar todo o sobrenadante com um único movimento firme e rápido, deixando no tubo apenas o sedimento (anotar o volume do sedimento). Caso seja necessário, desprender a camada tampão de cor escura com uma agulha fina, visando facilitar o descarte do sobrenadante.
- k) Adicionar um volume de solução de sulfato de zinco igual a 5 vezes o volume do sedimento (ex.: se o volume do sedimento for igual a 1 mL, adicionar 5 mL da solução de sulfato de zinco). Anotar o volume do produto final em mL, incluindo o sedimento e o sulfato de zinco e homogeneizar a amostra com equipamento tipo Vórtex.
- l) Remover, rapidamente, uma alíquota da amostra final com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e transferir para a câmara de McMaster. Deixar a câmara de contagem em repouso por 5 minutos para permitir que os ovos flutuem e atinjam a superfície do retículo de contagem.
- m) Examinar no microscópio em objetivas de 10x ou 40x e contar todos os ovos que estão dentro do retículo. Para uma melhor precisão na enumeração dos ovos de helmintos, deve-se fazer a leitura de mais de uma câmara, preferencialmente três, e calcular a média aritmética das contagens obtidas.

### 3.3.4 Expressão de resultados

O número final de ovos da amostra de esgotos deve ser calculado por meio da equação 1:

$$N = \frac{A \times X}{P \times V} \quad (1)$$

onde:

N = número de ovos (ovos/litro)

A = número médio de ovos contados nas câmaras de McMaster (no. de ovos)

X = volume do produto final (mL)

P = volume da câmara de McMaster (para câmara de dois retículos P = 0,30 mL; para câmara de um retículo P = 0,15 mL)

V = volume original da amostra.

### 3.3.5 Procedimento para enumeração de ovos de helmintos

O procedimento para preparação das amostras e enumeração dos ovos de helmintos após as coletas (Figura 6): (a) 24 horas em repouso da água residual coletada em frascos de 1L ; (b) Ao término desse tempo, foi retirado 90% do sobrenadante; Figura 7: (a) as análises foram feitas com os 10% de sedimento colocados em falcons de 50mL cada. (b) os falcons foram centrifugados conforme as etapas “e”, “f” e “i” do item 4.3.4; Figura 8: (a) conforme o procedimento “i” é possível verificar as três fases distintas (material orgânico no fundo do falcon, solução tampão na fase intermediária do falcon, e na fase superior a gordura); (b) descarte de todo o sobre nadante; (c) sedimento homogeneizado com sulfato de zinco 33% para auxiliar na flutuação dos ovos. Figura 9: placas de McMaster para visualização em microscópio óptico: (a) placa de MCMaster com amostra da solução homogeneizada de sedimento com sulfato de zinco 33%; (b) placa de McMaster após 5 minutos de repouso para flutuação dos ovos de helmintos.

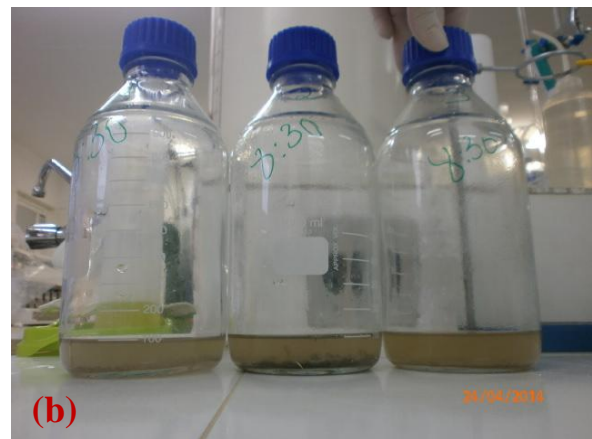


Figura 6 – Procedimento para a preparação da amostra para análise biológica de ovos de helmintos; (a) frascos com 1L de esgoto bruto; (b) frasco com 100mL com sedimento.

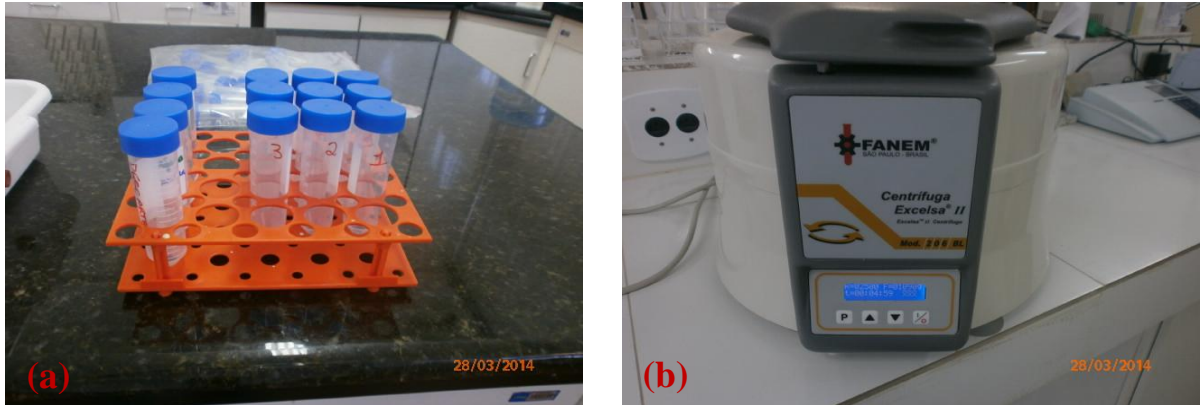


Figura 7 – Amostras para o processo de centrifugação. (a) falcons com 50 mL cada de sedimento; (b) processo de centrifugação das amostras.

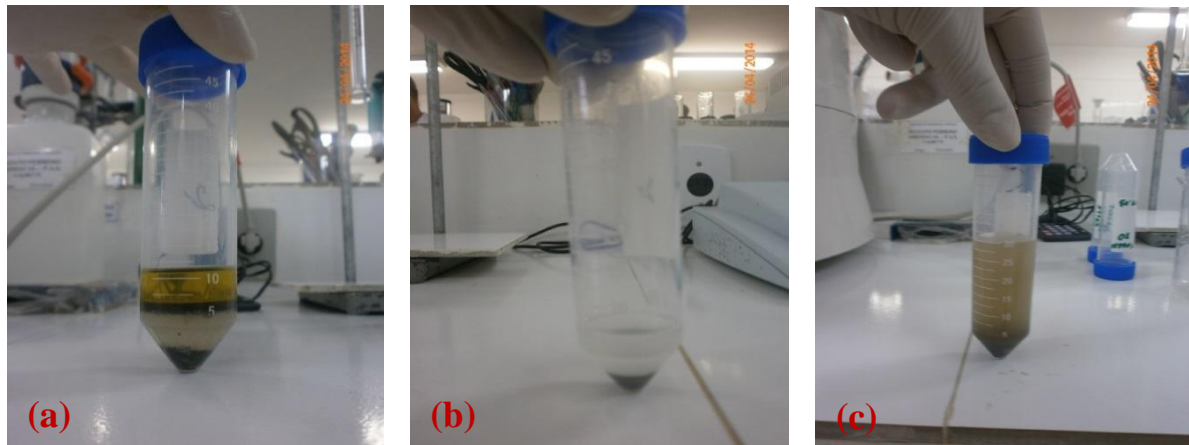


Figura 8 – Procedimento pós-centrifugação das amostras; (a) falcon com as três fases (gordura, solução tampão e sedimento; (b) falcon com sedimento após descarte do sobrenadante; (c) falcon com sedimento homogeneizado com sulfato de zinco 33% frasco com 100mL de sedimento.



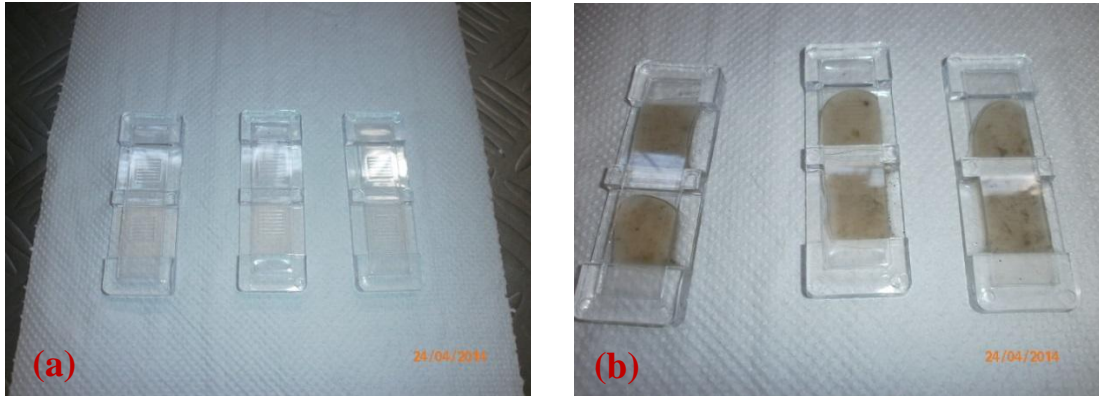


Figura 9 – Procedimento para visualização dos ovos de helmintos no microscópio óptico. (a) placas de McMaster; (b) placas de McMaster com sedimento homogeneizado com sulfato de zinco 33%.

### 3.4 Técnica para detectar oocistos de *Cryptosporidium* sp

A técnica torna possível identificar os microrganismos capazes de resistir ao deslocamento pela mistura de álcool-ácido, depois de corados pela fucsina.

A fucsina fenicada, atuando a quente, vai corar todas as células dos oocistos de *Cryptosporidium* presentes no esfregaço de vermelho (o calor vai derreter os lipídios de membrana, tornando-a permeável). O ácido diluído em álcool aplicados vão decorar todos os oocistos exceto os ácido-álcool resistentes, que permanecem corados de vermelho pela fucsina. Assim, ao serem observadas após coloração e contraste, com azul de metileno, encontraremos o oocisto de *Cryptosporidium* sp. quando presentes.

#### 3.4.1 A técnica de Ziehl-Neelsen

- Confeccionar o esfregaço seguindo as técnicas atuais de biossegurança;
- Fixar a amostra com a secagem total do esfregaço;
- Cobrir a lâmina com fucsina fenicada (o mordente é o ácido fénico);
- Aquecer a lâmina até à emissão de vapores (é importante não deixar ferver);
- Aguardar 5 a 8 minutos;

- Lavar com água corrente;
- Cobrir a lâmina com álcool-ácido 3% até descorar totalmente o esfregaço;
- Lavar com água corrente;
- Cobrir a lâmina com azul de metileno durante 1 minuto;
- Lavar com água corrente;
- Secar;
- Observar em objetiva de imersão 100x

### 3.5 Método para detectar oocisto de *Giardia* sp

#### 3.5.1 Método de Willis-Mollay (1921)

O método de Willis se baseia em duas características dos ovos analisados. A primeira é a densidade, como se sabe, corpos menos densos tendem a flutuar sobre corpos mais densos em uma solução por conta de que o fenômeno de empuxo da água é mais intenso em comparação a força peso do objeto.

O princípio é de flutuação:

- Solução empregada é de elevada densidade (1:1200) e sendo os ovos de oocisto da mesma densidade, tendem a subir, aderindo a superfície inferior da lâmina;
- Exame microscópico qualitativo direto, após a sedimentação da solução resultante da lavagem da rizosfera;
- Flutuação em Solução Saturada de Cloreto de Sódio;
- Colocar uma quantidade de amostra 1 a 2 gramas coletada, em pequena cuba de vidro de 3 cm de diâmetro com capacidade aproximada de 20 ml. Completar  $\frac{1}{4}$  da capacidade do recipiente com solução saturada de cloreto de sódio e homogeneizar o mais possível;
- Suspender a solução saturada salina com a amostra diluídas e homogeneizadas com mais solução até que o conteúdo atinja a borda do borrel (copinho de vidro), ou outro recipiente semelhante;

- A lâmina ou lamínula deve ficar em contato com o menisco da solução durante 15 minutos;
- Remover a lâmina ou lamínula e inverter rapidamente a sua posição;
- Examinar ao microscópio com objetiva de pequeno aumento.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Devido à ausência de trabalhos de controle de verminose com as plantas utilizadas neste experimento, se fez necessário extrapolar a discussão com resultados obtidos por autores que estudaram a ação anti-helmíntica com outras espécies de plantas e de animais.

As análises biológicas do esgoto foram realizadas antes de serem realizadas as das macrófitas. Estas análises foram feitas para serem utilizadas como base de resultados da presença de ovos de helmintos e oocistos de protozoários e para comprovar a eficiência das metodologias para análise de águas residuais.

Foram escolhidos dois locais de lançamentos de esgoto doméstico, que estão diretamente ligados aos prédios da casa do estudante, situados no campus da UFSM, e que estão em uma área de contato com a população do local.

### **4.1 Resultados da 1ª fase para a presença e enumeração de ovos de helmintos**

Os resultados foram todos realizados em triplicata nos laboratórios de análises LASAN e de Parasitologia Veterinária, ambos da Universidade Federal de Santa Maria.

Na Tabela 2 mostram-se as médias dos resultados obtidos em triplicata do número de ovos de helmintos nas FP35 e FP50, através do método de Bailenger modificado por Ayres & Mara (1986).

Tabela 2 – Valore médios da concentração de ovos de helmintos nas amostras das duas FPS 35 e 50 respectivamente.

<b>Data</b>	<b>FP35</b>	<b>FP50</b>
05/06/2014	111	83
26/06/2014	50	200
10/07/2014	111	250
17/07/2014	66	50
24/07/2014	100	250
31/07/2014	-	100
28/08/2014	-	50
04/09/2014	222	133
18/09/2014	348	44
25/09/2014	116	127
<b>Soma</b>	1124	1287
<b>Média</b>	140,5	128,7
<b>Mediana</b>	111	113,5
<b>Desvio Padrão</b>	98,1	79,6
<b>Mínimo</b>	50	44
<b>Máximo</b>	348	250

Na tabela 2 foi possível verificar que a média entre todas as análises foi de 140,5 ovo/L de helmintos para FP35 e 128,7 ovo/L da FP50. Este resultado mostra a necessidade de uma maior atenção de novas análises periódicas destas fontes.

Nos Estados Unidos, o órgão de controle sanitário do esgoto e produtos dele derivados, a Agência de Proteção Ambiental (EPA), estabelece como padrão aceitável um número igual ou inferior a um ovo viável de helmintos por quatro gramas de matéria seca para que o bio sólido seja usado para os mais variados fins (EPA, 2009). Número pequeno para estabelecer se o solo está apropriado ou não, confirmando que basta um valor baixo de ovo/g ou ovo/L para que se possa determinar se o solo ou o efluente pode trazer algum risco para a população local, ou até mesmo de regiões próximas.

A viabilidade não foi o foco desse trabalho, mas a quantidade significativa de ovos/L, levanta a hipótese que o número de ovos viáveis seja consideravelmente alto, podendo levar a população local a contaminação por algum parasita e adquirir algum problema com doenças gastrointestinais.

Os ovos de helmintos estiveram presentes em quase todas as análises realizadas. Foram encontrados ovos de helmintos pertencentes às superfamílias Ascaroidea e

Trichuroidea e famílias Taeniidae e Hymenolepididae. No caso dos ovos de parasitos pertencentes aos Ascaroidea alguns deles podem ser semelhantes como *Ascaris lumbricoides*/*A. suum* e *Toxocara canis*/*T. catti* e como ambos poderiam estar presentes nas águas residuais analisadas, foi feita a opção por citar apenas o gênero. Da mesma forma, pelo ovo é impossível distinguir *Taenia solium* e *T. saginata*, além do que poderiam estar presentes ovos de outros teniideos de cães e gatos (*T. hidatigena*, *T. serialis*, *Hidatigera taenuiformis*); por esta razão, os resultados referem-se apenas aos números totais de ovos de helmintos presentes, sem classifica-los.

Segundo Cook et al. (2006), um método padrão de detecção de microrganismos deve ser relativamente simples, robusto, reprodutível, rápido, confiável e realista. Avaliando tais parâmetros é que foram escolhidas as etapas deste método de detecção de ovos de helmintos para dar início a essa pesquisa e servir de suporte para a elaboração de uma metodologia equivalente para análise do rizoma de macrófitas.

O método de Bailenger, para Bouhoum & Schwartzbrod (1989), que utiliza éter e solução tampão aceto-acética com pH 5 (BAILENGER, 1979), concebido originalmente para enumeração de ovos de helmintos em fezes, adaptado para amostras de esgotos, se mostrou o mais adequado, tendo em vista que o mesmo requeria reagentes de custo mais baixo e era capaz de concentrar com sucesso uma ampla faixa de espécies de ovos de helmintos rotineiramente encontradas em esgotos sanitários. Sendo utilizado neste trabalho para análise de águas residuais, o método demonstrou boa efetividade, mas com algumas falhas, pela persistência de sólidos nas amostras, que precisam ser corrigidas em estudos posteriores.

O método de Bailenger é de fácil acesso e de rápido resultado. No estudo com as amostras de água residuais o que demonstrou dificuldade foi a visualização pelo microscópio óptico, decorrente da grande quantidade de sedimentos sólidos presentes nas amostras ainda na fase final de centrifugação.

Quanto aos resultados em número de ovos, estudos mostram que existem muitos parasitas zoonóticos, sendo que alguns são hospedeiros definitivos de animais e outros parasitas são apenas hospedeiros intermediários. Os animais contaminados, principalmente os domésticos que mantêm mais contato com seres humanos, contaminam o solo, e conseqüentemente, a água devido o solo estar contaminado. Os humanos se contaminam ao entrar em contato com solo, água, animais e alimentos contaminados e formam um ciclo de transmissão e contaminação parasitaria (LOPES et al., 2014). Fator muito importante que justifica a grande presença desses microrganismos nas amostras.

Diretrizes revisadas por Blumenthal et al (2000), enfatizam o limite estabelecido de 0,1 ovo/L, o que comparado ao resultados obtidos, gera uma preocupação pelo considerável número de ovos de helmintos encontrados em cada amostra por litro analisada.

Um dos fatores limitantes pelo CONAMA 357/05, é a ausência do parâmetro biológico de ovos de helmintos, já que o Brasil é um país com diversos problemas decorrentes de contaminação com estes organismos. De qualquer forma estes não são os principais problemas, sendo a contaminação por vírus e protozoários as que mais causam doenças fatais. Assim, a inclusão destes parâmetros seria de grande valia para uma diretriz no Brasil, mas certamente com dificuldades de serem seguidas, devido às limitações financeiras para a detecção e quantificação destes organismos em laboratório. Mas para a saúde pública e a prevenção de doenças, essa seria uma necessidade real, além de ser recomendável a elaboração de uma norma específica para helmintos (BLUMENTHAL et al., 2000).

#### 4.1.1 Resultado da presença de oocisto de *Cryptosporidium* sp. e *Giardia* sp.

Das dez coletas realizadas e analisadas em triplicata, todas deram positivas para a presença de *Cryptosporidium* sp. (Figura 10). O mesmo não aconteceu com as análises de *Giardia* sp., que deram negativas nas 30 amostras analisadas.

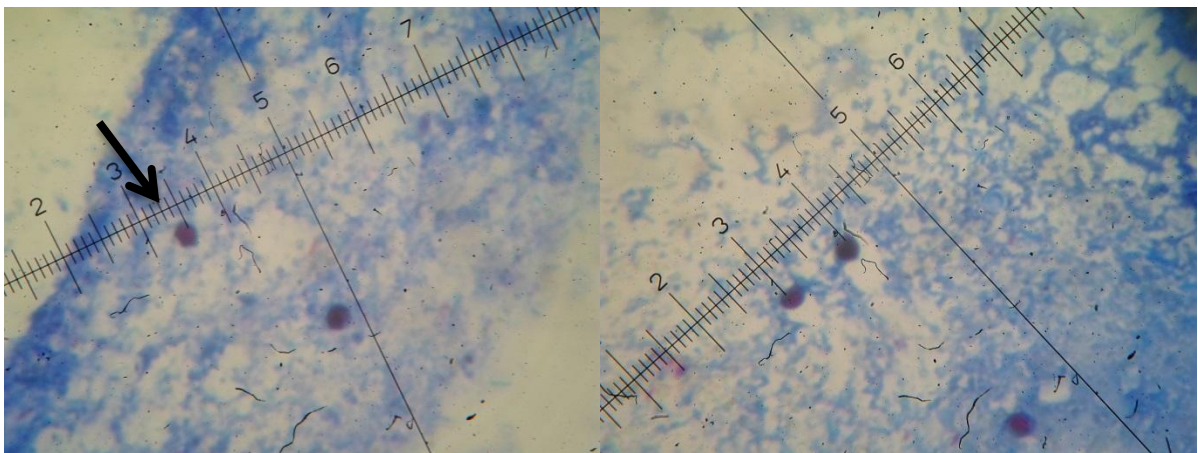


Figura 10 – (a) e (b) oocisto de *Cryptosporidium* sp visualizado com aumento de 1000x microscópio óptico.

No Brasil, foi publicada a Portaria n. 2.914, de 12 de dezembro de 2011, do Ministério da Saúde, a qual recomenda a necessidade de monitorar a presença de *Cryptosporidium* e *Giardia* em água, perante sua significância sanitária, quando for identificada média geométrica anual maior ou igual a 1.000 *Escherichia coli*/100 mL. Entretanto, pouco se tem registrado no País sobre a real extensão do problema, incluindo informações epidemiológicas e de qualidade parasitológica da água.

De acordo com Karanis et al. (2007), tanto para giardíase como para cryptosporidiose, o potencial de disseminação de oocistos desses protozoários é um agravante no contexto da saúde pública. Durante uma manifestação sintomática, são eliminados junto com as fezes até  $1,44 \times 10^9$  cistos de *Giardia* e cerca de  $10^{10}$  oocistos de *Cryptosporidium*. Dessa forma, os parasitas podem atingir um corpo d'água e contaminar um hospedeiro susceptível direta ou indiretamente, considerando que a dose mínima para causar uma infecção pode variar entre 25 e 100 cistos de *Giardia* e entre 9 e 1000 oocistos de *Cryptosporidium*. Sabe-se, ainda, que os oocistos podem permanecer viáveis por mais de 150 dias em água e por até 130 dias em fezes, além de serem resistentes aos processos de tratamento convencional da água e à cloração para Rose et al. (2002).

Segundo Graczyk & Fried (2007), as concentrações de oocistos variaram de 0,003 a 5.800 oocistos/litro. No Brasil, a prevalência de oocistos nos mananciais variou de 0% a 100 % das amostras analisadas e foram registradas concentrações de até 510 oocistos/litro (FRANCO, 2011). Nesta pesquisa não se enumerou os oocistos de *Giardia* e *Cryptosporidium*, mas comparando com resultados de pesquisas já realizadas, obtendo-se a presença desses oocistos nas análises e sendo constante em todos os resultados a presença dos mesmo, já serve para determinar que existe a presença desses protozoários e que é um risco para a saúde pública. Um número muito pequeno de oocistos de *Cryptosporidium* sp. em amostras é o suficiente para classificar aquela amostra como contaminante para humanos e animais. O que os resultados mostram é uma possível contaminação da água residual lançada ao ambiente natural próximo aos prédios que lançam esses efluentes.



## 4.2 - 2ª fase método Rodrigues & Wolff

### 4.2.1 Coleta da macrófita *Typha domingensis*

As coletas de exemplares de *Typha domingensis* foram feitas próximas ao lançamento do efluente do prédio 36-P50 (Figuras 11): (a) entrada do efluente no ambiente, através de tubos ligados ao prédio 36; (b) área envolta do local de lançamento da água residual do prédio 36. Figura 12: (a) local de coleta da macrófita, após o lançamento da água residual pela tubulação com uma vasta vegetação de macrófitas; (b) *Typha domingensis* após ser coletada, com todo o sedimento no rizoma.



Figura 11 – FP50 de lançamento de água residual do prédio 36. (a) tubulação de passagem de água residual do prédio 36 até a FP50. (b) vegetação local da área de coleta das macrófitas.



Figura 12 – Local com macrófitas. (a) macrófitas próximas ao local de coleta. (b) *Typha domingensis* coletadas para análise do sedimento da rizosfera.

#### 4.2.2 Desenvolvimento do método Rodrigues & Wolff

Este método foi desenvolvido para caracterizar a presença de ovos de helmintos e oocistos de protozoários na rizosfera da *T. domingensis* em ambientes naturais com lançamento de águas residuais.

O método de Bailenger (1979) adaptado por Ayres et al., (1991) foi o que serviu de base. As modificações se deram a cada exemplar de planta estudada.

As três primeiras plantas foram analisadas, conforme o método Bailenger (1979) adaptado por Ayres et al. (1991), deixando-as submersas por 24 horas para a sedimentação (Figura 13); (a) rizosfera de um exemplar de *T. domingensis*; (b) rizosfera submersa em 10L de água da torneira homogeneizada com 10 mL de solução Tween 80. O processo de centrifugação e análise microscópica também seguiu a metodologia.

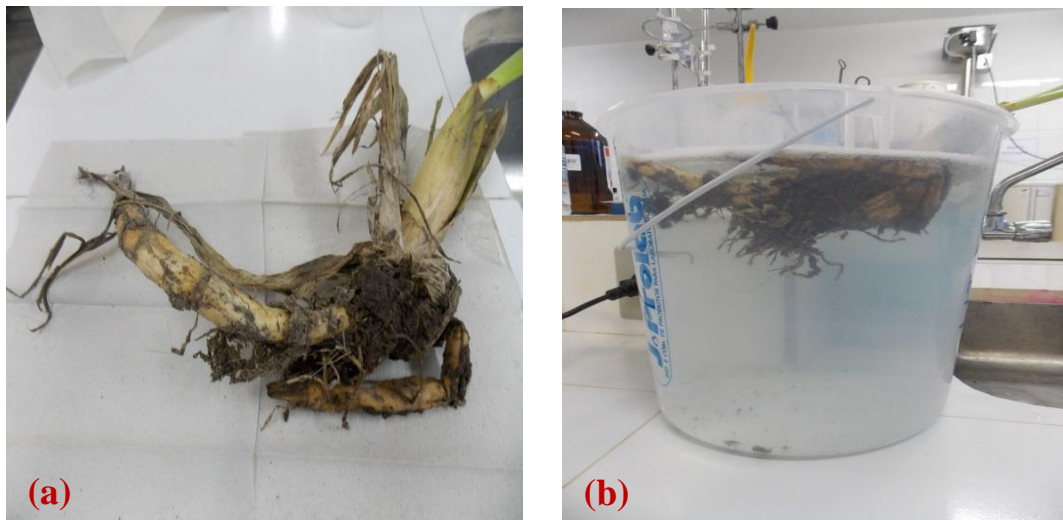


Figura 13 – (a) rizoma de um exemplar de *Typha domingensis* (b) rizoma submerso em solução contendo água da torneira homogeneizada com 10 mL de tween 80.

A partir do quarto exemplar da planta a metodologia começou a ser modificada conforme o objetivo da pesquisa.

- No quarto exemplar da planta, foi retirado o excesso do lodo, e depois submersa em 10L da solução de água da torneira com 1% de Tween 80 (detergente) por 24h conforme descrito no método de Bailenger já modificado por Ayres et al. (1991). Ao término do tempo de sedimentação a planta foi retirada e colocada em outro

recipiente contendo a mesma quantidade da solução da anterior. Nesse processo a rizosfera da planta foi escovada por 30 minutos (Figura 14) e deixada novamente em repouso para sedimentar por mais 24 horas.

As análises do 1º balde foram iniciadas logo após a retirada do rizoma, o mesmo com o segundo balde ao término do tempo de sedimentação. O processo de centrifugação e análise microscópica seguiu o método de Bailenger modificado por Ayres et al. (1991).



Figura 14 – (a) retirada de sedimentos da rizosfera da *Typha domingensis* (b) rizoma limpo depois da escovação.

- No quinto exemplar da planta, o tempo de sedimentação continuou o mesmo, mas os 10% de sedimentos que iam para a centrifugação, passaram a ser filtrados por gazes (Figura 15) por três vezes, com o intuito de reduzir a turbidez da amostra final. (a) 10 % de sedimento para análise de ovos de helmintos; (b) Funil com uma gaze para a filtração do sedimento; Na figura 16: (a) passagem do sedimento pela gaze; (b) repetição por três vezes da filtração do sedimento da amostra. Após, seguiu-se o protocolo de centrifugação e análise microscópica segundo o Bailenger modificado por Ayres et al. (1991).

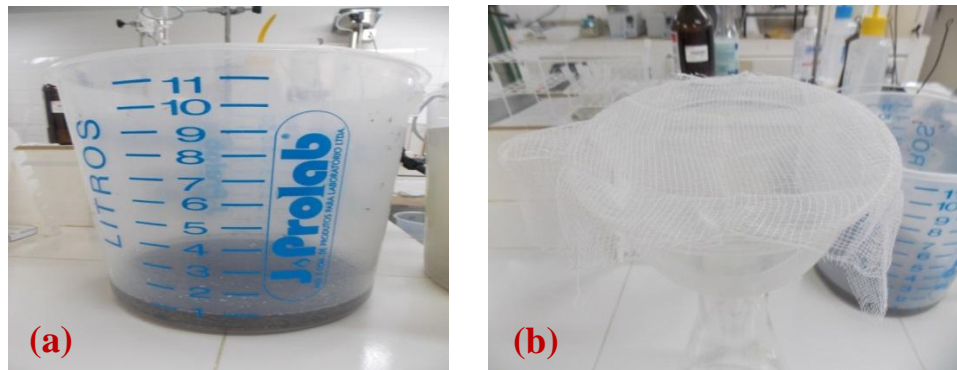


Figura 15 – Processo de filtração de sedimento. (a) balde com 10% de sedimento; (b) gaze sobre o funil acoplado em um Erlenmeyer para filtra a amostra do sedimento.

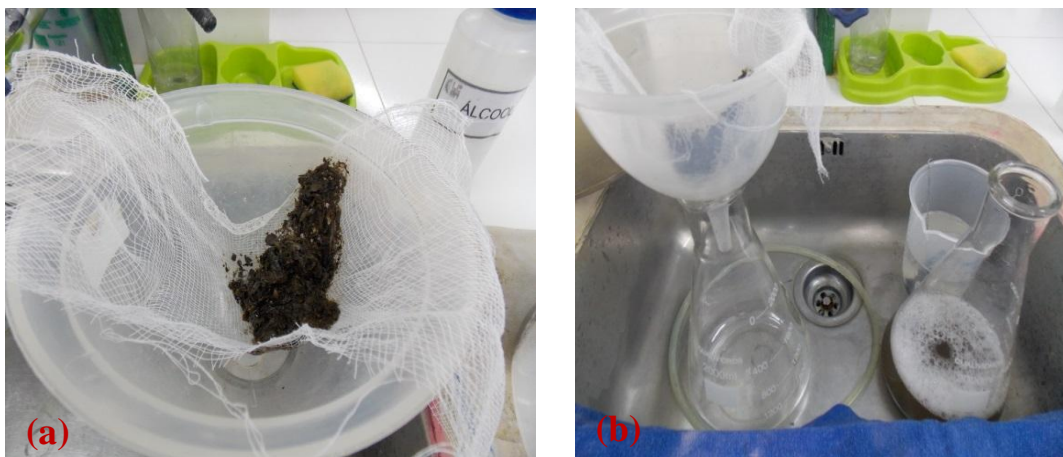


Figura 16 – Processo de filtração de sedimento. (c) sedimento retido após a primeira filtração; (d) processo de repetições de filtração.

- No sexto exemplar foi modificado a quantidade de filtração, para cinco vezes.
- No sétimo exemplar da planta foi modificado o primeiro tempo de imersão, passando a ser de 1h ao invés de 24 h e o do rizoma permaneceu por 1 h após a sua lavagem por 30 minutos. Foi modificado a quantidade de sedimento para análise. A metodologia de Bailenger (1979) mostra que é para trabalhar com 1 litro, mas para isso requer muitas centrifugações, como foram as anteriores, por serem vários tubos do tipo falcon de 50 mL até completar um litro. Então foi utilizado para esta análise somente 200 mL do que sedimentou, após já ter sido filtrado. No protocolo de análise foi modificado o tempo após adicionar o sulfato de zinco 33% no tubo contendo o sedimento até retirada da alíquota para colocar na câmara de McMaster, anteriormente era no exato momento, e nesse caso foi após 1 minuto.

- No oitavo exemplar da planta foi feito o mesmo procedimento do sétimo exemplar, com o diferencial de usar novamente 1L para centrifugar e não 200 mL.
- Nos últimos dois exemplares foi utilizado a metodologia desenvolvida e adaptada conforme está descrito na análise do sétimo exemplar da planta.

Para a detecção de oocisto de protozoários foram escolhidas duas espécies que mais acometem humanos: *Cryptosporidium* sp. e *Giardia* sp.

- Para *Cryptosporidium* sp. foi feita a mesma técnica de coleta, sedimentação e lavagem da planta para detecção de ovos de helmintos, sendo retirado 80 mL do filtrado e levado para análise com a técnica de Ziehl-Neelsen.
- Para a detecção de oocisto de *Giardia* sp. foi utilizado o método de Willis-Mallay (1921), também totalmente adaptado conforme descrito até o momento anterior de centrifugação. O método de Willis-Mallay (1921) é para amostra de fezes e na pesquisa foram realizadas análises das amostras de 80 mL da solução de sedimento de cada rizoma lavado. A amostra, depois de estar no frasco estéril de 80 mL foi deixada por mais 24h para sedimentar, e depois se deu início ao método de Willis-Mallay (1921).

### **4.3 Método Rodrigues & Wolff**

Método para avaliar a presença e enumerar ovos de helmintos presentes na rizosfera do rizoma da *Typha domingensis* e de separação de oocistos dos protozoários *Cryptosporidium* sp. e *Giardia* sp. do sedimento resultante do biofilme do rizoma da planta.

#### **4.3.1 Preliminares**

Para determinar esse método, processar e preparar amostras, bem como enumeração de ovos de helmintos e separação de oocistos de protozoários, presentes nas amostras

coletadas na rizosfera da *Typha dominigensis*, foi utilizado o método de Bailenger (1979), modificado por Ayres & Mara (1996) como base, por seu baixo custo, simplicidade e por permitir a recuperação de um considerável número de ovos de helmintos e oocistos de *Cryptosporidium* sp encontrados nas amostras de esgoto bruto da primeira fase deste trabalho.

#### 4.3.2 Equipamentos, materiais e reagentes

- Microscópio óptico comum com objetivas 10x e 40x, objetivas com régua;
- Centrífuga para operar a 1000g;
- Tubos de centrífuga de 15 mL e 50 mL;
- Agitador Vórtex;
- Mangueira de silicone;
- Câmara de McMaster;
- Frascos coletores estéreis de 80 mL;
- Pipetas de Pasteur;
- Pipetas volumétrica;
- Densímetro;
- Béquer de 50 mL, 250 mL e 500 mL;
- Balde de 10 litros;
- Solução tampão aceto-acética (pH 4,5);
- Solução de sulfato de zinco (densidade 1,18);
- Solução Tween 80;
- Éter.

#### 4.3.3 Procedimento para enumeração dos ovos de helmintos

- a) Coletar um exemplar da macrófita *Typha domingensis* em ambiente com lançamento de águas residuais;

- b) retirar todo o excesso de lodo ao redor do rizoma da planta, cortar suas folhas, deixando somente o rizoma para análise;
- c) deixar o rizoma submerso em 10 litros de solução homogeneizada de água da torneira com 10 mL de Tween 80 por 1 hora, após retirar o rizoma e transpor para outro balde com a mesma solução e mesma quantidade do primeiro balde;
- d) reservar o primeiro balde para análise;
- e) no segundo balde, lavar com auxílio de uma escova por 30 minutos ou até o rizoma estar completamente limpo;
- f) retirar o rizoma, descartá-lo e deixar o que ficou submerso na solução por mais 1 hora para sedimentar;
- g) nos dois baldes remover 90% do sobrenadante com auxílio de uma mangueira de silicone;
- h) misturar os 10% restantes no balde até que fique com aspecto homogêneo, após filtrar como uma gaze, utilizando um funil, para um Erlenmeyer de 1 litro;
- i) transferir cuidadosamente o sedimento homogeneizado para os tubos da centrífuga de 50 mL até completar com todo o sedimento, enxaguando o Erlenmeyer com solução Tween 80 1%. Para qualquer transferência do sedimento de um recipiente para outro, ou de um tubo para outro tubo, enxaguar com solução Tween 80 1%;
- j) pesar todos os tubos ajustando-os simetricamente na centrífuga e proceder a centrifugação a 1000g por 15 minutos;
- k) após a primeira centrifugação, descartar o sobrenadante, transferir todos os sedimentos para um único tubo e centrifugar novamente a 1000g por 15 minutos;
- l) descartar o sobrenadante e adicionar um volume equivalente ao sedimento contido no tubo de solução tampão aceto-acética (pH4,5). Caso o volume do sedimento seja inferior a 2mL, adicionar solução tampão até completar um volume de 4mL, agitar no Vórtex até homogeneizar a amostra com a solução tampão até que o sedimento do fundo do tubo seja misturado a solução;
- m) complementar o preenchimento do tubo com a adição de um volume de éter correspondente a duas vezes o volume do sedimento e homogeneizar a amostra no Vórtex novamente;
- n) centrifugar com rotação a 1000g por 15 minutos. Após a centrifugação, a amostra apresentará três fases distintas- no fundo do tubo se concentrará o material não gorduroso e fragmentos pesados, incluindo os ovos de helmintos, larvas e protozoários; uma fase intermediária contendo a solução tampão, que deverá ser

clara, pouco turva e uma fase superior contendo a gordura e outros materiais, que junto com o éter formam uma camada tampão espessa de cor escura;

- o) descartar todo o sobrenadante com um único movimento rápido, deixando apenas o sedimento, anotar o volume final desse sedimento;
- p) adicionar um volume de sulfato de zinco igual a 5 vezes o volume do sedimento, anotar o volume total com a solução e homogeneizar a amostra com o equipamento Vórtex;
- q) remover uma alíquota da amostra final com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e transferir para a câmara de McMaster. Deixar a câmara de contagem em repouso por 5 minutos para permitir que os ovos flutuem e atinjam a superfície do retículo de contagem;
- r) examinar no microscópio óptico em objetivas 10x ou 40x e contar todos os ovos que estão dentro de retículo. Para uma melhor precisão na enumeração dos ovos de helmintos, deve-se fazer a leitura em triplicata, calcular a média aritmética das contagens obtidas;
- s) fórmula: O número final de ovos da amostra de esgotos deve ser calculado por meio da seguinte equação 1 (item 3.3.4, página 45).

#### 4.3.4 Fluxograma da metodologia Rodrigues & Wolff

O fluxograma da metodologia Rodrigues & Wolff, foi desenvolvido para um melhor entendimento de seus processos, assim como uma melhor percepção do que foi modificado do método de Bailenger modificado por Ayres & Mara (1989).



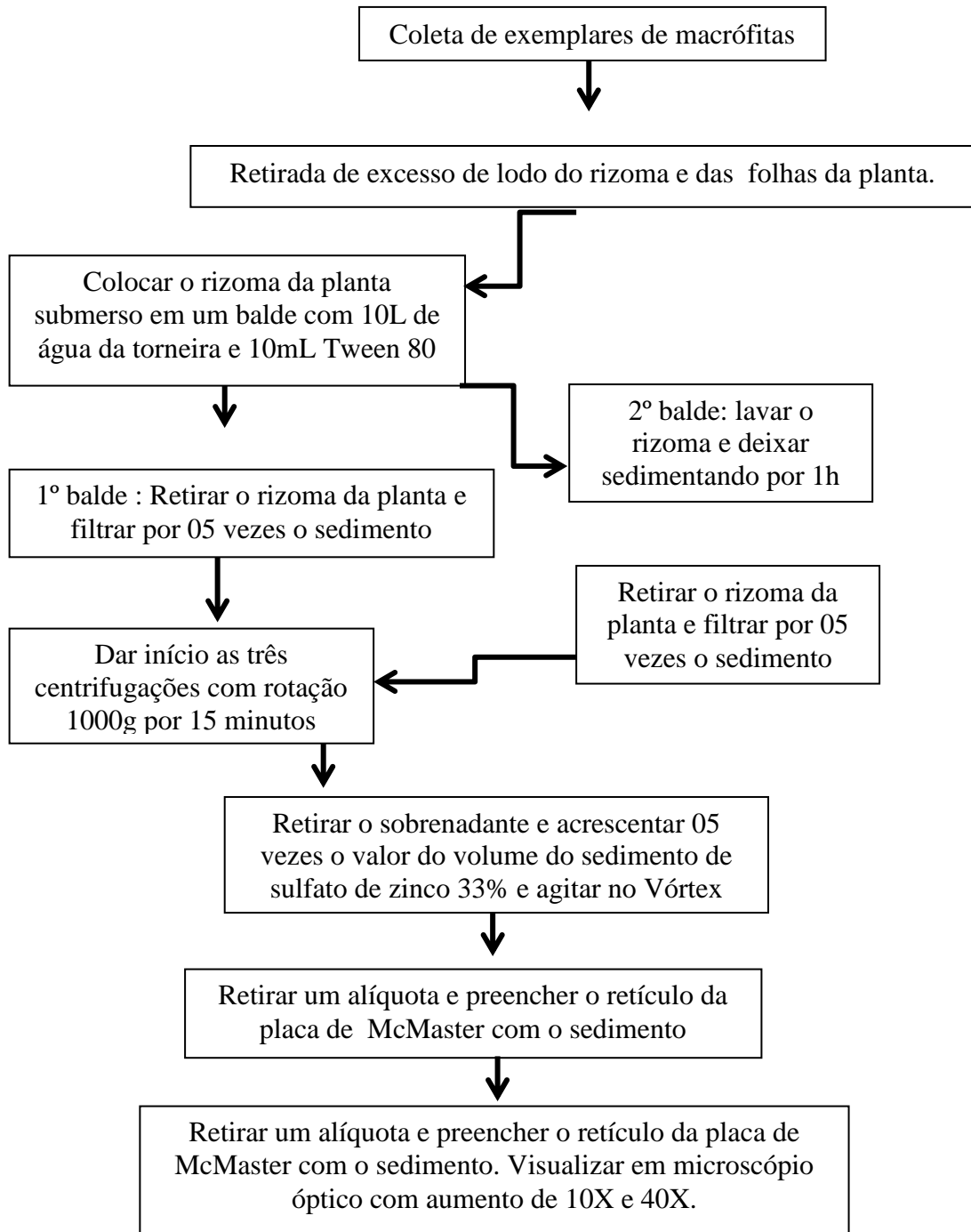


Figura 17 – Fluxograma do Método Rodrigues & Wolff

#### 4.3.5 Resultados para ovos de Helmintos no rizoma da *Typha dominigensis*

Os resultados obtidos apresentam valores menores que na fase um, mesmo assim pelos números é possível caracterizar como contaminante o rizoma dessas plantas.

Tabela 3 – Resultados do número de ovos encontrados na rizosfera do rizoma da planta *Typha domingensis*.

Rizoma da <i>Typha domingensis</i>	Data	ovo/L sedimento do rizoma	ovo/L Sedimento da rizosfera do rizoma
Exemplar 1	18/09/2014	-	-
Exemplar 2	18/09/2014	-	-
Exemplar 3	18/09/2014	-	-
Exemplar 4	23/10/2014	73	30
Exemplar 5	30/10/2014	26	50
Exemplar 6	06/11/2014	23	13
Exemplar 7	07/11/2014	93	55
Exemplar 8	20/11/2014	80	40
Exemplar 9	27/11/2014	46	18
Exemplar 10	28/11/2014	90	50
Soma		431	256
Média		61,6	36,6
Mediana		73	40
Desvio Padrão		29,6	16,6
Mínimo		23	13
Máximo		93	55

Os resultados foram satisfatórios para as análises tanto do rizoma, quanto para o da rizosfera da planta, para verificar a retenção de ovos de helmintos. Esse fator contribui para que, o solo onde é lançado no ambiente natural, no local onde essas plantas foram coletadas, seja menos contaminado. Isso possibilita uma melhor qualidade da água nos corpos receptores desse efluente.

Trabalhos com avaliação fotoquímica do rizoma da taboa (*Typha domingensis*), onde revelaram à presença de catequinas, flavanonas, flavonas, flavononóis, xantonas e taninos flobabênicos (taninos condensados) já vem sendo realizados, com o intuito de verificar a eficiência química presente nesse rizoma para combater verminoses em animais. Ao precipitar proteínas, os taninos propiciam um efeito antimicrobiano e antifúngico (MONTEIRO et al., 2005).

Bernardes (1986) relata que parte dos esgotos são incorporados pela vegetação, que é fator integrante ao processo de tratamento, e por sua vez, retira uma parcela da água, conduzindo para a atmosfera pela evapotranspiração, e parte é incorporada ao solo na forma de umidade ou através de reações químicas com os elementos que a constituem, adicionando

benefícios que regiões com lançamento de efluente doméstico possuem ao terem uma flora vasta de taboa.

Outro fator positivo e que expressa o objetivo desse trabalho é o fato que a metodologia desenvolvida pode ser considerada eficiente para detectar a presença de ovos de helmintos, levando em consideração que foi possível realizar todos os processos da metodologia e foi possível conseguir uma perfeita visualização dos ovos dos helmintos, que na metodologia de Bailenger (1979) adaptada por Ayres et al. (1991) não foi possível para a análise da amostra de sedimento da rizosfera da planta.

#### 4.3.6 Resultados da Presença de Oocistos de *Cryptosporidium* sp. e *Giardia* sp.

Os resultados obtidos da análise do rizoma e da rizosfera dos 10 exemplares de *Typha domingensis*, comparado com os resultados da primeira fase, do esgoto bruto, diferenciam pela presença de oocistos *Cryptosporidium* sp em menor quantidade. Dos 10 exemplares, 7 deram negativos para a presença de oocisto de *Cryptosporidium* sp.

Um resultado relevante é o da presença de oocisto de *Giardia* sp. (Figura 18), em uma amostra do sedimento da rizosfera de um exemplar da *Typha domingensis*. Comparando com o resultado negativo para todas as amostras da primeira fase, esse resultado positivo pode caracterizar a presença de oocistos desse protozoário presente no local de coleta.



Figura 18 – Oocisto de *Giardia* sp. presente na análise de sedimento da rizosfera do rizoma da *Typha domingensis* indicados pelas flechas.

Dos dez exemplares de plantas analisados, as três últimas amostras deram negativas para oocisto de *Cryptosporidium* sp. as demais todas positivas e somente na análise do sétimo exemplar deu positivo para oocisto de *Giardia* sp (Tabela 04).

Tabela 4 – Resultados da presença de oocistos de *Cryptosporidium* sp. e *Giardia* sp. nas análises da rizosfera do rizoma da *Typha domingensis*.

Exemplares	Oocisto de <i>Cryptosporidium</i> sp.	Oocisto de <i>Giardia</i> sp.
1	+	-
2	+	-
3	+	-
4	+	-
5	+	-
6	+	-
7	+	+
8	-	-
9	-	-
10	-	-

+ amostras positiva  
- amostras negativas

## 5 CONCLUSÃO

Estudos da eficiência da *Typha domingensis* na interceptação de ovos de helmintos e oocistos de protozoários são escassos. Para a realização desta pesquisa não foram encontrados trabalhos da análise da rizosfera desta planta para enumerar a presença de ovos de helmintos e oocistos de protozoários.

O método proposto para enumeração de ovos de helmintos e presença de oocistos de protozoários no rizoma e rizosfera da macrófita *Typha domingensis* apresentou um bom resultado, mostrando-se eficiente em caracterizar a presença dos microrganismos estudados neste trabalho.

Os resultados indicam que os oocistos de *Cryptosporidium* sp. estão amplamente disseminados no ambiente estudado e nas plantas analisada, retiradas do mesmo ambiente de lançamento de esgoto doméstico.

O método Rodrigues & Wolff com o tempo menor de sedimentação demonstrou resultados similares aos de maior tempo (BAILENGER, 1979), proporcionando assim resultados mais rápidos, com a mesma precisão.

O presente trabalho foi importante para acrescentar dados em relação ao conhecimento da eficiência de ambientes com rizomas de macrófitas na interceptação de ovos de helmintos e oocistos de protozoários que podem ser patógenos para o homem e para os animais. Abrindo assim caminhos para que novas pesquisas nessa área sejam realizadas, com a utilização de sistemas plantados com macrófitas para a retenção destes organismos quando utilizados para o tratamento de águas residuais domésticas.

## RECOMENDAÇÕES

- Dar continuidade as análises em plantas no ambiente natural, disponibilizando assim mais dados para as futuras pesquisas com a metodologia desenvolvida;
- aumentar a área estudada para se obter mais resultados precisos da remoção desses ovos de helmintos e oocistos de protozoários para verificar se os mesmo conseguem passar pela interceptação da planta;
- analisar o rizoma de plantas plantadas em um sistema com filtro para determinar a presença de ovos de helminto e oocistos de protozoários;
- analisar a viabilidades dos ovos de helmintos e oocistos de protozoários;
- realização da Análise Quantitativa de Risco Microbiológico (AQRM), com o objetivo de estimar numericamente as consequências de exposição aos protozoários patogênicos.

## REFERÊNCIAS

ABDEL-GHANI, N. T.; HEGAZY, A. K.; EL-CHAGHABY, G. A. *Typha domingensis* leaf powder for decontamination of aluminium, iron, zinc and lead: Biosorption kinetics and equilibrium modeling. **Int. J. Environ. Sci. Tech.**, 6 (2), p. 243-248, 2009.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15.495-1**: Poços de monitoramento de águas subterrâneas em aquíferos granulares - Parte 1: Projeto e construção. Rio de Janeiro, 2007.

AGUIAR, C. J. B. Monitorar para não faltar: projeto de monitoramento de aquíferos em implantação em Manaus (AM). **Água e Meio Ambiente Subterrâneo**, Revista da Associação Brasileira de Águas Subterrâneas (ABAS), 33 (5), mai./jun., 2013. Disponível em: <<http://www.abas.org/imagens/revista33.pdf>>. Acesso em: 14 jun. 2013.

ANGNES, F. B. **Prospecção de instrumentos hidrológicos para apoio à gestão em ambientes urbanos**. 2004. 113 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2004.

ANJOS, J. Â. S. A. **Avaliação da eficiência de uma zona alagadiça (wetland) no controle da poluição por metais pesados: o caso da plumbum em Santo Amaro da Purificação/BA**. Tese (Doutorado), Escola Politécnica. USP, 2003.

ARAÚJO, R. K. **Dinâmica da Contaminação por Efluente Sanitário em Área de um Campus Universitário**. 2013, 157 p. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria – Centro de Tecnologia – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, RS, 2013.

AYRES, R.; LEE, D.; MARA, D. D. The enumeration of human intestinal nematode eggs in raw and treated wastewaters. **Tropical Public Health Engineering**. March. Leeds. U.K. 1989.

AYRES, R. et al Comparison of techniques for the enumeration of human parasitic helminth eggs in treated wastewater. **Environmental Technology**, v. 12, pp. 617-623. 1991. Leeds.

AYRES R, MARA, D. **Analysis of wastewater for use in agriculture**. A laboratory manual of parasitological and bacteriological techniques. Geneva: WHO, 1996. 31p.

BAILINGER, J. Mechanisms of parasitological concentration in coprology and their practical consequences. **Journal of American Medical Technology**, 41, p. 65-71, 1979.

BERNARDES, R. F. **Estabilização de Poluentes por Disposição no Solo**. DAE 145(46): 129-145. 1986.

BIER, J. W. Isolation of parasites on fruits and vegetables. **The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health**, v. 22, p. 144-145, 1991.

BLUMENTHAL, U. J.; MARA, D. D; PEASEY, A.; RUIS-PALACIOS, G.; STOTT, R.; Guidelines for the microbiological quality of treated wastewater used in agriculture: recommendations for revising WHO guidelines. **Bulletin of the World Health Organization**, 78(9):1104-1116, 2000.

BOUHOUM, K & SCHWARTZBROD, J. Quantitative of helminth eggs in wastewater. *Zbl. Hyg.* 188, p. 322-330, 1989.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria n. 2.914, de 12 de dezembro de 2011**. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/portaria\\_2914\\_12\\_12\\_2011.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/portaria_2914_12_12_2011.pdf) [acesso 20 Dez 2014].

BRIX, H. **Wasterwater treatment in constructed wetlands: system design, removal processes, and treatment performance**. Constructed wetlands for water quality improvement. Lewis Publishers, Flórida: p. 9-22. 1993.

BROOKS, R. R. Phytoremediation by volatilisation. In: BROOKS, R. R. (Ed), **Plants that Hyperaccumulate Heavy Metals**. CAB International, Wallingford, p. 289. 1998.

CHERNICHARO, C. A. L.; ZERBINI, A. M. **Identificação e contagem de ovos de helmintos em um sistema UASB: rampas de escoamento superficial**. Brasil - João Pessoa, PB. 2001. 10p. ABES 21, João Pessoa, 2001. (Artigo técnico).

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

CORDAZZO, C. V.; SEELINGER, C. **Guia ilustrado da vegetação costeira no extremo do Brasil**. Rio Grande. FURG, 1995. 275p.



COWARDIN, L. M.; CARTER, V.; GOLET, F. C.; LaROE, E. T. **Classification of wetlands and deepwater habitats of the United States**. U.S. Fish & Wildlife Service Pub. FWS/OBS-79/31, Washington, DC. 1979.

CRAM, E. B. The effect of various treatment processes on the survival of helminth and protozoan cysts in sewage. **Sewage Works Journal**, 15: 1119-1138, 1943.

CRISPIM, W. M. C. & BARBOSA, D. C. Avaliação da eficiência do sistema de lagoas de estabilização de esgotos na remoção de ovos de helmintos – Proposta para a determinação do percentual de recuperação do método da OMS. In: 3<sup>rd</sup> IAWQ International Specialist Conference and Workshop. **Waste Stabilisation Ponds Technology and Applications**. João Pessoa/PB: 1995.

CUNHA, L. F.; AMICHI, K. R. Relação entre a ocorrência de enteroparasitoses e práticas de higiene de manipuladores de alimentos: revisão da literatura. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 7, n. 1, p. 147-157, jan./abr. 2014.

D`ÁVILA, R. F. **Ensaio metodológico de avaliação de impacto antrópico na Bacia Hidrográfica da Universidade Federal de Santa Maria - RS**. 2009. 174 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

DUBEY, J. P.; ZARNKE, R.; THOMAS, N. J.; WONG, S. K.; BONN, W. V.; BRIGGS, M.; DAVIS, J. W.; EWING, R.; MENSE, M.; KWOK, O. C. H.; ROMAND, S. & THULLIEZ, P. *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, and *Sarcocystis canis* – like infections in marine mammals. **Vet. Parasitol.** 116:275-296. 2003.

EPA Victoria, **Publication No. 464.1 (2nd revision)**. Environment Protection Agency and Department of Human Services, South Australian Reclaimed Water Guidelines (Treated Effluent). 1999. Disponível em: [www.deh.sa.gov.au/epa/pdfs/reclaimed.pdf](http://www.deh.sa.gov.au/epa/pdfs/reclaimed.pdf). Acesso em: dezembro de 2014.

ESPINOZA, D. L. et al. Enteroparasitosis en niños menores de 12 años del estado Anzoátegui – Venezuela. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología**, v. 32, p. 139-147, 2012.

ESTEVEZ, Francisco de Assis (Org.). **Fundamentos de Limnologia**. 3<sup>a</sup>. Rio de Janeiro: Interciência 2011. 826p.

FAUST, E. C.; SAWITZ, W.; TOBIE, J.; ODOM, V.; PERES, C. & LINCICOME, D. R. Comparative efficiency of various techniques for the diagnosis of protozoa and helminth in feces. **Journal of Parasitology**. p. 241-261. 1939.

FEACHEM, R.G.; BRADLEY, D. J.; GARELICK, H.; MARA, D. D. **Sanitation and Disease: Health Aspects of Excreta and Wastewater Management**. John Wiley, Chichester, 1983.

FRANCO, R. M. B. Sarcocystis, Cystoisospora e Cryptosporidium. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia Médica**. 12. ed. Atheneu: São Paulo, p. 189-198. 2011.

FREGONESI, B. M.; SAPAIO, C. F.; REGAZZI, M. F.; TONANI, K. A. A.; SEGURAMUÑOZ, S. I. *Cryptosporidium* e *Giardia*: desafios em águas de abastecimento público. **O Mundo da saúde**. São Paulo, v. 36, n. 4, p. 602-609, 2012.

GASI, T. M. T & ROSSIN, A. C. Fatores que influenciam a remoção de microrganismos em reator UASB. In: 170º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. (Trabalhos Técnicos), v.. 2 - Tomo I. **Anais**. Natal/RN: 1993b.

GRACZYK, T. K.; FRIED, B. Human waterborne trematode and protozoan infections. **Adv Parasitol**, 64: 111-160, 2007.

HADAD, H. R.; MAIANE, M.; BONETTO, C. A. **Macrophyte growth in a pilot-scale constructed wetland for industrial wastewater treatment**. Chemosphere, Oxford, v. 63, n. 10, p. 1744-1753, june 2006.

HINDIYEH, M. Y. **Enumeration and survival studies on helminth eggs in relation to treatment of anaerobic and aerobic sludges in Jordan**. PhD Thesis in Environmental Engineering. Newcastle upon Tyne. England-UK. 1995.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Ministério das Cidades. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. **Pesquisa Nacional de Saneamento Básico 2008**. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaoodevida/pnsb2008/PNSB\\_2008.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaoodevida/pnsb2008/PNSB_2008.pdf)>. Acesso em: 14 nov. 2014.

INSTITUTO TRATA BRASIL. Conselho Empresarial Brasileiro para o Desenvolvimento Sustentável. **Benefícios Econômicos da Expansão do Saneamento Brasileiro**. São Paulo: Instituto Trata Brasil/CEBDS; 2014. Disponível em: <http://www.tratabrasil.org.br/datafiles/uploads/estudos/expansao/BOOK-Benef%C3%ADcios%20-logos.pdf>. Acesso em: 01 jul 2014.

IRGANG, B. E. **Comunidades de macrófitas aquáticas da planície costeira do Rio Grande do Sul – Brasil: um sistema de classificação.** Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.

JUNK, W. J. Comunicação Pessoal. In: ESTEVES, F. A. **Fundamentos da Limnologia.** Rio de Janeiro. 1988.

KNIGHT, R. L.; KADLEC, R. H. Constructed Treatment Wetlands. A global Technology. In: **Water 21-Magazine of International Water Association.** London, IWA. p.57-58, 2000.

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

LOBO, M. L.; XIAO, L.; ANTUNES, F.; MATOS, O. Occurrence of Cryptosporidium and Giardia genotypes and subtypes in raw and treated water in Portugal. **Lett Appl Microbiol.** 2009;48(6):732-7.

LOPES, V. T. et al. Parasitas zoonóticos em fezes de cães de praças públicas em municípios da região sul do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal,** v. 08, n. 2, p. 242-250, abr-jun, 2014.

MARION, F. A. **Avaliação da vulnerabilidade das águas subterrâneas por geoprocessamento, no Campus da UFSM – RS.** 2009. 94f. Dissertação (Mestrado em Geomática) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

METCALF & EDDY, Inc. **Wastewater Engineering: Treatment and Reuse.** Fourth Edition, revised by George Tchobanoglous, Franklin L. Burton, and H. David Stensel. McGraw Hill, 2004.

MEYER, K. B.; MILLER, K. D & KANESHIRO, E. S. (1978). Recovery of Ascaris eggs from sludge. **Journal Parasitology,** 64 (2), p. 380-383.

MONTEIRO, J. M. et al. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova,** v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MITSCH, W. J.; GOSELINK, J. G. **Wetlands,** 2nd ed. John Wiley, New York. 1993.

MONTEIRO, J. M. et al. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova,** v. 28, n. 5, p. 892-6, 2005.

MOREIRA, C. M. D. **Aspectos qualitativos da água subterrânea no Campus da UFSM.** 2005. 138 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

NEVES, D. P., MELO, A. L., GENARO, O & LINARD, P. M. **Parasitologia Humana.** 10. ed. 428 p. 2000.

NEVES, D. P. (Ed). **Parasitologia Humana.** 12 ed. São Paulo: Atheneu, 2011.

NEWTON, W. L., BENNET, H. J. & FIGGAT, W. B. Observation on the effect of various sewage treatment processes upon the eggs of *Taenia saginata*. **American J. Hygiene**, 49. 166-175. 1949.

PAGANINI, W. S. **Disposição de esgotos no solo (escoamento à superfície).** Fundo editorial da AESABESP. São Paulo. 232 p. 1997.

PAULINO R. C.; CASTRO E. A.; SOCCOL V. T. Tratamento anaeróbio de esgoto e sua eficiência na redução da viabilidade de ovos de helmintos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 34, n. 5, p. 421-428, set-out. 2001.

PHILIPPI, L. S. SEZERINO, P. H. **Aplicação de Sistemas tipo Wetlands no tratamento de Águas Residuárias:** Utilização de filtros plantados com macrófitas. Florianópolis-SC. Ed. do Autor, 144p. 2004.

PLANSAB - Plano Nacional de Saneamento Básico. Ministério das Cidades. 2013

PLUTZER J, KARANIS P, DOMOKOS K, TÖRÖKNÉ A, MÁRIALIGETI K. **Detection and characterisation of Giardia and Cryptosporidium in Hungarian raw, surface and sewage water samples by IFT, PCR and sequence analysis of the SSUrRNA and GDH genes.** Int J Hyg Environ Health. 2008;211(5-6):524-33.

PNSB, 2008. **Pesquisa Nacional de Saneamento Básico 2008.** Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Rio de Janeiro, 2010.

QUINTERO-BETANCOURT, W.; PEELE, E. R.; ROSE, J. B. Cryptosporidium parvum and Cyclospora cayetanensis: a review of laboratory methods for detection of these waterborne parasites. **J Microbiol Meth**, 49:209-224, 2002.

QUINTERO-BETANCOURT, W.; ROSE, J. B. Drinking water treatment process for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. **Vet Parasitol**, 126: 219-234, 2004.

RECKZIEGEL, T. **Modelo conceitual de contaminação por emissão de efluente no solo - Bacia Escola Campus/UFSM**. 2012. 168 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil)- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

REY, L. **Parasitologia**. Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. 2. ed. Editora Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro, 731 p. 1991.

RIBEIRO, J. W.; ROOKE, J. M. S. **Saneamento básico e sua relação com o meio ambiente e saúde pública**. Juiz de Fora, 2010. Disponível em: <<http://www.ufjf.br/analiseambiental/files/2009/11/TCC-SaneamentoeSa%C3%BAde.pdf>>. Acesso em: setembro 2013.

RICHARDSON, C. J. Wetlands Chapter 13. pp. 13.0-13.44. In: MAYS, L.W. (Ed.) **Water Resources Handbook**, McGraw-Hill, Professional Book Group, New York, NY. USA. 1996.

SALATI JR., E.; SALATI, E. Wetland projects developed in Brazil. **Water Sci. Tech.**, Vol. 40, n°3, 1999. p. 19-25.

SALT, D. E.; SMITH, R. D.; RASKIN, I. Phytoremediation. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 49, p. 643-668, 1998.

SANTONI, L. **Saneamento básico e desigualdades: o financiamento federal da política pública (2003-2009)**. Dissertação de Mestrado. Brasília, 2010.

SEZERINO, P. H.; PHILIPPI, L. S. Utilização de um sistema experimental por meio de “Wetland” construído no tratamento de esgotos domésticos pós tanque séptico.

SILVERMAN, P. H. & GRIFFITHS, R. B. A Review of methods of Sewage Disposal in Great Britain with special reference to the epizootiology of *Cysticercus bovis*. *Tropical Med. And Parasitology*, 49: 436-450. *Apud* HINDIYEH. **Enumeration and survival studies on helminth eggs in relation to treatment of anaerobic and aerobic sludges in Jordan**. PhD Thesis in Environmental Engineering. Newcastle upon Tyne. England-UK. 1955.

SILVESTRE, A.; PEDRO-DE-JESUS, M. **Tratamento de Águas Residuais Domésticas em Zonas Húmidas Artificiais**. 2002. Monografia de Final de Curso, Instituto Superior Técnico, Departamento de Engenharia Biológica e Química. 2002.

SIMPÓSIO LUSO-BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, IX., 2000, Porto Seguro. **Anais...** Rio de Janeiro: ABES, 2000. 1 CDROM.

SHORTT, R. L.; BOELEE, E.; MATSUNO, Y.; MADRAMOOTOO, C.; VAN DER HOEK W, FAUBERT, G. Cryptosporidium and Giardia as determinants for selection of an appropriate source of drinking-water in southern Sri Lanka. **J Health Popul Nutr.** 2006;24(1):64-70.

SMITH, H. V. & ROSE, J. B. 1998. Waterborne Cryptosporidiosis: current status. **Parasitol. Today** 14:14-22.

SOCCOL, V.T., PAULINO, R. C., CASTRO, E. A. Capítulo 3 – Aspectos Sanitários - Agentes patogênicos: helmintos e protozoários. In: **Reciclagem de biossólidos - Transformando Problemas em Soluções.** SANEPAR, FINEP, p. 156-173, 1999.

STEIN, J. L.; SCHWARTZ, B. J. **Technique des concentration venefs d' helminthes; valcurs et limiters; proceedings collgues; egux continentals resources of assainssement.** 1986; 48.

TINER, R. W. **Wetland Indicators: A Guide to Wetland Identification, Delineation, Classification, and Mapping.** Lewis Publishers, CRC Press, Boca Raton, FL. 1999.

THE RAMSAR CONVENTION. Disponível em: <http://www.ramsar.org/>. Acesso em: 23 de dezembro de 2014.

UKBERNARDES, R. F. Estabilização de Poluentes por Disposição no Solo. DAE 145(46): 129-145. 1986.

UNITED States Environmental Protection Agency. **Constructed Wetlands Treatment of Municipal Wastewaters;** EPA/625/R-99/010; Cincinnati, Ohio. 1999.

VARDANYAN, L. G.; INGOLE, B. S. **Studies on heavy metal accumulation in aquatic macrophytes from Sevan (Armênia) and Carambolin (Índia) lake systems.** Environment International, v. 32, n. 2, p. 208-218, 2006.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos.** Volume 1: Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. 3. ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, UFMG, 2005.

WILLIS, H. H. A simple levitation method for the detection of wookworm ova. **Medicine Journal of Australia**, v. 8, p. 375-376, 1921.

WHO – Health Guidelines for the Use of Wastewater in Agriculture and Aquaculture. Report of a WHO S cientific Group Technical Report Series N. 778, World Health Organization., Geneva, 1989.

XIAO, L.; FAYER, R. Molecular characterisation of species and genotypes of Cryptosporidium and Giardia and assessment of zoonotic transmission. **Int J Parasitol.** 2008;38(11):1239-55.

ZERBINI, A. M.; CHERNICHARO, C. A. L. **Análise da influência de sólidos sedimentáveis na contagem de ovos de helmintos pelo método de BAILENGER modificado.** Brasil - João Pessoa, PB. 2001. 8p. ABES 21, João Pessoa, 2001. (Artigo técnico).