

## **A INFLUÊNCIA DA POROSIDADE DO PAPEL DE MICROFIBRA DE VIDRO NA DETERMINAÇÃO DOS SÓLIDOS SUSPENSOS, DBO E DQO FILTRADAS**

**Edna Toledo\*, Bárbara Zanicotti Leite e Miguel Mansur Aisse**

*\* Pontifícia Universidade Católica do Paraná; Rua Imaculada Conceição, 1155, Prado Velho; Curitiba – PR; CEP 80 215 – 901; edna@rla13.pucpr.br*

### **INTRODUÇÃO**

Na discussão de aspectos metodológicos das análises físico-químicas, durante reuniões da Rede do PROSAB 2 (Tema 2), foi identificada grande diversidade da porosidade do papel de microfibra de vidro, utilizado nas determinações de Sólidos Suspensos, DBO e DQO Filtradas.

Entre as várias marcas existentes no mercado, o ISAM-PUCPR, juntamente com a CAESB, fazem uso do papel microfibra SS GF/50 (Schleicher & Schull), pela facilidade de aquisição e pelo baixo custo. Foi, então, sugerido pela Rede PROSAB, um estudo comparativo entre os diferentes papéis que estão sendo usados por esta.

A filtração é a retenção de partículas presentes em um fluido (água ou esgoto sanitário, por exemplo), quando da passagem deste em um material poroso, fibroso ou granular. Vários aspectos influenciam na filtração, dentre eles cabe citar:

- características químicas, conteúdo iônico, viscosidade do fluido;
- deformabilidade e tamanho das partículas. O esgoto apresenta partículas deformáveis (proteínas, lipídeos, microorganismos) e partículas não deformáveis (areia, cristais, carvão etc);
- velocidade e pressão de filtração aplicadas;
- tamanho e tipo de filtro.

Nos laboratórios de análises, a filtração é realizada fazendo-se passar um fluido através de papel filtro, constituído por mantas sobrepostas em camadas, onde certas partículas ficam retidas nestas camadas, ao longo de sua profundidade.

Na Tabela 1 são apresentadas algumas características de papéis microfibra de vidro disponíveis no mercado. A ausência da resina de ligação entre as fibras do material filtrante, citado como característica do papel Millipore AP 40, significa que o filtro mantém integridade estrutural, sem perda de peso quando calcinado a 550° C, após a filtração.

Tabela 1 - Características de papéis microfibras de vidro

Especificação técnica	WHATMAN 934-AH	WHATMAN GFA	GELMAN A/E	MILLIPORE AP40	WHATMAN GF/C	SS GF 50A
Retenção de partículas	1,5 µm	1,6µm	1,0µm	Nominal não especificada	1,2 µm	0,4 a 1,0µm
Código do fabricante	1827-047	1820-047	61631	-----	-----	-----
Material filtrante	Borossilicato	Borossilicato	-----	Borossilicato, sem resina de ligação	-----	Borossilicato

Segundo o STANDARD METHODS (1998), Sólidos Dissolvidos é a porção de sólidos que passa através de um filtro de porosidade nominal de 2µm (ou menor), sob condições específicas, e Sólidos Suspensos é a porção retida no filtro.

Nos aspectos referentes ao material de consumo, são referenciadas as seguintes especificações: WHATMAN 934-AH, GELMAN TIPO A/E, MILIPORE TIPO AP40; E-D Scientific specialties grade 161e Environmental – Express Pro Weigh.

METCALF & EDDY (1991) citam que os Sólidos Totais podem ser classificados como não filtrados (suspensos) ou filtrados, e ainda sugerem o tipo fibra de vidro, com uma porosidade nominal de 1,2 µm (Whatman GF/C) ou o filtro de polycarbonato de mesma porosidade. No entanto, alertam os autores que os resultados podem ser diferentes, devido às diferenças nas estruturas dos filtros.

VON SPERLING (1997) cita que embora os efluentes dos reatores biológicos possam conter uma elevada concentração de sólidos em suspensão (sólidos biológicos constituintes da biomassa), estes sólidos são removidos na etapa posterior de decantação. Assim, no dimensionamento ou avaliação da eficiência do reator, não há sentido em se considerar a DBO total, efluente do mesmo, que pode ser muito maior que a DBO afluente, devido à elevada concentração de matéria orgânica em suspensão, representada pela população microbiana. Surgem, então, os conceitos de DBO e DQO filtradas para avaliar o desempenho dos reatores, e DBO e DQO em suspensão para o desempenho da unidade de decantação final.

Quanto à precisão dos resultados analíticos, a análise realizada em amostra sintética, testada por 74 laboratórios, com uma DQO de 200 mg/L, na ausência de cloretos, revelou um desvio padrão de  $\pm 13$  mg/L (coeficiente de variação de 6,5%). A DQO de 160 mg/L e 100 mg/L de cloretos revelou um desvio padrão de  $\pm 14$  mg/L (coeficiente de variação de 10%). Para os Sólidos Suspensos Totais, um desvio padrão de 5,2 mg/L (coeficiente de variação de 33%) em 15 mg/L, 24 mg/L (coeficiente de variação de 10%) em 242 mg/L e de 13 mg/L (coeficiente de variação de 0,76%) em 1707 mg/L foram obtidos, em estudos, com dois analistas de quatro séries, com dez determinações cada. Duplicatas de análises de 50 amostras de água e esgoto foram feitas, em um só laboratório, com um desvio padrão de diferenças de 2,8 mg/L. A DBO apresenta resultados extremamente variados, sendo sugerido um controle interno com até  $X \pm 3\sigma$  para a solução padrão de ácido glutâmico-glicose (STANDARD METHODS, 1998).

## OBJETIVO

Avaliar a influência da porosidade dos papéis de microfibra de vidro e consolidar uma metodologia padronizada para avaliação dos parâmetros citados, com análise de qualidade dos resultados obtidos.

## METODOLOGIA

Os critérios para a seleção dos diversos tipos de papel levaram em consideração, além das recomendações citadas acima, a possibilidade de comparações com os tipos que estão sendo utilizados pelas instituições integrantes da Rede PROSAB.

Optou-se, então, pelo estudo comparativo dos papéis WHATMAN 934-AH (indicado pelo STANDARD METHODS, 1998), SS GF/50 – Schleicher & Schull (utilizado pelo ISAM – PUC/PR e CAESB) e, ainda, WHATMAN GFA.

Foram feitas análises em três tipos de amostras: esgoto bruto, efluente de sistema UASB + Filtro Biológico Aerado Submerso e efluente de sistema UASB + Filtro Biológico. Os reatores citados integram a Instalação Piloto projetada, construída e operada pelo ISAM / PUCPR, junto à ETE Belém da SANEPAR, em Curitiba-PR, que recebe esgoto doméstico, gradeado e desarenado nas unidades de escala real, operando com vazões de 250 a 500 L/h.

Nas determinações da DQO filtrada, feitas pelo método de refluxo aberto, preparou-se previamente o papel de microfibra com o auxílio do sistema de filtração, fazendo-se passar por este 20 mL de água destilada. Filtrou-se uma alíquota de 50 mL de amostra, separadamente em cada tipo de papel de microfibra.

Para as análises de DBO filtrada, feitas pelo método da azida sódica modificada, inicialmente preparou-se o papel de microfibra, fazendo-se passar por este 20 mL de água destilada. Filtrou-se uma alíquota de 500 mL de amostra, separadamente em cada tipo de papel de microfibra.

Na determinação dos valores de Sólidos Suspensos, fixos e voláteis, preparou-se previamente o papel de microfibra com o auxílio do sistema de filtração, fazendo-se passar, por três vezes consecutivas, 20 mL de água destilada. O papel foi então levado para a estufa, por uma hora, em temperatura de  $103\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$  e em seguida para a mufla, por 15 minutos, em temperatura de  $550\text{ }^{\circ}\text{C}, \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Após o esfriamento, em dessecador, pesou-se e procedeu-se à filtração de uma alíquota de 100 mL das amostras, separadamente em cada tipo de papel de microfibra.

Os resultados finais foram comparados para observar se existiram diferenças entre os papéis utilizados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na discussão dos resultados, os dados com desvio muito grande, que poderiam ser causados por erros analíticos, não foram excluídos da análise, já que uma equipe bastante variada trabalhou nas determinações.

Com relação aos resultados obtidos nas determinações de DQO filtrada, observou-se uma tendência (não estatística) da influência do papel de microfibra, apesar de muitos valores terem

ultrapassado o desvio proveniente da precisão analítica recomendada pelo STANDARD METHODS (1998). Sendo assim, o papel SS GF/50 apresentou os menores resultados devido à maior percentagem da DQO particulada ter sido retida, como o esperado, uma vez que este papel, dentre os três utilizados nas determinações, é o que tem o menor diâmetro de poros.

Considerando-se uma precisão analítica de 10% para a análise de Sólidos Suspensos, foram poucos os resultados que ultrapassaram este desvio. Observou-se uma tendência, como esperada, de que o papel SS GF/50 retivesse uma maior quantidade de sólidos, por apresentar a menor porosidade entre os três papéis em estudo.

Nas determinações de DBO filtrada, o pequeno número de amostras, aliado ao grande desvio analítico do método em si, tornaram difícil a visualização de uma tendência entre os resultados.

As Tabelas 2 a 4 e a Figura 1 apresentam os resultados obtidos nas análises realizadas.

TABELA 2 - DQO filtrada (mg/L) para diferentes tipos de papel microfibra								
AMOSTRA	DATA	TIPO DE PAPEL MICROFIBRA						
		WHATMAN 934-AH		WHATMAN GFA		SS GF/50		
		resultado	desvio (%)	resultado	desvio (%)	resultado	desvio (%)	
Esgoto Bruto	02/06/00	166	4,9	174	0,3	184	-5,2	
	02/06/00	174	2,2	188	-5,5	172	3,3	
	02/02/01	74	3,4	82	-6,8	74	3,4	
	12/03/01	170	-11,3	148	3,2	141	8,1	
	04/07/01	141	12,8	183	-12,8	162	0,0	
	06/07/01	262	8,5	290	-1,3	307	-7,1	
	11/07/01	166	-2,4	166	-2,4	154	4,9	
	DSFBAS (1)	18/08/00	27	8,1	32	-9,7	29	1,6
		24/08/00	50	2,5	46	10,0	58	-12,5
		13/09/00	21	-7,1	16	14,3	21	-7,1
17/01/01		42	0,6	46	-8,4	39	7,8	
02/02/01		42	-1,9	35	15,1	47	-13,2	
04/07/01		46	-94,1	17	29,4	8	64,7	
06/07/01		178	-6,6	166	0,8	158	5,8	
11/07/01		79	1,6	79	1,6	83	-3,3	
DSFB (2)		18/08/00	55	-5,1	55	-5,1	47	10,2
		18/08/00	55	-4,6	55	-4,6	48	9,1
	24/08/00	65	0,0	69	-5,9	61	5,9	
	13/09/00	21	-15,4	21	-15,4	12	30,8	
	17/01/01	50	-17,6	46	-8,6	31	26,2	
	02/02/01	47	-9,1	51	-18,2	31	27,3	
	04/07/01	25	10,0	37	-35,0	21	25,0	
	06/07/01	166	5,7	191	-8,5	171	2,8	
	11/07/01	95	-9,1	87	0,0	79	9,1	

(1) DSFBAS, é o decantador secundário do filtro biológico aerado submerso;

(2) DSFB, é o decantador secundário do filtro biológico.

TABELA 3 - Sólidos Suspensos Totais (mg/L) para diferentes tipos de papel microfibra

AMOSTRA	DATA	Papel WHATMAN 934-AH				Papel WHATMAN \GFA				Papel SS	
		resultados		desvio		resultados		desvio		resultados	
		SST	SSF	SSV	SST (%)	SST	SSF	SSV	SST (%)	SST	SSF
Esgoto Bruto	02/06/00	170	40	130	1,9	170	15	155	1,9	180	45
	02/06/00	165	45	120	1,0	155	25	130	7,0	180	35
	02/06/00	155	20	135	11,4	175	20	155	0,0	195	55
	12/02/01	72	29	43	4,4	72	9	63	4,4	82	81
	09/03/01	218	38	180	-2,3	203	49	154	4,7	218	42
	04/07/01	300	84	216	0,0	306	67	239	-2,0	294	64
	06/07/01	282	34	248	-4,3	270	67	203	0,1	259	51
DSFBAS (1)	11/07/01	171	30	141	1,5	193	41	152	-11,1	157	30
	22/08/00	70	0	70	19,2	100	0	100	-15,4	90	0
	22/08/00	90	30	60	0,0	90	0	90	0,0	90	0
	06/03/01	15	6	9	18,2	20	3	17	-9,1	20	6
	09/03/01	40	12	28	-5,3	38	11	27	0,0	36	12
	04/07/01	29	6	23	-6,1	26	2	24	4,9	27	4
	06/07/01	28	6	22	2,3	32	3	29	-11,6	26	2
DSFB (2)	11/07/01	13	1	12	4,9	14	1	13	-2,4	14	2
	02/06/00	84	30	54	0,0	88	34	54	-4,8	80	30
	02/06/00	82	30	52	3,1	86	32	54	-1,6	86	26
	02/06/00	84	30	54	3,8	80	32	48	8,4	98	30
	22/08/00	90	30	60	22,9	120	10	110	-2,9	140	10
	22/08/00	190	30	160	-29,5	130	0	130	11,4	120	0
	06/03/01	15	2	13	13,5	18	2	16	-3,8	19	2
	04/07/01	53	12	41	-1,3	51	9	42	1,6	52	14
	06/07/01	282	34	248	-4,3	270	67	203	0,1	259	51
	11/07/01	58	10	48	7,9	64	13	51	-1,6	67	13

(1) DSFBAS, é o decantador secundário do filtro biológico aerado submerso;

(2) DSFB, é o decantador secundário do filtro biológico.

TABELA 4 - DBO filtrada (mg/L) para diferentes tipos de papel microfibra

AMOSTRA	DATA	TIPO DE PAPEL MICROFIBRA							
		WHATMAN 934-AH		WHATMAN GFA		SS GF/50		média	
		resultado	desvio (%)	resultado	desvio (%)	resultado	desvio (%)		
Esgoto Bruto	02/06/00	95	-1,0	89	4,9	98	-3,9	94	
	02/06/00	89	11,5	102	-0,8	112	-10,8	101	
	06/07/01	143	1,2	149	-2,6	143	1,4	145	
DSFBAS (1)	18/08/00	6	3,7	8	-21,6	5	17,9	6	
	06/03/01	2	27,6	3	-2,7	4	-24,9	3	
	06/07/01	23	2,9	25	-4,5	24	1,7	24	
DSFB (2)	18/08/00	16	-3,6	13	11,1	16	-7,6	15	
	06/03/01	3	4,1	4	-18,6	3	14,5	3	
	06/07/01	22	23,7	29	-1,7	35	-22,0	28	

(1) DSFBAS, é o decantador secundário do filtro biológico aerado submerso;

(2) DSFB, é o decantador secundário do filtro biológico.

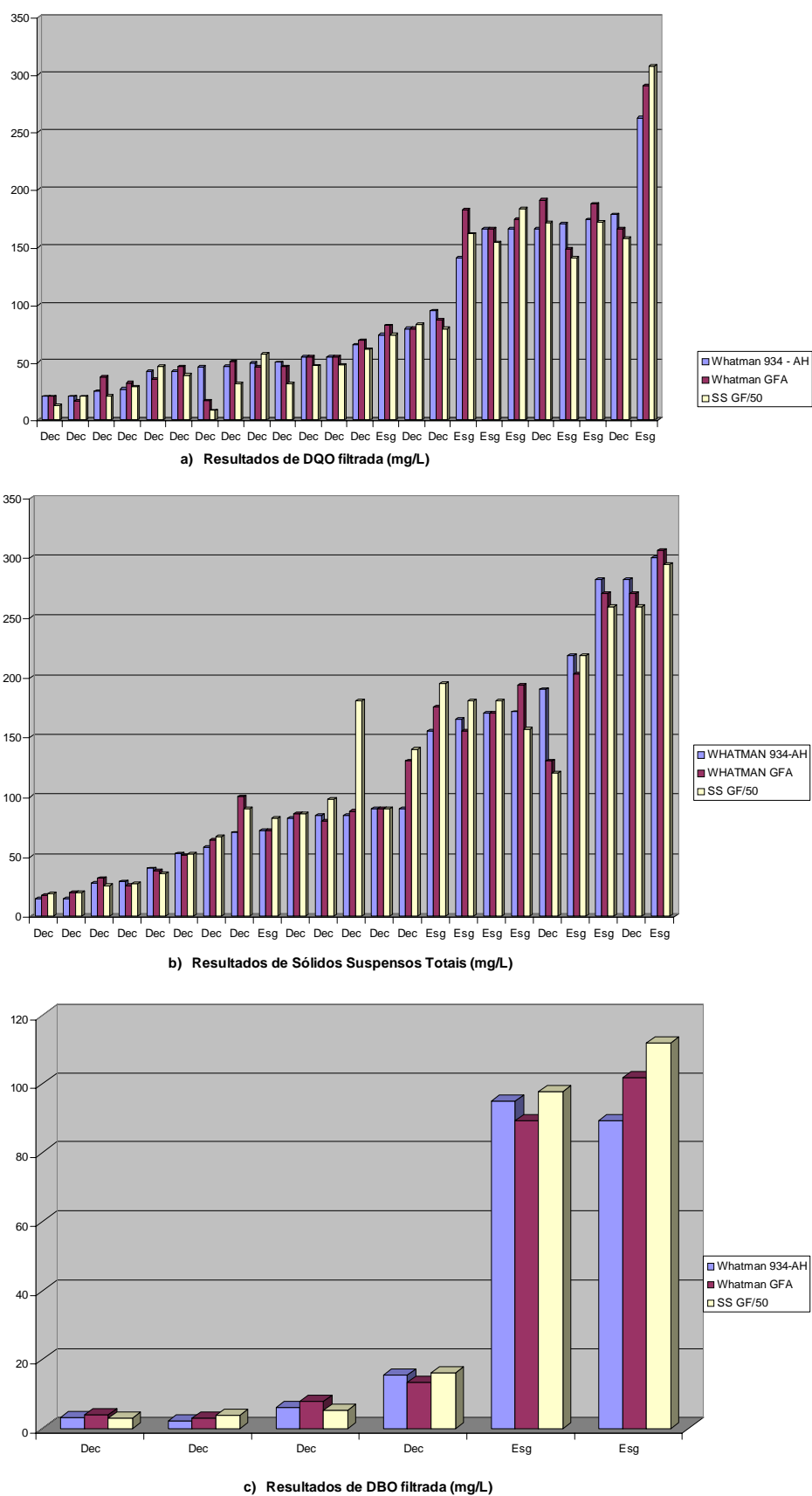


Figura 1 – Resultados de DQO (a), Sólidos Suspensos Totales (b) e DBO (c), utilizando diferentes tipos de papel microfibrá

## CONCLUSÕES

O presente trabalho apresentou um estudo comparativo entre três papéis de microfibra de vidro utilizados nas determinações analíticas de Sólidos Suspensos e DQO e DBO filtradas, de amostras de esgoto sanitário bruto, efluente de sistema UASB + Filtro Biológico Aerado Submerso e efluente de sistema UASB + Filtro Biológico.

Na observação destes resultados preliminares, foi possível constatar uma tendência (não estatística) da porosidade do papel microfibra de vidro influenciar nos resultados das determinações de DQO filtrada e Sólidos Suspensos. Com relação às determinações de DBO filtrada, ainda não foi possível a observação desta tendência.

Em face do pequeno número de amostras, recomenda-se um estudo mais intenso e extenso para a formulação de conclusões estatisticamente sustentáveis.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à SANEPAR e ao PROSAB, através da FINEP, CNPq e CEF, todo o apoio demonstrado ao longo do desenvolvimento dos trabalhos, desde a construção da instalação piloto, até o acesso à ETE Belém e o financiamento da operação e monitoramento.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APHA, AWWA, WEF (1998). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20<sup>o</sup> Edition, Washington, DC, APHA.
- COLE PARMER. Catálogo 1999/2000. 238p.
- METCALF & EDDY (1991). Wastewater characteristics. In: *Wastewater Engineering, Treatment, Disposal and Reuse*. 3<sup>rd</sup> ed., Mc Graw Hill: New York, p. 47 - 119.
- SCHLEICHER & SCHUELL (2000). Catálogo de filtração.
- VON SPERLING, M. (1997). *Princípios de tratamento biológico de águas residuárias*. DESA, UFMG: Belo Horizonte.
- VWR – Catálogo 97/98, 633 p.



## **METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE MATÉRIA ORGÂNICA ESPECÍFICA EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS**

**Carlos Eduardo Blundi\* e Roberto Franca Gadêlha**

*\* Escola de Engenharia de São Carlos – Departamento de Hidráulica e Saneamento, Avenida Trabalhador São Carlense, 400 - 13566-590 São Carlos SP*

### **INTRODUÇÃO**

A matéria orgânica presente em águas residuárias, devido à sua constituição complexa, é, normalmente, determinada através de métodos indiretos, tais como a Demanda Química de Oxigênio (DQO) e Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), comumente empregados em laboratórios de saneamento.

Objetivando um conhecimento mais específico da matéria orgânica presente em águas residuárias, procedeu-se a um estudo sobre a adaptação de métodos analíticos colorimétricos de determinação de proteínas, carboidratos e lipídios, para aplicá-los em tais amostras, uma vez que esses compostos encontram-se frequentemente presentes em esgotos sanitários, em despejos de laticínios, em frigoríficos, em abatedouros, em indústrias de bebidas e outros, constituindo parte dessa matéria orgânica.

Essas determinações têm o objetivo de trazer economia, rapidez e precisão aos ensaios, não constituindo metodologia substitutiva, mas sim alternativa complementar em relação às usuais.

### **METODOLOGIA**

Apresentam-se, a seguir, os métodos para determinação de Proteínas, Carboidratos, Lipídios em águas residuárias.

#### **Proteínas**

##### Método do micro-biureto modificado para a determinação de proteínas

O método utilizado para a determinação da concentração das proteínas é o método do micro-biureto modificado, baseado na metodologia descrita por STICKLAND (1951). O método do micro-biureto modificado consiste na adição de hidróxido de sódio e sulfato de cobre à solução que contém proteínas. O excesso de sulfato de cobre é removido por centrifugação. Mede-se a absorbância do sobrenadante, que apresenta cor violeta, a 310 nm no espectrofotômetro BAUSCH & LOMB, modelo 601. A intensidade da cor desenvolvida é proporcional à quantidade de proteínas presente na amostra.

A concentração de proteínas presente nas amostras é determinada com o auxílio de uma curva padrão previamente construída, por exemplo, uma curva construída para caseína (Merck, P.A.), (Figura 1).

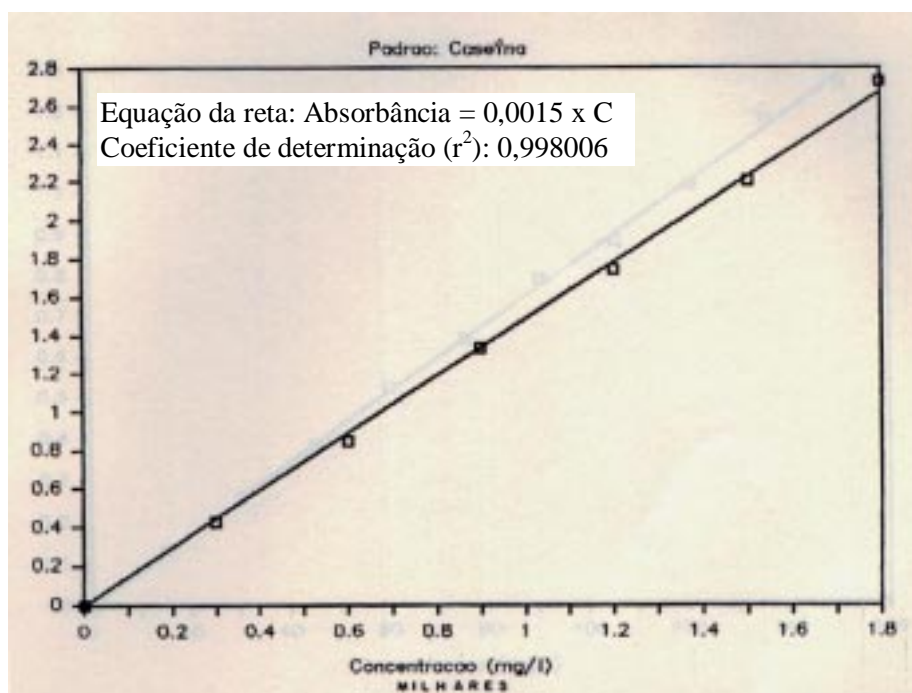


Figura 1 - Curva padrão para proteínas (Padrão: Caseína)

A determinação de proteínas deve ser realizada em triplicata, sendo a absorbância média considerada para cálculo da concentração de proteínas.

#### Reagentes

- solução de hidróxido de sódio, 20%: dissolve-se 20 g de hidróxido de sódio (NaOH, Merck, P.A.) até completar 100 mL de água destilada;
- solução de sulfato de cobre, 25%: dissolve-se 25 g de sulfato de cobre penta-hidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , Merck, P.A.) até completar 100 mL de água destilada;
- polímero : DREWFLOC (1 g/L).

#### Procedimento

Adiciona-se à 4,0 mL de solução contendo proteínas, 0,03 mL da solução de NaOH, 20%. A seguir, adiciona-se 0,06 mL da solução de  $\text{CuSO}_4$ , 25% e agita-se lentamente a mistura com uma bagueta de vidro, promovendo a floculação da amostra. Adiciona-se 0,03 mL de polímero (0,062 mL de  $\text{CuSO}_4$ , 25%), agita-se lentamente e adiciona-se 0,70 mL de NaOH, 20%, agitando-se novamente (lentamente). Centrifuga-se a 7000 rpm por 10 minutos e procede-se à leitura a 310 nm. Deve ser preparado um branco, substituindo-se a amostra por água destilada. O fluxograma do procedimento apresenta-se na Figura 2.

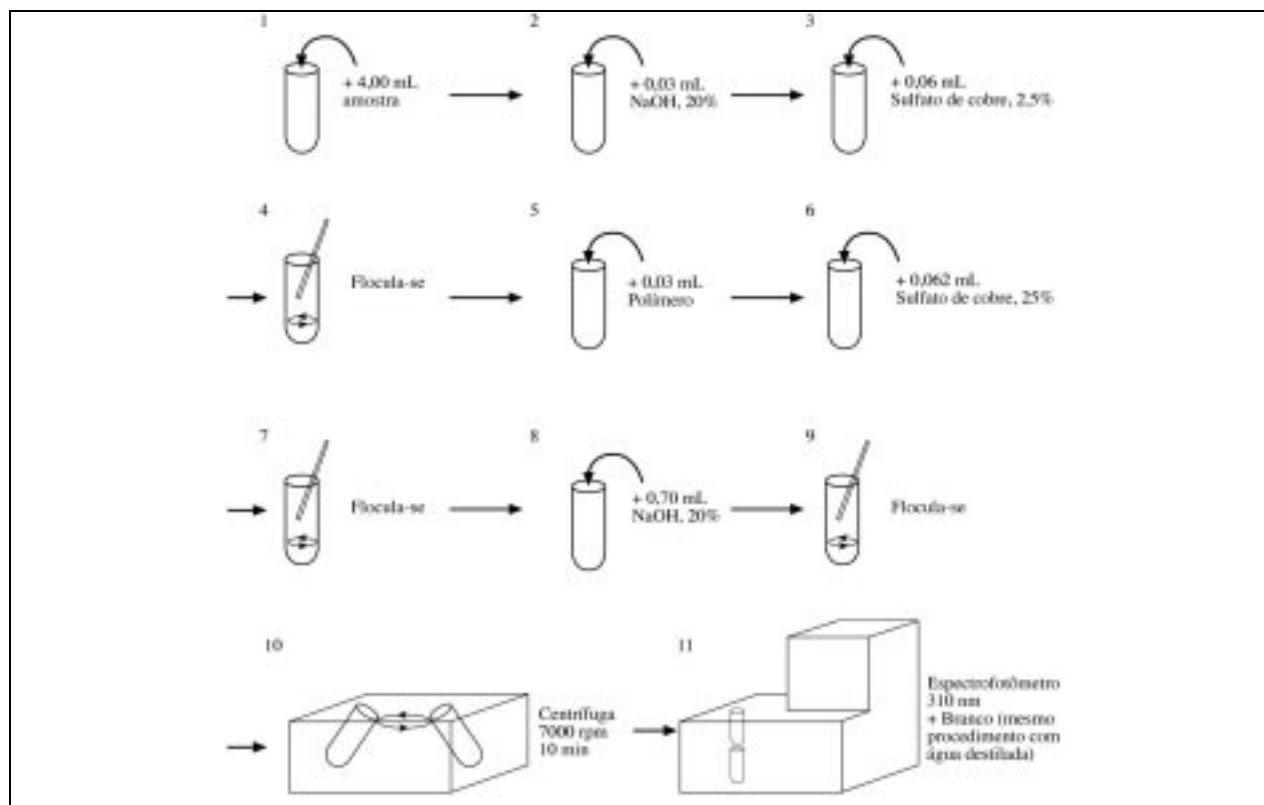


Figura 2 – Método do micro-biureto modificado para a determinação de proteínas - Procedimento

## Carboidratos

### Método do fenol e ácido sulfúrico para a determinação de carboidratos

O método utilizado para a determinação de carboidratos é o método do fenol e ácido sulfúrico, baseado na metodologia descrita por DUBOIS et al.; GILLES; HAMILTON (1956), que consiste na adição de fenol e de ácido sulfúrico concentrado, os quais em presença de carboidratos, resultam em uma cor laranja. A absorbância é lida a 488 nm, no espectrofotômetro BAUSCH & LOMB, modelo 601.

A concentração de carboidratos presentes nas amostras é determinada através de uma curva padrão previamente construída, por exemplo para a lactose (Merck, P.A.) (Figura 3).

Este método é rápido e simples, com resultados bastante reprodutíveis, sendo a cor produzida estável por horas. A determinação dos carboidratos deve ser realizada em tréplica, sendo a absorbância média considerada para cálculo da concentração de carboidratos.

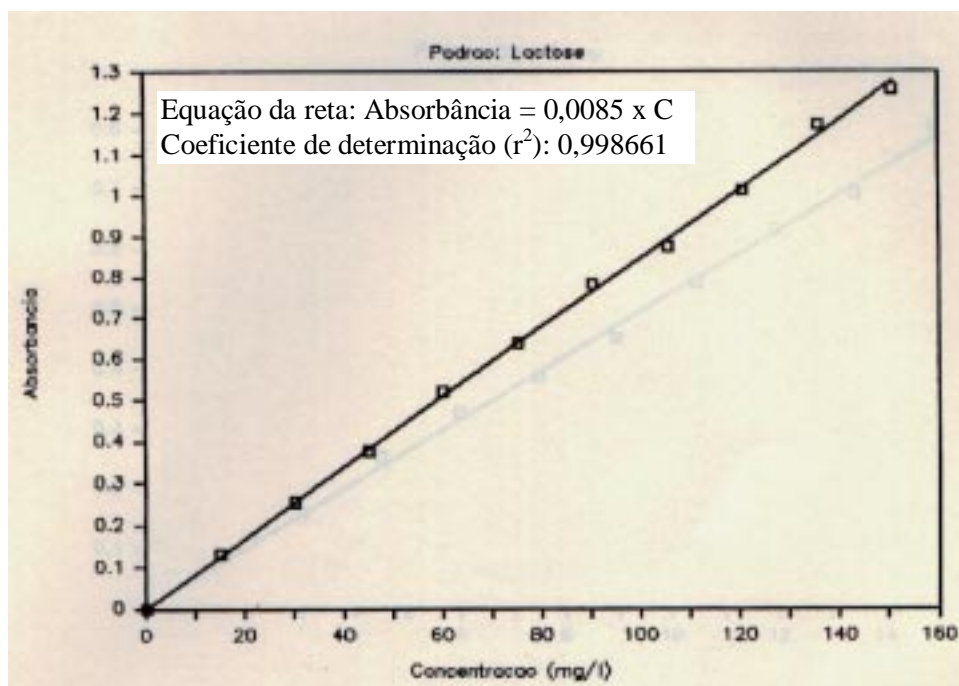


Figura 3 - Curva padrão para carboidratos (Padrão: lactose)

### Reagentes

- ácido sulfúrico concentrado ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , Merck, P.A.);
- solução de fenol (Synth, P.A.) a 5% (peso/volume).

### Procedimento

Toma-se 0,5 mL da amostra a ser analisada, adiciona-se 0,5 mL de solução de fenol a 5% e 2,5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . O ácido deve ser adicionado rapidamente, com jato direcionado para a superfície do líquido, de modo a se obter uma boa mistura. Os tubos de ensaio são deixados em repouso por 10 minutos, período após o qual são agitados e depois colocados em um banho de água entre 25 e 30 °C por 15 minutos. A absorbância é lida a 488 nm. Deve ser preparada uma amostra em branco, substituindo-se a amostra por água destilada. O fluxograma do procedimento apresenta-se na Figura 4.

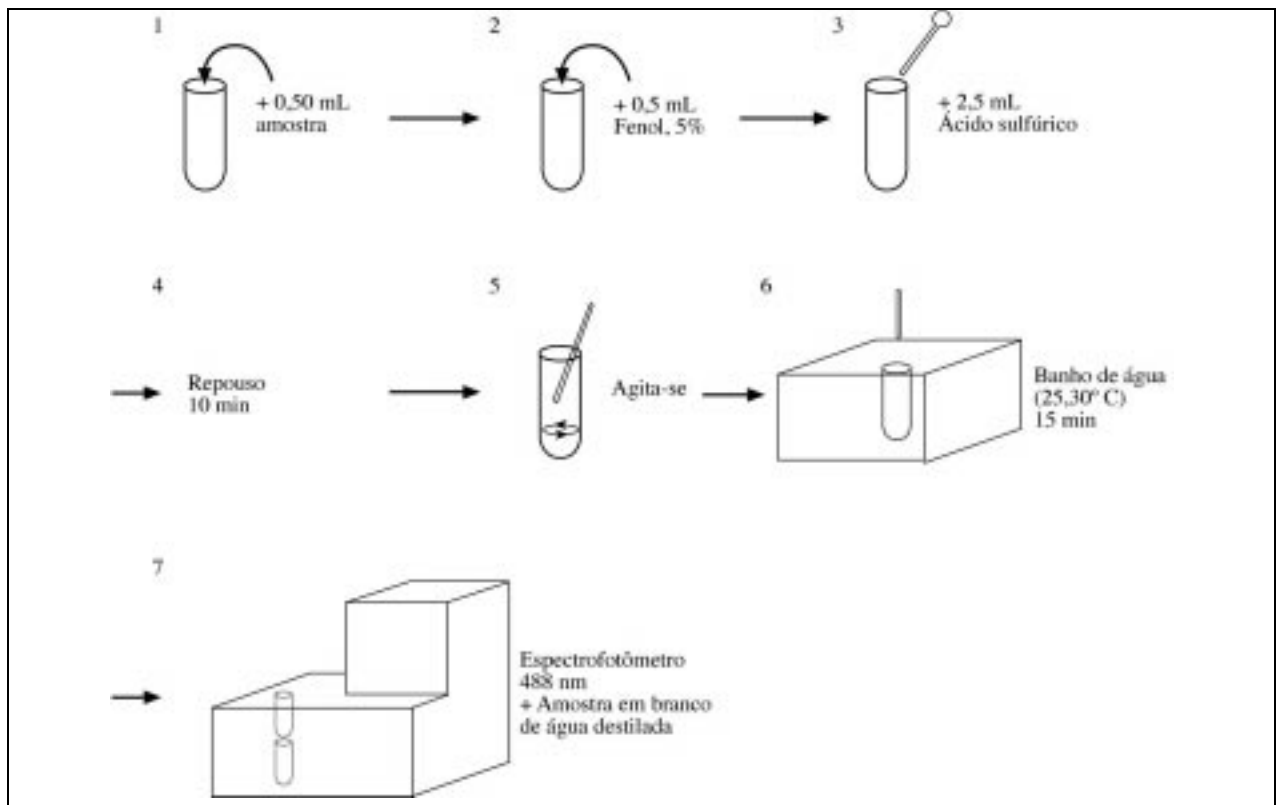


Figura 4 – Método do fenol e ácido sulfúrico para a determinação de carboidratos - Procedimento

## Lipídios

### Método da sulfofosfovanilina para a determinação de lipídios

O método utilizado para a determinação de lipídios é o método da sulfofosfovanilina, baseado na metodologia descrita por POSTMA & STROES (1968), que consiste na adição de ácido sulfúrico concentrado, ácido fosfórico concentrado e solução de vanilina, os quais em presença de lipídio, resultam em uma cor rosa. A absorbância é lida a 537 nm, no espectrofotômetro BAUSCH & LOMB, modelo 601.

Para a realização deste ensaio, é necessário verificar se a amostra apresenta-se dentro da faixa de sensibilidade do método (se a amostra é diluída ou não), considerando os seguintes casos: amostras dentro da faixa de sensibilidade normal e amostras fora da faixa de sensibilidade normal. Pode-se também utilizar o resíduo resultante da extração de óleos e graxas (método de extração Soxhlet).

A concentração de lipídios presentes nas amostras é determinada com o auxílio de uma curva padrão previamente construída, por exemplo para o óleo de soja Savoy (indústria Minasa) (Figura 5).

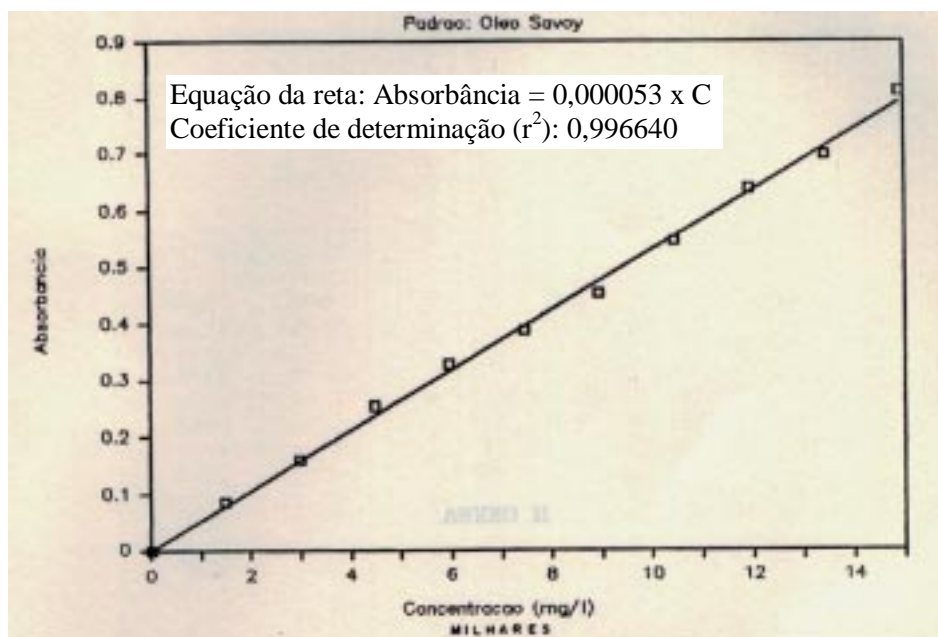


Figura 5 - Curva padrão para lipídios (Padrão: Óleo Savoy)

### Reagentes

- ácido sulfúrico concentrado ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , Merck, P.A.);
- ácido fosfórico concentrado ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ , Synth, P.A.);
- solução de vanilina: dissolvem-se 0,6 g de vanilina até completar 100 mL de água destilada.

### Procedimento

a) Amostra dentro da faixa de sensibilidade (amostra sem diluição ou sem concentração)

Coloca-se 0,1 mL de amostra e 2,0 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , e aquece-se por 10 minutos em um banho de água em ebulição. Paralelamente, desenvolve-se um teste em branco, para o qual se utiliza um tubo de ensaio contendo 0,1 mL de água destilada e 2,0 mL de ácido sulfúrico, aquecendo-a de maneira análoga. Após o banho de água em ebulição, retira-se 0,1 mL desse material e adiciona-se 2,0 mL de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  e 0,5 da solução de vanilina, respectivamente. Mistura-se bem e deixa-se os tubos de ensaio em um banho de água a 37 °C (aparelho modelo 169, Fabbe-Primar Indústria Ltda.) por 15 minutos. Proceda-se de maneira análoga para o teste em branco. A absorbância é lida a 537 nm, dentro de um prazo de 10 minutos, contra o teste em branco. O fluxograma do procedimento apresenta-se na Figura 6.

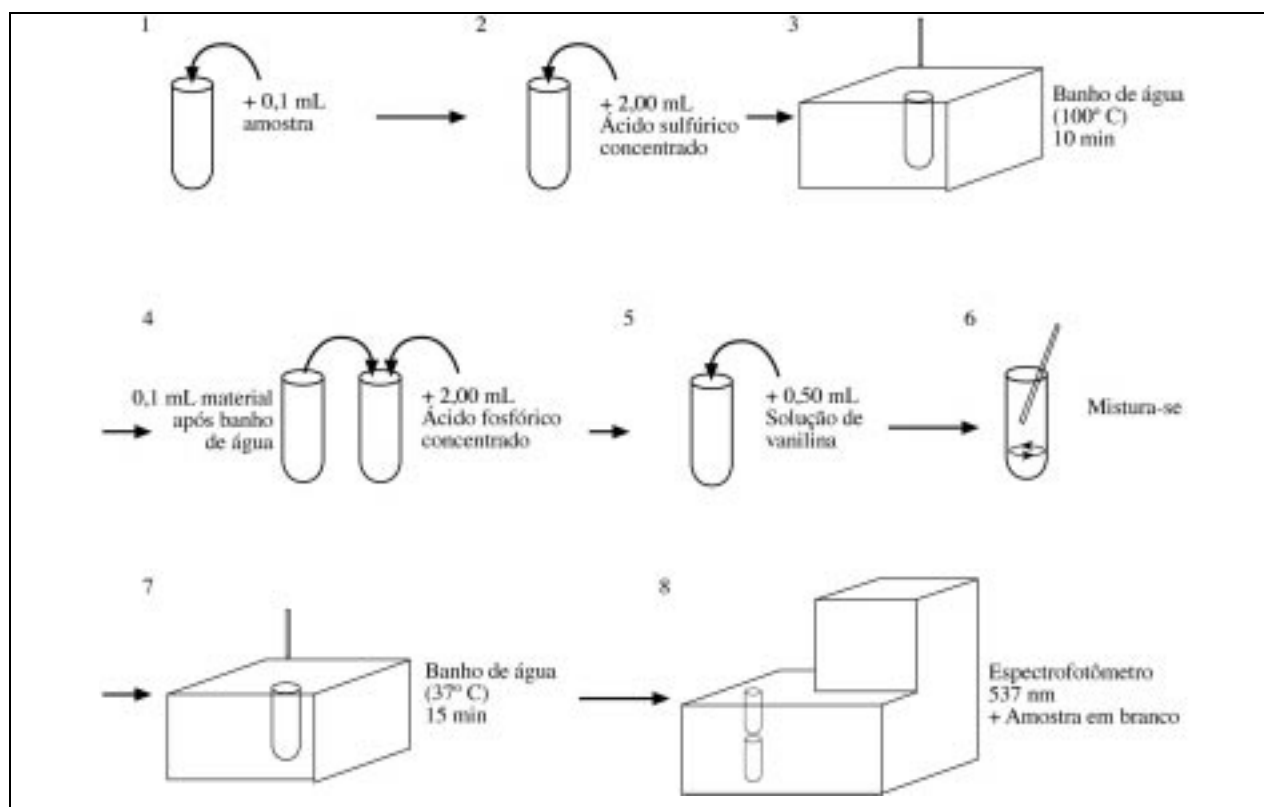


Figura 6 – Método da sulfosfovanilina para a determinação de lipídios – Procedimento:  
Amostra dentro da faixa de sensibilidade – Normal

Obs: a amostra em branco é processada de maneira análoga à amostra, utilizando, inicialmente, 0,1 mL de água destilada

#### b) Amostra fora da faixa de sensibilidade

##### b.1) Concentrando-se amostras

No caso em que a amostra encontra-se muito diluída, com baixa concentração de lipídios, abaixo da sensibilidade, é necessário concentrar a amostra, de forma a possibilitar a leitura.

Coleta-se um volume “A, em mL” da amostra diluída, leva-se à estufa a 100 °C, levando-a a resíduo sólido contendo lipídios. Adiciona-se 0,1 mL de água destilada a um tubo de ensaio contendo o resíduo sólido, que será a amostra concentrada. A seguir, adiciona-se 2,0 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e aquece-se por 10 minutos em um banho de água em ebulição. Paralelamente, desenvolve-se um teste em branco, para o qual se utiliza um tubo de ensaio contendo 0,1 mL de água destilada e 2,0 mL de ácido sulfúrico, aquecendo-a de maneira análoga. Após o banho de água em ebulição, retira-se 0,1 mL desse material e adiciona-se 2,0 mL de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  e 0,5 mL da solução de vanilina, respectivamente. Mistura-se bem, e deixa-se os tubos de ensaio em um banho de água a 37 °C (aparelho modelo 169, Fabbe-Primar Indústria Ltda.) por 15 minutos. Proceda-se de maneira análoga para o teste em branco. A absorbância é lida a 537 nm, dentro de um prazo de 10 minutos, contra o teste em branco. O fluxograma do procedimento apresenta-se na Figura 7.

O resultado obtido deve ser dividido por “A / 0,1”, que representa o número de vezes em que a amostra foi concentrada.

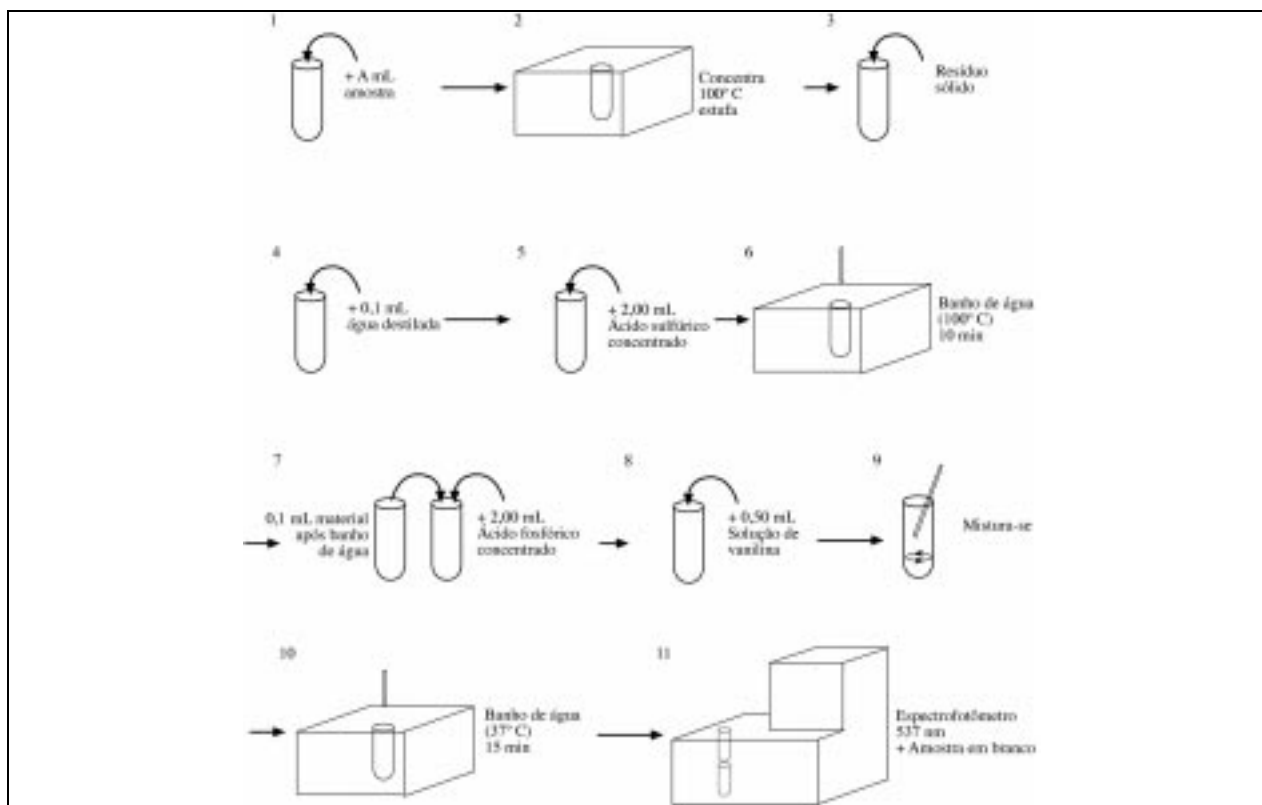


Figura 7 – Método da sulfosfovanilina para a determinação de lipídios – Procedimento: Amostra fora da faixa de sensibilidade - Concentrando amostras

Obs: 1) a amostra em branco é processada de maneira análoga à amostra, utilizando, inicialmente, 0,1 mL de água destilada; 2) o resultado obtido deve ser dividido por “A / 0,1”, que representa o número de vezes que a amostra foi concentrada.

#### b.2) Utilizando resíduos de óleos e graxas

Coloca-se 0,1 mL de água destilada e 2,0 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  em um balão contendo o resíduo resultante da extração de óleos e graxas (método da extração Soxhlet), e aquece-se por 10 minutos em um banho de água em ebulição. Paralelamente, desenvolve-se um teste em branco, para o qual se utiliza um tubo de ensaio contendo 0,1 mL de água destilada e 2,0 mL de ácido sulfúrico, aquecendo-a de maneira análoga ao balão. A seguir, transfere-se 0,1 mL do conteúdo do balão a um tubo de ensaio e adiciona-se 2,0 mL de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  e 0,5 da solução de vanilina, respectivamente. Mistura-se bem, e deixa-se os tubos de ensaio em um banho de água a 37 °C (aparelho modelo 169, Fabbe-Primar Indústria Ltda.) por 15 minutos. Procede-se de maneira análoga para o teste em branco. A absorbância é lida a 537 nm, dentro de um prazo de 10 minutos, contra o teste em branco. O fluxograma do procedimento apresenta-se na Figura 8.

O resultado final deve ser dividido por:  $(100 / 0,1 = 1000)$ , devido a amostra inicial, no ensaio de óleos e graxas, ser de 100 mL.

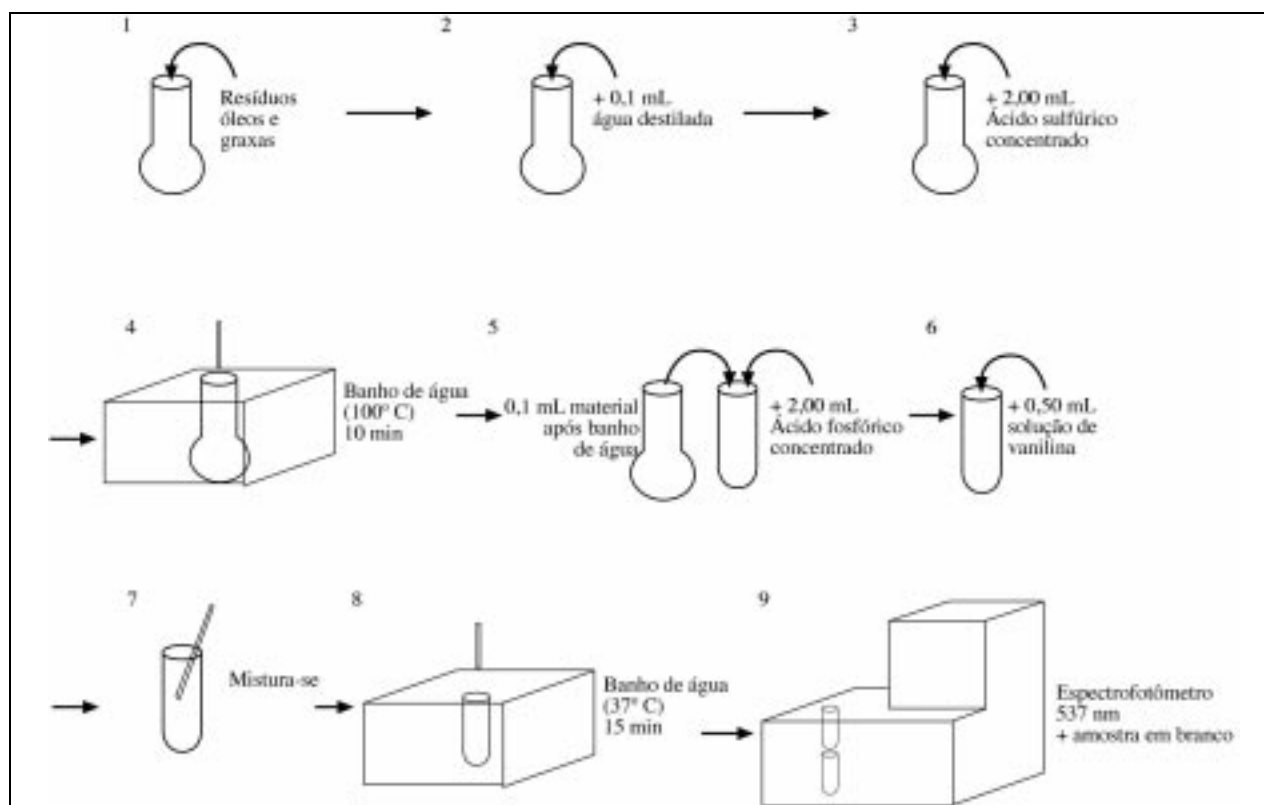


Figura 8 – Método da sulfofosovanilina para a determinação de lipídios – Procedimento:

Amostra fora da faixa de sensibilidade - Utilizando resíduos de óleos e graxas

Obs: a amostra em branco é processada de maneira análoga à amostra, utilizando, inicialmente, 0,1 mL de água destilada

## CURVA PADRÃO

A curva padrão é determinada a partir de concentrações conhecidas do material em estudo, verificando a absorbância correspondente.

O material utilizado, para construção da curva padrão deve ser determinado visando o trabalho a ser realizado. As leituras das concentrações, utilizando a curva padrão, são referenciadas em unidade de massa do material utilizado por unidade de volume.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BLUNDI, C. E. (1988). *Aplicação de Métodos Alternativos para a Determinação de Matéria Orgânica e Biomassa em Águas Residuárias*. São Carlos, EESC-USP (Tese de Doutorado).
- CORTES, S. G. C. (1992). *Estudo de Métodos Analíticos Alternativos Para Avaliação do Desempenho das Unidades de Tratamento de Águas Residuárias de Uma Indústria de Maionese e Molhos*. São Carlos, EESC-USP (Dissertação de Mestrado).
- GADÊLHA, R. F. (2000). *Remoção de Matéria Orgânica Específica de um Sistema de Flotozonização como Pós-tratamento de Reatores Anaeróbios*. São Carlos, EESC-USP (Dissertação de Mestrado).
- MANZOLLI, I. M. (1992). *Emprego de Métodos Analíticos Alternativos no Estudo da Degradação Aeróbia de um Substrato Multicomposto*. São Carlos, EESC-USP (Dissertação de Mestrado).



## DETERMINAÇÃO DAS ALCALINIDADES REAL E TOTAL EM AMOSTRAS DE REATORES ANAERÓBIOS POR TITULAÇÕES CONDUTOMÉTRICAS

Elizabeth de Mattos Moraes\*, Maria Angela Tallarico Adorno, Marcelo Zaiat e Eugênio Foresti

\* Escola de Engenharia de São Carlos – Departamento de Hidráulica e Saneamento – Laboratório de Processos Biológicos, Avenida Trabalhador São Carlense, 400 - 13566-590 - São Carlos/SP

### INTRODUÇÃO

Segundo SPEECE (1996), o processo anaeróbio de degradação da matéria orgânica é composto por quatro etapas: 1. Hidrólise, 2. Acidogênese, 3. Acetogênese e 4. Metanogênese.

De acordo com FORESTI (1994), essas etapas devem ser mantidas em equilíbrio dinâmico, para que a metanogênese ocorra à taxa máxima. O estabelecimento e a manutenção desse equilíbrio relacionam-se com a natureza e a taxa de cargas aplicadas ao sistema, com o destino final dos produtos gerados, principalmente os ácidos e o hidrogênio gasoso, e com a alcalinidade gerada ou imposta ao sistema.

Como a atuação dos microrganismos metanogênicos é limitada pela acidificação do meio, o tampão mais usado para impedir a queda de pH é bicarbonato, alóctone ou autóctone, e a quantificação desse parâmetro é muito importante para o controle operacional dos reatores anaeróbios.

Bicarbonato de sódio, sal formado por uma base forte (NaOH), e um ácido diprótico fraco ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ), como todos os demais sais assim formados, apresenta características tamponantes. O íon bicarbonato tampona estreita faixa de pH, próxima a 6,8, adequada para a manutenção das atividades das bactérias metanogênicas. O equilíbrio, que se segue,



é regido pela concentração de íons  $\text{H}^+$  do sistema: acima de pH 8,3, a espécie dominante é o íon  $\text{CO}_3^{2-}$ , enquanto que em pH abaixo de 4,0, a espécie dominante é o ácido carbônico.

As quantificações das alcalinidades totais e parciais vêm sendo realizadas através dos métodos potenciométricos ou adaptações propostas por DILALLO & ORRIS (1961), KAPP (1984) apud CAVALCANTI & VAN HAANDEL (2000), RIPLEY & CONVERSE (1986), JENKINS et al. (1991), ANDERSON & YANG (1992) e FRAYNE & CAMPOS (1995). Nesses métodos, a alcalinidade parcial quantifica também parte dos ácidos voláteis, uma vez que a substância utilizada na titulação (ácido forte) reage tanto com os íons bicarbonato, quanto com os ânions dos ácidos orgânicos gerados. Porém, temos observado incoerências de resultados quando baixas concentrações de ácidos voláteis, de uma mesma amostra, são determinadas através de métodos titulométricos utilizando ácido forte por titulação potenciométrica e por cromatografia gasosa.

Essa discordância de resultados levou à sugestão da utilização de outro tipo de substância para a quantificação da alcalinidade real de reatores anaeróbios.

O fato do ácido carbônico ser um ácido diprotonado e o bicarbonato de sódio um sal formado pela neutralização de apenas um de seus prótons, confere a natureza anfótera ao íon bicarbonato, explorada pela metodologia agora apresentada. É importante ressaltar ainda que todos os ácidos orgânicos usados para monitorar os processos anaeróbios são ácidos monopróticos, não geradores de sais anfóteros, cujos ânions não reagem com íons  $\text{OH}^-$ .

Então, a quantificação da concentração de íons bicarbonato em uma solução poderá ocorrer pela adição controlada de uma solução de concentração conhecida de uma base forte.

A condutividade  $k$  é uma medida da habilidade de uma solução aquosa em conduzir uma corrente elétrica, relacionada com a presença de íons, suas concentrações, mobilidades e valências, bem como com a temperatura da solução que está sendo titulada. Os valores de Condutância Equivalente ( $\lambda^0$ ), em  $\text{MHO}\cdot\text{cm}^2/\text{Equivalente}$ , em água a  $25^\circ\text{C}$ , de alguns íons envolvidos na determinação da alcalinidade real de amostras de reatores anaeróbios, são os seguintes:  $\text{HCO}_3^-$  (44,5);  $\frac{1}{2} \text{CO}_3^{2-}$  (72);  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  (33);  $\frac{1}{2} \text{HPO}_4^{2-}$  (57);  $\text{OH}^-$  (198,6). A adição de  $\text{NaOH}$ , transformando íons  $\text{HCO}_3^-$  em  $\text{CO}_3^{2-}$  e  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  e  $\text{HPO}_4^{2-}$  em  $\text{PO}_4^{3-}$ , entre outros, e posteriormente em excesso, é responsável pela variação da condutividade da amostra, tornando possível a quantificação.

A quantificação de alcalinidade total, por meio da titulação com solução padronizada de ácido sulfúrico, utilizando-se medidas de condutividade elétrica da solução, permite determinações mais exatas de pontos finais, independentes de pH pré-estabelecidos, que não devem ser coincidentes, para diferentes amostras, e que dificilmente são realmente atingidos no final da titulação.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material

- aparelho de ultra-som;
- condutivímetro marca Horiba – modelo DS/15, eletrodo duplo de platina;
- bureta;
- solução padronizada de  $\text{NaOH}$ ;
- ftalato ácido de potássio (padrão primário);
- solução padronizada de ácido sulfúrico aproximadamente 0,020 M;
- tetraborato de sódio decahidratado (padrão primário).

## METODOLOGIA

### **Determinação da alcalinidade real**

Os volumes conhecidos da amostra (25,0 mL), contidos em copos de Becker, permaneceram durante 10 minutos sob ultra-som. Após esse período, a amostra foi titulada com solução padronizada de  $\text{NaOH}$ , acompanhando-se a variação de condutividade elétrica. A titulação foi processada até garantir-se várias adições em excesso de solução de hidróxido de sódio. Foram construídos gráficos, lançando-se os volumes de solução de  $\text{NaOH}$  adicionados contra os valores corrigidos da condutividade elétrica da amostra. As diluições provocadas pelas adições da solução titulante exigem as correções, multiplicando-se o valor da condutividade lida em cada

ponto pela razão entre o volume total de cada ponto ( $V_{\text{amostra}} + V_{\text{titulante}}$ ) e o volume inicial ( $V_{\text{amostra}}$ ).

### Determinação da alcalinidade total

Os volumes conhecidos da amostra (25,0 mL), contidos em copos de Becker, foram titulados com solução padronizada de ácido sulfúrico, aproximadamente 0,020 M, acompanhando-se a variação de condutividade elétrica. As adições de ácido garantiram sua presença em excesso na amostra. Os gráficos e cálculos foram realizados conforme descrito anteriormente.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão apresentados os parâmetros de acompanhamento (sem e com correção) da titulação condutométrica de uma amostra de efluente de reator anaeróbio, por solução de NaOH.

Tabela 1 - Volumes adicionados de NaOH, valores de condutividade lidos, e valores de condutividades corrigidos durante a titulação de 25,0 mL amostra de efluente de reator anaeróbio, por solução 0,020 M de NaOH

Volume de NaOH	Condutividade (mS/cm)	Condutividade corrigida (mS/cm)
0,00	0,400	0,400
0,50	0,436	0,445
1,00	0,480	0,499
1,50	0,520	0,551
2,00	0,558	0,603
2,50	0,598	0,658
3,00	0,636	0,712
3,50	0,676	0,771
4,00	0,715	0,829
4,50	0,756	0,884
5,00	0,797	0,956
5,25	0,819	0,991
5,50	0,842	1,027
5,75	0,865	1,064
6,00	0,888	1,101
6,25	0,913	1,141
6,50	0,936	1,179
6,75	0,962	1,222
7,75	1,059	1,387
8,50	1,133	1,518
9,50	1,227	1,693
10,00	1,274	1,784

A Figura 1 mostra a variação da condutividade durante a titulação. Como pode ser observado, duas retas compõem o gráfico.

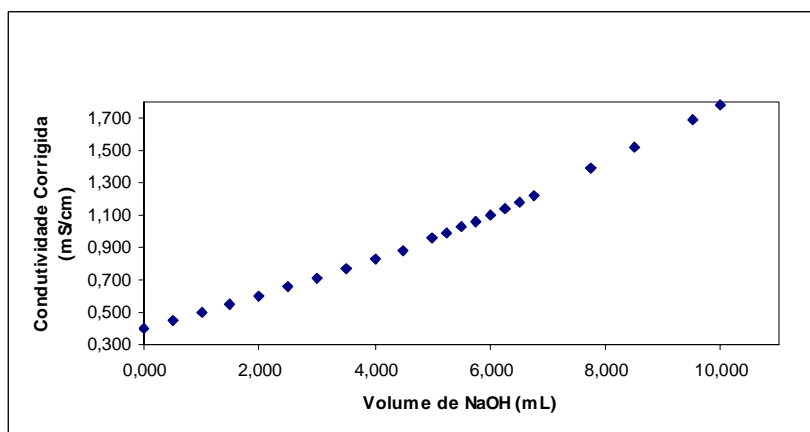
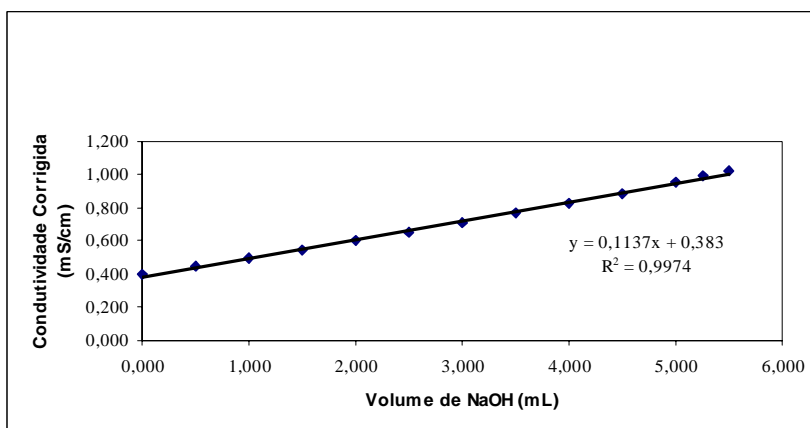


Figura 1 - Variação da Condutividade corrigida da amostra durante adição de solução de NaOH

A Figura 2 (a e b) apresentam as duas retas obtidas quando os valores de condutividade corrigida são plotados contra os volumes adicionados de solução de NaOH.

a)



b)

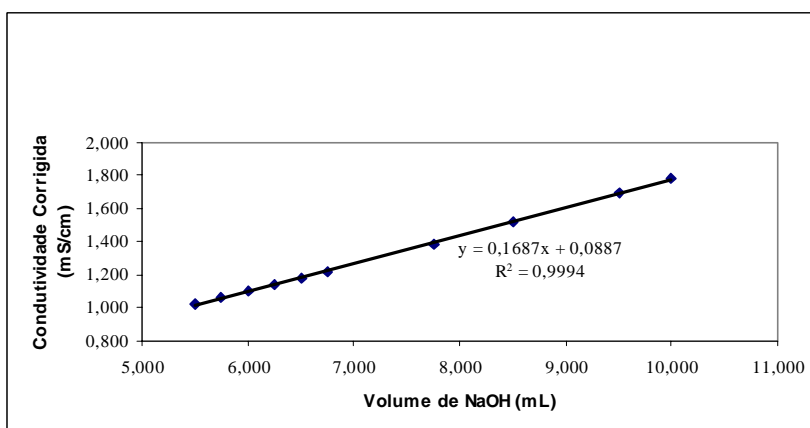
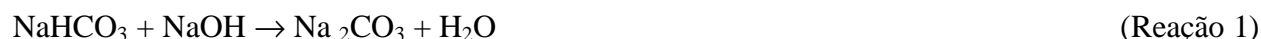


Figura 2 (a e b) - Retas obtidas de acordo com as diferentes inclinações observadas na variação da Condutividade Corrigida da amostra durante a adição de solução de NaOH

A reta 1 (Figura 2a), caracterizada pela equação  $y=0,1137x+0,383$  e  $R^2=0,9974$ , representa a variação de condutividade elétrica da amostra, obtida, principalmente, pela reação entre os íons  $\text{HCO}_3^-$  e  $\text{OH}^-$ , representada pela Reação 1:



A reta 2 (Figura 2b), caracterizada pela equação  $y=0,1687x+0,0887$  e  $R^2=0,9994$ , representa a variação da condutividade elétrica da solução da amostra, em presença de excesso crescente do íon  $\text{OH}^-$ .

O ponto de interseção das duas retas pode ser obtido, matematicamente, igualando-se as equações, e indica o valor do volume da solução padronizada de NaOH, 5,35 mL, usado para atingir o ponto final da titulação.

A partir do volume gasto de NaOH, da concentração molar da solução, do volume titulado da amostra (25,0 mL) e da reação 1, calcula-se a concentração da alcalinidade da solução, expressa em miligramas de íons bicarbonato por litro, a partir da Equação 1:

$$\text{mg HCO}_3^-/\text{L} = V_{\text{NaOH}} \times M_{\text{NaOH}} \times 2440 \quad (\text{Equação 1})$$

Através de procedimentos idênticos, utilizando-se solução padronizada de ácido sulfúrico, a alcalinidade total expressa em bicarbonato, pode ser calculada da seguinte forma, baseando-se na Reação 2:



A concentração da alcalinidade total, expressa em mg/L de  $\text{HCO}_3^-$ , quando 25,0 mL de amostra foram titulados, é calculada a partir da Equação 2:

$$\text{mg/L alcalinidade total, expressa como HCO}_3^- = M_{\text{ácido}} \times V_{\text{ácido}} \times 4880 \quad (\text{Equação 2})$$

A concentração de ácidos voláteis, como ácido acético, poderá ser determinada através da Equação 3:

$$\text{mg/L ácido acético} = (M_{\text{H}_2\text{SO}_4} \times V_{\text{H}_2\text{SO}_4} - M_{\text{NaOH}} \times V_{\text{NaOH}}) \times 3000 \quad (\text{Equação 3})$$

## CONCLUSÃO

O método proposto pode fornecer valores muito mais próximos de alcalinidade real de reatores anaeróbios do que os métodos que utilizam titulações com soluções de ácidos fortes. Este método proposto titula, também, outras espécies geradoras de alcalinidade como íons  $\text{HPO}_4^-$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$ , silicatos,  $\text{HS}^-$ , presentes em águas residuárias.

Uma reação que poderia interferir, quando uma base forte é usada como titulante, seria a reação com  $\text{CO}_2(\text{g})$  presente na amostra. Porém,  $\text{CO}_2(\text{g})$  pode ser eliminado, não por aquecimento, pois a concentração do íon  $\text{HCO}_3^-$  também seria afetada, mas por ultra-som que, aplicado à amostra, expulsa os gases nela dissolvidos. Íons  $\text{NH}_4^+$ , se presentes, poderão interferir positivamente no resultado. Essa interferência, se significativa, pode ser eliminada pela determinação da concentração de nitrogênio amoniacal.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq (Processo 360079/99-7) e à FINEP.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, G. K., YANG, G. (1992). Determination of bicarbonate and total volatile acid concentration in anaerobic digesters using a simple titration. *Water Environment Research*, v. 64, n. 1, p. 53-59.
- CAVALCANTI, P. F. F., VAN HAANDEL, A. V. (2000). Comparação entre os métodos titrimétricos Kapp e DiLallo para determinação da alcalinidade e AGV. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 5, n. 2, p. 47-52.
- DILALLO, R., ORRIS, E. A. (1961). Volatile acids by direct titration. *Journal WPCF*, v. 33, n. 4, p. 356-365.
- FRAYNE, R. M., CAMPOS, J. R. (1995). Avaliação e aprimoramento do método DiLallo para determinação de ácidos voláteis em reatores anaeróbios. In: *18º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária*. Salvador – BA. CD ROM.
- FORESTI, E. Fundamentos do Processo de Digestão Anaeróbia. (1994) *Anais do III Taller y Seminario Latino-americano – Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales*. Montevideo – Uruguay, p.17-110. Editado por: Vinhas, M.; Soubes, M.; Borzacconi, L.; Luxi, L.
- JENKINS, S. R., MORGAN, J. M., ZHANG, X. (1991). Measuring the usable carbonate alkalinity of operation anaerobic digesters. *Research Journal WPCF*, v. 63, n.1, p.28-34.
- RIPLEY, L.E., BOYLE, W.C., CONVERSE, J.C. (1986) Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. *J. Water Pollut. Control Fed.*, v. 58, p. 406-411.
- SPEECE, R.E. (1996) *Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewaters*. Vanderbilt University. Nashville, Tennessee. 394 p.

## COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS TITRIMÉTRICOS KAPP E DILALLO PARA DETERMINAÇÃO DA ALCALINIDADE E AGV

**Paula Frassinetti Feitosa Cavalcanti\* e Adrianus van Haandel**

*\*Rua Aprígio Voloso, 882-Bodocongó 58100-790-Campina Grande – PB - Telfax: 83.331.4809  
E.mail: prosab@cnet.com.br*

### INTRODUÇÃO

Reatores anaeróbios de fluxo ascendente e manto de lodo, reatores UASB, têm sido amplamente investigados como uma alternativa para o tratamento de esgoto sanitário em países de clima quente. No que concerne à conversão da matéria orgânica (MO) em produtos mais estáveis como metano e gás carbônico, o desempenho desses reatores está relacionado às condições ótimas do pH, entre outras.

A conversão da MO se dá através de processos anaeróbios metabólicos de grupos distintos de bactérias que vão se sucedendo, passando pela liquefação (hidrólise) de proteínas, carboidratos e lipídeos, pela fermentação acidogênica e acetogênica e, por último, pela fermentação metanogênica. O pH pode ser um fator de inibição dos diversos processos anaeróbios, exigindo faixas de valores muitas vezes restritas. Considerando-se as diversas fases da digestão anaeróbia e para que não haja inibição dos diversos grupos de bactérias que participam do processo, VAN HAANDEL & LETTINGA (1984) indicaram a faixa de pH de 6,5 a 7,5 como sendo a ótima para a digestão anaeróbia.

Embora os esgotos sanitários geralmente apresentem alcalinidade de bicarbonato (AB) suficiente para garantir que o aumento da acidez, devido à formação AGV, o que não corresponde a uma diminuição acentuada do pH, a determinação desses três parâmetros (AB, AGV e pH) deve fazer parte da rotina de acompanhamento do desempenho de digestores anaeróbios. Exceto o pH, que pode ser determinado com um potenciômetro, a determinação da alcalinidade e de AGV pode se constituir em dificuldade para laboratórios de controle de estações de tratamento de águas residuárias.

As dificuldades encontradas na determinação de AGV e AB estão relacionadas ao grau de precisão das respostas obtidas pelos diversos métodos propostos, à disponibilidade de equipamentos sofisticados, normalmente não encontrados em laboratórios de controle de processos, ao tempo consumido para obtenção de respostas e à interferência, no caso de esgoto, de outros sistemas ácidos/base (amônia, fosfato, sulfeto e ácidos graxos voláteis). Na faixa de pH ótima para a digestão anaeróbia (6,5 a 7,5), geralmente encontrada na digestão de esgoto doméstico, a amônia ( $pK_a = 9,26$  a  $25^\circ\text{C}$ ) não tem influência significativa na determinação das concentrações de AGV e AB, pois, nesta faixa, a amônia está completamente dissociada (VAN HAANDEL & LETTINGA, 1994). Contudo, as presenças de fosfato inorgânico ( $pK_{a2} = 7,21$  a  $25^\circ\text{C}$ ) e de sulfeto ( $pK_{a1} = 6,96$  a  $25^\circ\text{C}$ ) podem levar a erros significativos, principalmente na determinação da AB (MOOSBRUGGER et al., 1993.c).

Para determinação de AGV, os métodos de separação cromatográfica ou de destilação, seguida de titulação, eliminam a interferência de outros sistemas ácido/base. No entanto, esses métodos exigem equipamentos especializados e pessoal qualificado. No caso da destilação, a recuperação de AGV não é completa (70%, segundo SAWYER & McCARTY (1978) e 68 a 85%, segundo DILALLO & ALBERTSON (1961)), além de requerer tempo considerável para ser completada.

O método potenciométrico, para a determinação da alcalinidade devido ao sistema carbônico, trata da titulação de uma amostra até um valor determinado de pH, que corresponde ao pH estabelecido por uma solução equivalente de ácido carbônico (ou gás carbônico). Para a determinação da alcalinidade de bicarbonato em águas residuárias sépticas, o método potenciométrico de titulação, até o ponto de equivalência do  $\text{H}_2\text{CO}_3$  (aproximadamente a um  $\text{pH}=4$ ), pode superestimar o resultado. Na região do ponto de equivalência, cerca de 85% dos ácidos voláteis contribuem para a alcalinidade (MOOSBRUGGER et al., 1993.a). Para essas águas, a alcalinidade assim determinada é chamada de alcalinidade total (AT), que é a soma da alcalinidade de bicarbonato e alcalinidade devido aos ácidos graxos voláteis (AAV).

No Brasil, emprega-se com bastante frequência o método DiLallo para avaliar as concentrações de AGV e alcalinidade de bicarbonato (e, conseqüentemente, a capacidade de tamponamento) de afluentes e efluentes de sistemas anaeróbios de tratamento de águas residuárias. Para eliminar a influência do sistema carbônico ( $\text{CO}_2$ ), na determinação da alcalinidade devida aos ácidos voláteis (alcalinidade negativa ou acidez), o método recomenda ferver a amostra por três minutos. DILALLO & ALBERTSON (1961) verificaram que as perdas de AGV, durante o aquecimento, eram muito pequenas, para tempos de aquecimento de até 9 minutos. No entanto, FRAYNE & CAMPOS (1995), ao submeterem amostras formadas a partir de soluções padrões de acetato, butirato, propionato e formiato, com diferentes concentrações, a temperaturas de 50, 70 e 98 °C, durante tempos de aquecimento variáveis de 5, 10, 15 e 20 minutos, determinaram perdas bastante significativas. Os resultados apresentados por esses autores, para um tempo e temperatura de aquecimento de 5 minutos e de 70 °C, mostraram que a percentagem máxima recuperada, variava de 70 a 74% para o acetato; de 30 a 35% para o formiato; de 55 a 65% para o butirato; de 50 a 55% para o propionato. No mesmo trabalho, os autores concluem que, para todas as concentrações analisadas e temperaturas de aquecimento aplicadas, o método DiLallo se aplica melhor para a determinação dos ácidos acético e propiônico, quando o aquecimento da amostra se dá a uma temperatura de 70 °C, durante 5 minutos.

Um outro método titrimétrico, o método Kapp, desenvolvido na Alemanha e descrito por BUCHAUER (1998), consistindo apenas da titulação acidimétrica até três valores de pH, deriva equações, através de procedimentos interativos, que permitem a determinação da alcalinidade de bicarbonato e da concentração de AGV.

O método Kapp considera que na titulação do  $\text{pH}=5$  até  $\text{pH}=4$  a capacidade da amostra de aceitar prótons (ou capacidade de tamponamento) é devida, principalmente, aos sistemas AGV e carbônico ( $\text{HCO}_3^-/\text{H}_2\text{CO}_3$ ) e que os outros sistemas ácido/base não têm influência significativa. De fato, os sistemas ácido/base, normalmente presentes na digestão anaeróbia de esgoto (fosfórico:  $\text{pK}_{a2} = 7,21$ , na faixa de  $5 < \text{pH} < 9$ ; amônia:  $\text{pK}_a = 9,3$ , na faixa de  $7 < \text{pH} < 11$ ; sulfeto:  $\text{pK}_{a2} \approx 7$ , na faixa de  $5 < \text{pH} < 9$ ), têm valores de  $\text{pK}_a$  situados noutras faixas de pH diferentes daquela da titulação pelo método Kapp, além do que esses sistemas se apresentam em concentrações baixas, não contribuindo significativamente para a capacidade de tamponamento.

Neste trabalho, apresenta-se os resultados de uma investigação que teve como objetivo comparar os métodos Kapp e DiLallo para, no caso de equivalência de respostas entre os dois métodos ou superioridade do método Kapp, recomendar esse método por ser mais simples de execução.

## Os Métodos Analisados

### *O Método DiLallo*

Em 1961, DiLallo e Albertson propuseram um método titrimétrico para determinação de AGV, AT e AB, baseado nas seguintes considerações:

- os métodos de titulação direta são acessíveis a todos os laboratórios de controle de ETE;
- na determinação da alcalinidade total (AT), titulando-se a amostra até pH=4,0, apenas é significativa a influência do sistema carbônico e dos AGV, principalmente acetatos e propionatos, não sendo considerada a influência de outros sistemas ácido/base;
- ao reduzir o pH de 4,0 para 3,3 para, em seguida, ferver a amostra por 3 minutos, todo o sistema carbônico, predominantemente na forma de CO<sub>2</sub> é removido da amostra;
- a titulação alcalimétrica de pH 4,0 até pH 7,0 determinará a alcalinidade negativa ou alcalinidade de ácidos voláteis – AAV (o método não considera outros sistemas ácidos bases que possam contribuir com a acidez);
- ao comparar o método proposto com o método de destilação (considerando, neste último, uma recuperação de 70% de AGV), DILALLO e ALBERTSON (1961) indicam um fator de conversão da alcalinidade negativa, AAV em concentração de AGV, sendo este fator igual a 1 quando AAV < 180 mg/L, como CaCO<sub>3</sub>, e 1,5 quando AAV > 180 mg/L, como CaCO<sub>3</sub>;
- a alcalinidade de bicarbonato (AB) será igual à diferença entre a alcalinidade total (AT) e a de ácidos voláteis (AAV).

### Equações

$$AT \text{ (mg CaCO}_3\text{/L)} = (N_{ac} \times V_{ac}) \times 50.000 / V_{am} \quad (1)$$

$$AAV \text{ (mg CaCO}_3\text{/L)} = (N_b \times V_b) \times 50.000 / V_{am} \quad (2)$$

$$AB \text{ (mg CaCO}_3\text{/L)} = AT - AAV \quad (3)$$

$$AGV \text{ (mgHAc/L)} = f \times 0,83 \times (AAV) \quad (4)$$

nas quais:

$N_{ac}$  é a normalidade da solução ácida em eq/L

$V_{ac}$  é o volume gasto para titular a amostra do pH inicial até pH=4,0, em mL

$V_{am}$  é o volume da amostra, geralmente 50mL

$N_b$  é a normalidade da base em eq/L

$V_b$  é o volume da base em mL

50.000 é o fator de conversão de eq/L para mg CaCO<sub>3</sub>/L

0,83 é o fator de conversão de mgCaCO<sub>3</sub>/L para mgHAc/L

No caso de esgoto doméstico com suficiente capacidade de tamponação e, portanto, condições ideais para o desenvolvimento da metanogênese, a carga orgânica afluyente sempre será de tal ordem que a concentração de AGV no efluente será sempre menor que 180 mg/L, como CaCO<sub>3</sub>. Dessa forma, a concentração de AGV será sempre igual à de AAV, ou seja, 100% de AGV serão titulados como alcalinidade de ácidos voláteis. No caso de valores de AAV maiores que 180 mgCaCO<sub>3</sub>/L,  $AAV = 67\% \text{ AGV}$  (ambos em mgCaCO<sub>3</sub>/L).

Outra consideração para a adoção do método DiLallo é o seu tempo de execução. As diversas etapas que incluem titulação acidimétrica, aquecimento e resfriamento da amostra e, por fim, titulação alcalimétrica, resultam num tempo expressivo (30 minutos ou mais).

### ***O Método DiLallo Modificado***

Os métodos DiLallo e DiLallo Modificado (DM) são semelhantes quanto ao procedimento, diferenciando-se o DM pelo fato que na titulação alcalimétrica de pH=4 até pH=7, a alcalinidade negativa (AAV), assim determinada, corresponde a 85% dos AGV presentes (SOUZA, 1984). A concentração de AGV é determinada pelo método DM como:

$$AGV = AAV / (0,85 \times 0,833) = 1,41 AAV \quad (5)$$

na qual:

0,83 é o fator de conversão de mgCaCO<sub>3</sub>/L para mgHAc/L

### ***O Método Kapp***

O método Kapp consiste em titular a amostra com um ácido forte, de normalidade conhecida, até três valores de pH.

Os procedimentos de titulação, segundo o método Kapp, são:

#### **a) Solução ácida tituladora**

Preparar uma solução de HCl ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, de normalidade padronizada, com uma solução padrão de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). No caso dos esgotos de Campina Grande, cuja alcalinidade total está em torno de 6 meq/L, uma concentração de 0,04 eq/L para a solução ácida é adequada, pois irá requerer um volume do titulante menor que 10 mL. Para alcalinidade total maior que 6 meq/L, uma concentração do ácido maior deverá ser utilizada.

#### **b) Procedimento**

- aferir o medidor de pH, primeiro com a solução tampão pH=7 e depois com a solução pH=4;
- tomar 50 mL da amostra. Se a amostra não for analisada imediatamente após a coleta, filtrá-la através de uma membrana ou papel de filtro diâmetro dos poros igual a 0,45 µm, evitando, dessa maneira, modificações na alcalinidade de AAV, devido à atividade dos microrganismos. No caso de amostras de lodo primário, diluir a amostra em partes iguais: 25 mL do filtrado e 25 mL de água destilada ou de preferência deionizada;
- imergir o eletrodo e iniciar a agitação suavemente da amostra. (A agitação suave é para evitar perdas excessivas de CO<sub>2</sub> da amostra e, dessa maneira, alterar o sistema carbônico ou, mais especificamente, a acidez mineral);
- registrar o pH inicial da amostra;
- iniciar a titulação com a solução ácida e registrar o volume gasto até atingir pH = 5;
- continuar a titulação até pH = 4,3 e registrar o volume acumulado da solução titulante;
- concluir a titulação até alcançar o pH = 4 e registrar o volume total acumulado.

### **Equações**

$$AGV(\text{mgHAc/L}) = (131340 \times N_{ac} \times V_{ac(5-4)} / V_{am}) - (0,0616 \text{ AT}) - 10,9 \quad (6)$$

$$AAV(\text{mgCaCO}_3/\text{L}) = 0,6 \times AGV \times 50 / 60 = 0,5 AGV \quad (7)$$

$$AT(\text{mgCaCO}_3/\text{L}) = V_{ac(4,3)} \times 50.000 \times N / V_{am} \quad (8)$$

$$AB(\text{mgCaCO}_3/\text{L}) = AT - AAV \quad (9)$$

ou

$$AB(\text{mgCaCO}_3/\text{L}) = -(1312,26 \times N_{ac} \times V_{ac(5-4)} / V_{am}) + 0,0206 AT + 0,11 \quad (10)$$

nas quais:

$V_{am}$  é o volume da amostra, normalmente 50 mL

$N$  é a normalidade do ácido em eq/L

$V_{ac(5-4)}$  é o volume em mL de ácido gasto para titular de pH=5 até pH=4

$V_{ac(4,3)}$  é o volume em mL gasto para titular a amostra do pH inicial até pH=4,3

No método Kapp, a alcalinidade de ácidos voláteis é considerada como sendo 60% da concentração de AGV (Equação (07)). Dessa forma, a alcalinidade de bicarbonato pode ser obtida pela diferença entre AT e AAV (Equação (09)) ou diretamente pela Equação (10).

Observa-se que, comparado ao método DiLallo, o método Kapp é bastante simples, pois exige apenas titulação.

## METODOLOGIA

As determinações de AT, AB, AGV e AAA foram feitas em amostras do efluente de um reator UASB, tratando esgoto municipal. As amostras eram coletadas e imediatamente tratadas e analisadas, sem filtração prévia, conforme indicam os métodos, por se pressupor que o teor “in situ” de AT, AB e AGV não seria modificado. Cada amostra tomada era dividida em três porções, sendo dosado, em duas delas, 60 e 120 mg/L de ácido acético (HAc). De cada porção eram tomadas quatro alíquotas, as quais eram analisadas duas a duas pelos métodos Kapp e DiLallo.

Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente, comparando-se as médias obtidas de cada parâmetro, na determinação pelos dois métodos. Utilizando-se o método ANOVA (análise de variância), disponível no Microsoft Office, foi possível decidir, com um nível de significância de 5% ( $\alpha = 0,05$ ), a hipótese ( $H_0$ ): os dois tratamentos (ou métodos empregados) conduzem a médias iguais ( $H_0: \mu_1 = \mu_2$ ), ou seja, se os métodos são equivalentes.

Tratando-se de AGV, onde a hipótese de médias iguais não foi confirmada, a decisão de qual o melhor método recaiu sobre aquele que apresentasse o menor erro de recuperação da concentração esperada para o parâmetro analisado.

## RESULTADOS

Embora tenham sido obtidos dados da alcalinidade total (AT) e da alcalinidade devido aos ácidos voláteis (AAV), a análise e a discussão dos resultados serão feitas apenas quanto à alcalinidade de bicarbonato (AB) e à concentração de ácidos graxos voláteis (AGV), por serem esses parâmetros os de interesse para a estabilidade de reatores anaeróbios.

As Figuras 1 a 6 mostram os dados obtidos da análise de amostras (com e sem adição de ácido acético (HAc)) do efluente de um reator UASB. Nas Figuras 1 a 3 estão apresentados os dados da alcalinidade de bicarbonato (AB), em amostra sem adição de HAc (Figura 1), e com adição de 60 e 120 mgHAc/L (Figuras 2 e 3, respectivamente). Da mesma forma, as Figuras 4 a 6 apresentam os dados de AGV.

A Tabela 1 apresenta um resumo das informações obtidas com o método ANOVA: fator único (análise de variância), aplicado para comparar a equivalência dos dois métodos na determinação dos parâmetros AT, AB, AGV e AAA. Nesta tabela estão indicados na 1ª. coluna os parâmetros analisados nas alíquotas sem HAc e com 60 e 120 mgHAc/L, simbolizados pelos índices 1, 2 e 3, respectivamente. Na 2ª. coluna estão os graus de liberdade da análise, sendo o primeiro número

relativo ao tratamento e o segundo ao resíduo. Nas colunas 3, 4, 5 e 6 estão as médias (coluna 3 e 4) e a variância de cada parâmetro, obtidas segundo os métodos Kapp e DM. Nas colunas de número 7 e 8 estão os valores dos fatores F (determinado) e  $F_c$  (F crítico, encontrado em tabela). O valor de  $F_c$  está relacionado aos graus de liberdade e ao nível de significância especificados, sendo este último, em todos os casos, de 5%. A última coluna, coluna 9, conclui, a partir da hipótese de que as médias obtidas pelos dois métodos são iguais, se há equivalência entre os dois métodos ou não, ou seja, se, dentro do nível de significância de 5%, os dois métodos podem ser considerados equivalentes.

Para verificar o grau de recuperação de cada um dos dois métodos na determinação de AGV, foi feita uma análise da percentagem recuperada de AGV, considerando-se as médias dos valores encontrados. Nesta análise, foi aceito que a média dos valores determinados de AGV nas amostras sem adição de HAc, representaria a média dos valores verdadeiros de AGV nas amostras. Esse valor, acrescido da dosagem de ácido acético, seria o valor médio esperado nas amostras dosadas com HAc. Assim, por exemplo, foi determinado que a média dos valores de AGV obtidos pelo método Kapp, em amostras sem adição de HAc, foi de 52 mgHAc/L =  $X_{am}$ , a média observada das amostras com 60 mgHAc/L (=  $X_{adic}$ ) foi 107 mgHAc/L (=  $X_{obs.}$ ), e a percentagem de recuperação (%R) seria  $(107-52) \times 100 / 60 = 92\%$ . Assim, a percentagem de recuperação é então calculada como:

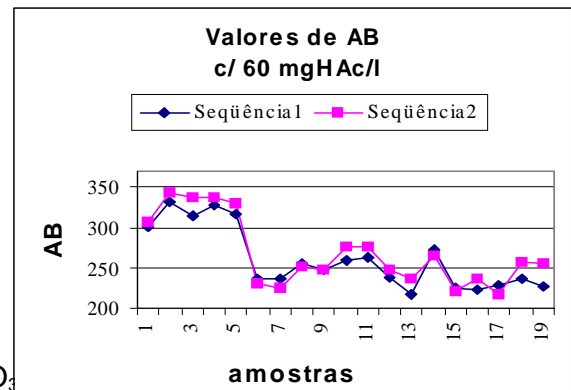
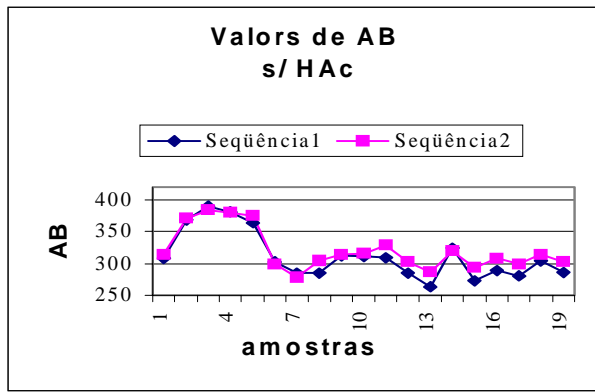
$$\%R = (X_{obs.} - X_{am}) \times 100 / X_{adic} \quad (11)$$

na qual:

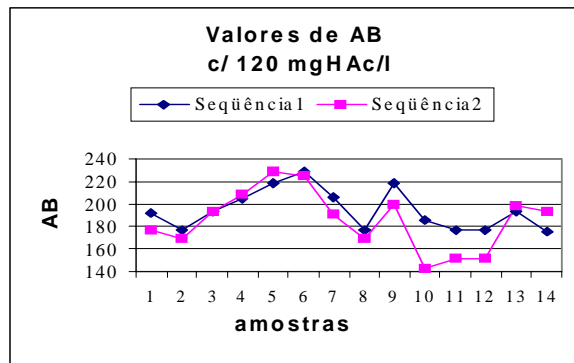
$X_{obs.}$  é o valor medido na amostra dosada com HAc

$X_{am}$  é o valor da concentração de AGV na amostra sem ser dosada

$X_{adic.}$  é a dosagem de HAc adicionada à amostra



Figuras 1 e 2 - Valores de AB em mg  $\text{CaCO}_3$  (sequência 1) e DM (sequência 2), em amostras do efluente de um reator UASB



determinados pelos métodos Kapp (sequência 1) e DM (sequência 2), em amostras do efluente de um reator UASB com adição de HAc

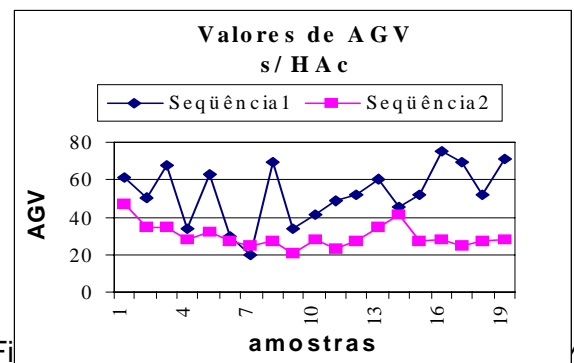
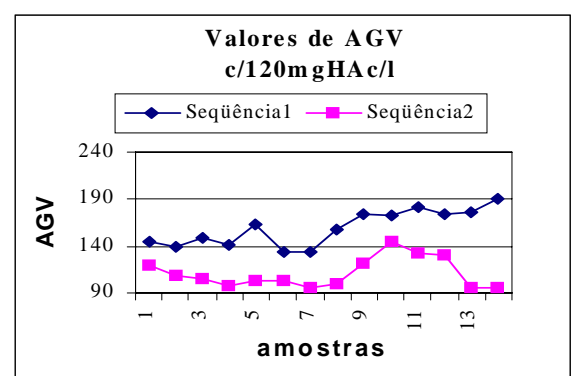
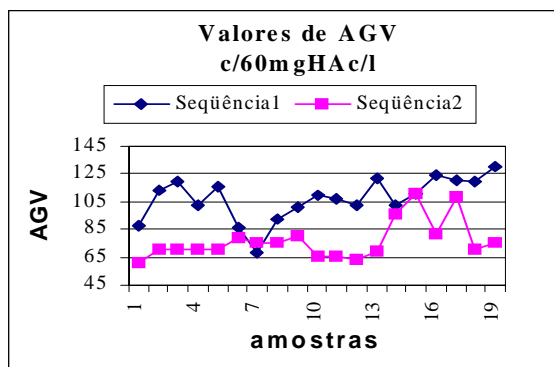


Figura 4 - Valores de AGV em mgHAc/L, determinados pelos métodos Kapp (sequência 1) e DM (sequência 2), em amostras do efluente de um reator UASB sem HAc



Figuras 5 e 6 - Valores da concentração de AGV em mg de HAc/L, determinados pelos métodos de Kapp (sequência 1) e DM (sequência 2), em amostras do efluente de um reator UASB, com adição de HAc

Tabela 1 - Valores das médias e variância das análises dos parâmetros AT, AB, AGV e AAV, obtidos pelo método Kapp e DiLallo Modificado (DM), dos valores de F e  $F_c$  para os graus de liberdade (g) especificados e para um nível de significância de 5%

Parâmetro (*)	gl <sup>(*)</sup>	Médias		Variância		F	$F_c$	Equivalência <sup>(*)</sup>
		Kapp- $\mu_1$	DM- $\mu_2$	Kapp	DM			
AT <sub>1</sub>	(1 e 36)	331	341	1173	1174	0,85	4,11	sim
AT <sub>2</sub>	(1 e 36)	308	323	1491	1477	1,47	4,11	sim
AT <sub>3</sub>	(1 e 26)	268	288	271	292	10,88	4,22	não
AB <sub>1</sub>	(1 e 36)	312	325	1405	1300	1,30	4,11	sim
AB <sub>2</sub>	(1 e 36)	261	268	1482	1806	0,31	4,11	sim
AB <sub>3</sub>	(1 e 26)	195	185	327	711	1,11	4,22	sim
AGV <sub>1</sub>	(1 e 36)	52	30	313	40	31,35	4,11	não
AGV <sub>2</sub>	(1 e 36)	107	77	238	196	39,66	4,11	não
AGV <sub>3</sub>	(1 e 26)	160	111	359	256	54,56	4,22	não
AAV <sub>1</sub>	(1 e 36)	26	15	52	14	29,69	4,11	não
AAV <sub>2</sub>	(1 e 36)	54	39	59	48	40,29	4,11	não
AAV <sub>3</sub>	(1 e 26)	80	55	90	64	54,55	4,22	não

(\*1) os índices 1, 2 e 3 se referem, respectivamente, às amostras sem e com adição de 60 e 120 mgHAc/L;

(\*2) graus de liberdade (tratamento e resíduo);

(\*3) quando  $F < F_c$ , as médias são estatisticamente iguais e os métodos são equivalentes para um nível de significância de 5%.

Na Tabela 2 estão os resultados da análise de capacidade de recuperação de AGV, apresentada pelos dois métodos, para as amostras com 60 e 120 mgHAc/L.

Tabela 2 – Valores médios da concentração de AGV de amostras com e sem adição de HAc e as porcentagens de recuperação segundo os métodos Kapp e DM

Método	Médias			Recuperação%	
	s/HAc	c/60ppmHAc	c/120ppmHAc	c/60ppmHAc	c/120ppmHAc
Kapp	52	107	160	92	90
DM	30	77	111	78	68

## DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A análise gráfica dos resultados (Figuras 1 a 6) mostra que com relação ao parâmetro AB, os dois métodos apresentam valores muito próximos, distanciando-se um pouco para aquelas amostras dosadas com 120 mgHAc/L. No entanto, quanto à concentração de AGV, os dados obtidos pelos dois métodos são notadamente diferentes, apresentando o método Kapp (sequência 1) valores maiores de AGV do que o método DiLallo.

A observação gráfica fica comprovada pela análise estatística dos dados quanto à equivalência dos métodos. A análise da variância (método ANOVA), para um nível de significância bastante rígido ( $\alpha=0,05$ ), mostra que:

- os métodos Kapp e DiLallo Modificado são equivalentes quanto à determinação da alcalinidade de bicarbonato, o que era esperado pois ambos os métodos conduzem à uma titulação até valores próximos de pH;
- os métodos Kapp e DiLallo modificado não são equivalentes quanto à determinação de AGV, o que também era esperado, visto que o tratamento dado à amostra pelo método DiLallo

(fervura por 3 minutos) leva a uma perda quantitativamente significativa de AGV (FRAYNE & CAMPOS, 1995).

A maior capacidade de recuperação de AGV pelo método Kapp, observada graficamente, fica demonstrada na Tabela 2. Esta tabela mostra que os dois métodos inferem num mesmo tipo de erro: recuperam menos da concentração de ácidos voláteis esperada. Essa recuperação é significativamente menor quando se aplica o método DM, e quando o valor esperado de recuperação aumenta de 60 (com 78% de recuperação) para 120 mgHAc/L (com 69% de recuperação). O método Kapp apresentou uma recuperação de 92 e 90% quando o valor esperado (a ser recuperado) era de 60 e 130 mgHAc/L, respectivamente. Isso dá uma recuperação a mais que o método DiLallo, ou seja, de 15 a 24%.

## CONCLUSÕES

Para valores médios de AB entre 3,7 e 6,5 meq/L, os métodos Kapp e DiLallo Modificado são equivalentes na determinação deste parâmetro. As médias obtidas pelos dois métodos são consideradas estatisticamente iguais, dentro de um nível de significância de  $\alpha=0,05$ .

Para valores médios de AGV entre 0,5 e 2,7 meq/L, os métodos Kapp e DiLallo não são equivalentes na determinação de AGV. As médias obtidas pelos dois métodos são consideradas estatisticamente diferentes, dentro de um nível de significância de  $\alpha=0,05$ .

Para um valor esperado da concentração de AGV nas amostras analisadas pelos dois métodos, o método Kapp apresentou uma recuperação significativamente maior do que o método DiLallo.

Recomenda-se o método Kapp, para análises de rotina de controle de processos de digestão anaeróbia e caracterização de efluentes, considerando-se:

- (1) os aspectos de equivalência entre os dois métodos investigados;
- (2) a capacidade de recuperação, quando da determinação de ácidos graxos voláteis;
- (3) o tempo e a simplicidade de execução do método Kapp.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FINEP, pelo apoio dado ao grupo de pesquisadores através do PROSAB, à técnica Nélia Luna Leal, pelo levantamento dos dados, à CAGEPA, por ceder o terreno onde estão as unidades experimentais do DEC/CCT/UFPB e à UFPB.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BUCHAUER, K. (1998). A Comparison of two simple titration procedures to determine volatile fatty acids in effluents to waste-water and sludge treatment processes. *Water SA*. n.24, v.1, p.49-56.
- DILALLO, R., ALBERTSON, O.E. (1961). Volatile acids by direct titration. *Journal Water Pollution Control Federation*. v.33, n.4, p.350-364.
- FRAYNE, R.E., CAMPOS, J.R. (1995). Avaliação e aprimoramento do método DiLallo para determinação de ácidos voláteis em reatores anaeróbios. In: *18º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária*. Salvador – Bahia.
- MOOSBRUGGER, R.E., WENTZEL, M.C., EKAMA, G.A., MARAIS, G.V.R. (1993a). Weak acid/bases and pH control in anaerobic systems – a review. *Water SA*. v. 19 n.1, p. 1-10.

- MOSSBRUGGER, R.E., WENTZEL, M.C., EKAMA, G.A, MARAIS, G.V.R. (1993b). Alkalinity measurement: part 3 – a 5 point titration method to determine the carbonate and SCFA weak acid/bases in aqueous solution containing also known concentration of other weak acid/bases *Water SA*. v 19, n 1, p.29-40.
- SOUZA, M.E. Fatores que influenciam a digestão anaeróbia. *Revista DAE*. v.44, n 37. 1984, p.88-94.
- SAWYER, C.N., MCCARTY, P.L. *Chemistry for environmental engineering*. 3rd. Ed. McGraw-Hill. Singapore. 1978, p-532.
- VAN HAANDEL, A.C., LETTINGA, G. *Tratamento anaeróbio de esgotos- um manual para regiões de clima quente*. Ed. própria. DEC/CCT/UFPB – Campina Grande – Paraíba-Brasil, 1994, p. 220.

## DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS VOLÁTEIS POR CROMATOGRAFIA GASOSA EM EFLUENTES DE REATORES ANAERÓBIOS

**Elizabeth de Mattos Moraes<sup>\*</sup>, Eugênio Foresti, Marcelo Zaiat e Maria Angela Tallarico Adorno**

*<sup>\*</sup> Escola de Engenharia de São Carlos – Departamento de Hidráulica e Saneamento – Laboratório de Processos Biológicos, Avenida Trabalhador São Carlense, 400 - 13566-590 - São Carlos/SP*

### INTRODUÇÃO

Ácidos voláteis de cadeias curtas são produzidos durante processos metabólicos de fermentação anaeróbia. A análise desses ácidos é de especial interesse em processos de digestão anaeróbia, através dos quais a maior parte das macromoléculas consumidas é degradada a ácidos de cadeias curtas (C<sub>2</sub>-C<sub>7</sub>), antes da produção de metano e gás carbônico (HENDERSON et al., 1982).

Essas substâncias, juntamente com ácidos de cadeias maiores (não voláteis), também são de grande interesse taxonômico, como produtos finais do metabolismo de bactérias anaeróbias fermentativas, pois a caracterização dos organismos anaeróbios pode ser difícil se apenas testes bioquímicos clássicos forem utilizados (ARELLANO et al., 2000).

Para os processos biotecnológicos levando à formação de metano, os conhecimentos qualitativo e quantitativo dos metabólicos intermediários (como os ácidos de cadeias curtas, os ácidos voláteis) são de fundamental importância para definição das rotas metabólicas. Esses resultados, associados às análises microbiológicas de bactérias e arqueas metanogênicas, permitem inferir, com clareza, as relações sintróficas entre esses microrganismos.

No Laboratório de Processos Biológicos do Departamento de Hidráulica e Saneamento, da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC), são estudados os processos de degradação de compostos orgânicos comumente encontrados em esgotos sanitários e de substâncias tóxicas que podem estar presentes em esgotos industriais, como por exemplo, fenóis, compostos clorados, hidrocarbonetos aromáticos etc.

Métodos titulométricos que utilizam ácido forte para quantificação de ácidos voláteis (DILALLO & ALBERTSON, 1961), além de impedirem a especiação, comprometem os resultados quando suas concentrações nas amostras são baixas. Assim, uma análise por cromatografia, que permite a identificação dos ácidos, além da quantificação, é ideal.

Existem vários métodos de análise de ácidos orgânicos descritos na literatura, a saber:

- cromatografia iônica (“High Performance Liquid Chromatography” - HPLC) com detecção por UV (SHARMA et al., 1998; OHTA & TANAKA, 1999; LUES et al., 1998; MORALES et al., 1998; CHEN et al., 1997; TANAKA et al., 1999; CHEN & ADAMS, 1999; STANEK et al., 1992; SINGER et al., 1997; SZMIGIELSKA et al., 1997; CANO et al., 1994; SINGER et al., 1997) e por condutividade (KOTALIK et al., 1997);
- cromatografia gasosa, com detecção por espectrômetro de massas e/ou por detector de ionização de chamas (YO, 1999; URDANETA et al., 1995; PAN et al., 1995; STAHNKE, 1995; CLARK & BUNCH, 1997);
- eletroforese (GALLI et al., 2000; ARELLANO et al., 2000);
- métodos titulométricos (BISOGNII et al., 1998; ROZZI et al., 1997; VAN VOOREN et al., 1996) e FIA – “Flow Injection Analysis” (SU et al., 1998; MATAIX & CASTRO, 1999).

A análise de todos os ácidos mais importantes, como acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico e capróico, por HPLC, não foi eficiente, pois a sensibilidade do método não permitiu analisar amostras com concentrações baixas de ácidos (1,0 mg/L, por exemplo), com o “loop” de 20 µL que dispunha-se e o tempo de análise foi muito longo (em torno de 30 minutos). Quando as amostras eram provenientes de chorume de resíduo sólido, isso tornou-se impraticável, devido não somente ao tempo maior ainda de análise (mais de 60 minutos), mas também à presença de muita matéria orgânica, como ácidos húmicos e fúlvicos, que podem danificar a coluna cromatográfica usada na análise.

A análise de ácidos voláteis vinha sendo realizada por CG/FID, mas injetando-se soluções aquosas, com pH em torno de 2,0, o que danificava a coluna, diminuindo sua vida útil (somente cerca de 20 injeções). Esse fator era muito agravado quando se tratava de amostras de percolado, com altas concentrações de ácidos, inclusive não voláteis, o que, além de danificar a coluna cromatográfica, deixava resíduos no detector e no injetor, exigindo limpezas periódicas dos mesmos e inviabilizando as análises por meio dessa metodologia.

Por esses motivos, desenvolveu-se uma metodologia adaptada de outras descritas na literatura (BALDOCHI, 1997; DEL NERY, 1993; HENDERSON & STEEDMAN, 1982; Standard Methods For The Examination Of Water And Wastewater, 1998), que permitiu a reprodutibilidade dos resultados das análises dos ácidos voláteis por cromatografia gasosa, sem a injeção de amostras aquosas, fortemente ácidas, mesmo tratando-se de amostras provenientes de percolado. Trata-se da extração dos ácidos voláteis por um solvente orgânico polar, como éter etílico, seguida da injeção da fase etérea no cromatógrafo. Quando as amostras são provenientes de percolado, uma destilação prévia das mesmas em um microdestilador (ver Figura 1) permite a separação do material não volátil, após o que é feita uma extração com éter etílico dos ácidos voláteis e injeção no cromatógrafo gasoso.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Equipamentos e reagentes utilizados

- Cromatógrafo gasoso HP 6890, equipado com detector de ionização de chama.
- Coluna HP INNOWAX, 30m x 0,25mm x 0,25 µm de espessura de filme; fluxo de gás de arraste (hidrogênio): 2,0 mL/min.; temperatura do forno: 100 °C (3 min.) - 180°C (5 min.), 5 °C/min.
- Temperatura do injetor: 250°C; “split”: 20; volume injetado: 1,0 µL.
- Temperatura do detector: 300°C; fluxo de ar sintético: 300 mL/min., fluxo de hidrogênio: 30 mL/min., fluxo de gás auxiliar (nitrogênio): 33 mL/min., range:1.

- Sistema para cromatografia líquida de alta performance (HPLC) Shimadzu, equipado com bomba LC-10 AD vp, válvula FCV-10AL vp, forno para colunas CTO-10 A vp, controlador SCL-10 A vp e detector SPD-M10 A vp.
- Coluna Aminex HPX – 87H, 300 x 7,8mm, eluente: ácido sulfúrico 0,005M, fluxo: 0,6 mL/min., temperatura do forno: 37 °C.
- Éter etílico P.A. purificado neste laboratório através de lavagens sucessivas com solução aquosa de  $\text{KMnO}_4$  (P.A.) e posterior destilação.
- NaCl P.A.
- Microdestilador idealizado por Moraes, E. M. (Figura 1).
- Manta aquecedora.
- Ácidos orgânicos de cadeia curta (acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico, crotônico e caprótico) e ácido sulfúrico grau P.A.
- Água MilliQ

## Metodologia desenvolvida

### a) Extração

O solvente mais adequado para a extração dos ácidos foi o éter etílico, por ser um solvente polar, como o são os ácidos em questão.

Para a extração, uma alíquota de 2,0 mL da amostra foi transferida para um tubo de ensaio contendo, aproximadamente, 1,0 g de NaCl. Adicionou-se solução de ácido sulfúrico 1,0 M suficiente para acidificar a amostra, 100  $\mu\text{L}$  de solução de ácido crotônico 700 mg/L (padrão interno) e 0,60 mL éter etílico purificado (mantido em freezer até o momento de utilização). O tubo foi hermeticamente fechado e colocado em agitador Vórtex por 1,0 minuto, centrifugado por 1,0 minuto, a 3000 rpm, e mantido no freezer (devido à alta volatilidade do éter), juntamente com a microseringa utilizada para a injeção no cromatógrafo, até o momento de serem usados.

### b) Destilação de amostras percolado

Antes do início de cada destilação, feita em capela, o microdestilador foi colocado sobre a manta aquecedora e conectado à água de refrigeração do condensador. Ao frasco coletor, adicionou-se 0,50 mL de solução de NaOH 0,1 M e fechou-se com tampa de vidro esmerilhado, envolta por película de teflon. Adicionou-se ao balão, volumes não superiores a 1,00 mL de branco, padrões ou amostras, 100  $\mu\text{L}$  de solução de ácido crotônico ( 3,5 g/L) e 100  $\mu\text{L}$  de solução de ácido sulfúrico 6,0 M, e fechou-se com tampa de vidro esmerilhado envolta em película de teflon. Imediatamente, um tampão de algodão hidrófilo foi colocado no frasco lavador de vapores, ao qual adicionou-se 0,40 mL de solução de NaOH 0,1 M. Amostras de percolado provenientes de aterro sanitário, contendo altas concentrações de ácidos voláteis, foram introduzidas em volumes de 100  $\mu\text{L}$ .

O aquecimento máximo da manta permitiu que o final da destilação fosse atingido após cerca de 3 minutos, quando 1,00 mL de amostra foi destilado, constatado pela ausência de ebulição do líquido remanescente (ácido sulfúrico) e pela presença de resíduos escuros não voláteis. Durante o resfriamento do destilador, iniciou-se a adição de água destilada, através do coletor de vapores, recolhendo-se a água de lavagem juntamente com o destilado, posteriormente transferido para balão volumétrico de 10,0 mL e o volume completado com água destilada. A seguir, alíquotas de 2,0 mL do destilado foram preparadas como descrito no item “a”.

- (1) balão de destilação, com entrada para a amostra (fechado com tampa de vidro esmerilhado) e saída lateral (Vigreux) de vapores
- (2) bastão de vidro, para manter o frasco coletor afastado do balão de destilação e da manta aquecedora.
- (3) coletor do destilado, fechado por tampa de vidro esmerilhado
- (4) condensador, com entrada e saída de água
- (5) lavador de vapores

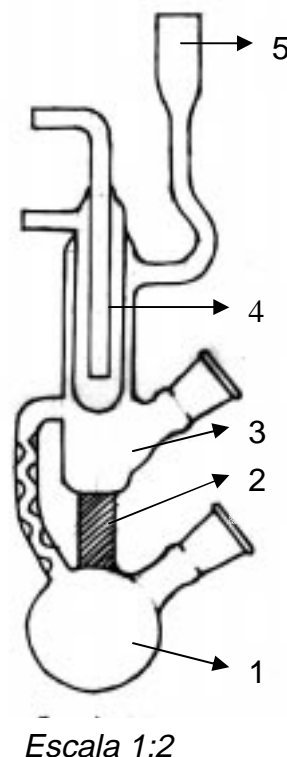


Figura 1 - Microdestilador

### c) Quantificação

Para quantificar os ácidos presentes nas amostras, utilizou-se o método do padrão interno (ácido crotônico), através de comparação dos fatores de resposta de cada ácido (área do ácido/área do padrão interno) com curvas de calibração (feitas com os fatores de resposta dos ácidos nas soluções padrão), para as quais as soluções de padrões receberam tratamento idêntico ao das amostras.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Valores de coeficientes de correlação próximos de 1,0, para cada um dos ácidos analisados pela técnica composta por etapas que poderiam ser fontes de erros, como destilação e extração por solvente orgânico, permitem a apresentação dessa metodologia como bastante adequada para ser utilizada em amostras que não podem ser injetadas diretamente no cromatógrafo, como efluentes de reatores anaeróbios tratando esgoto doméstico e industrial e de percolado de aterros sanitários.

Segundo Standard Methods for The Examination Of Water And Wastewater (1998), a destilação de amostras contendo ácidos voláteis é causa de perdas dessas substâncias. Comparações realizadas com padrões destilados e não destilados revelaram valores de fatores de resposta, levemente inferiores para os padrões destilados. Porém, as equações que descrevem as relações entre as concentrações de ácidos voláteis e os fatores de resposta, bem como os coeficientes de correlação, mostrados na Tabela 1, evidenciam que essas perdas são proporcionais às

concentrações e que são corrigidas pelo tratamento idêntico a que são submetidos brancos, padrões e amostras.

A destilação das amostras de percolado de aterro sanitário foi muito importante, pois, caso contrário, material não volátil também extraído pelo éter etílico, deixaria resíduos no injetor e detector, exigindo limpezas periódicas dos mesmos e inviabilizando esse tipo de análise.

Tabela 1 - Equações de retas obtidas para ácidos voláteis, com seus respectivos coeficientes de determinação ( $r^2$ ), em soluções padrão destiladas

Ácido	Equação	$r^2$
Acético	$y = 0,0036x - 0,0324$	0,9994
Propiônico	$y = 0,0208x - 0,0110$	0,9997
Isobutírico	$y = 0,0421x + 0,0144$	0,9998
Butírico	$y = 0,0424x + 0,0223$	0,9998
Isovalérico	$y = 0,0603x + 0,1336$	0,9998
Valérico	$y = 0,0632x + 0,0007$	0,9998
Capróico	$y = 0,0596x - 0,0708$	0,9996

Na Tabela 2 encontram-se valores de concentrações dos ácidos voláteis, obtidos em amostras de percolado provenientes de reatores anaeróbios, tratando resíduos sólidos domiciliares.

Tabela 2 - Resultados obtidos para amostras de percolado provenientes de reatores anaeróbios tratando resíduos sólidos domiciliares

Amostra/ Ác	Acético (g/L)	Propiônico (g/L)	Isobutírico (g/L)	Butírico (g/L)	Isovalérico (g/L)	Valérico (g/L)	Capróico (g/L)
R1	18,46	1,93	0,82	10,85	0,60	0,26	1,15
R2	6,43	0,94	0,070	4,41	0,024	0,15	0,67
R3	7,42	1,36	0,24	10,92	0,40	0,34	2,57

Na Tabela 3 encontram-se as equações de retas obtidas para ácidos voláteis com seus respectivos coeficientes de determinação ( $r^2$ ) em soluções padrão não destiladas.

Tabela 3 - Equações de retas obtidas para ácidos voláteis, com seus respectivos coeficientes de determinação ( $r^2$ ), em soluções padrão não destiladas

Ácido	Equação	$r^2$
Acético	$Y = 0,0023x + 0,0089$	0,9987
Propiônico	$Y = 0,0135x + 0,0033$	0,9999
Isobutírico	$Y = 0,0256x + 0,0090$	0,9999
Butírico	$Y = 0,0246x + 0,0074$	1,0000
Isovalérico	$Y = 0,0344x + 0,0117$	1,0000
Valérico	$Y = 0,0352x + 0,0068$	1,0000
Capróico	$Y = 0,0329x + 0,0125$	0,9999

Na Tabela 4 encontram-se valores obtidos em um ponto intermediário de um reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF), tratando substrato sintético simulando esgoto sanitário.

Tabela 4 - Resultados obtidos (mg/L) para amostra proveniente de RAHLF, tratando esgoto doméstico sintético

Amostra/Ac.	Acético	Propiônico	Isobutírico	Butírico	Isovalérico	Valérico
RAHLF	22,60	11,54	2,63	0,82	0,59	0,05

## CONCLUSÕES

A extração foi bastante eficiente, pois apresentou resultados experimentais compatíveis com os esperados para efluentes sólidos e líquidos, provenientes de degradação anaeróbia, e permitiu a proteção da coluna contra condições drásticas como injeção de soluções aquosas com  $\text{pH} < 2$ , aumentando sua vida útil. O tratamento igual ao das amostras, realizado para os padrões para o levantamento das curvas de calibração e a utilização de um padrão interno para a quantificação dos ácidos, minimizam os possíveis erros resultantes de processos de tratamento das amostras, como extração e destilação.

O método de destilação mostrou-se muito adequado para a purificação de amostras provenientes de matrizes muito complicadas, como percolado de aterro sanitário, a serem analisadas por cromatografia gasosa, porém resultados semelhantes não foram obtidos por cromatografia líquida. Apesar da amostra ficar totalmente límpida, testes realizados com cromatografia líquida (ADAMS et al., 1984) revelaram que algumas outras substâncias também destiladas, por apresentarem tempos de retenção muito longos, inviabilizam a análise por HPLC, uma vez que o tempo de limpeza da coluna tornou-se muito elevado ( $> 60$  minutos).

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq (Processo 360079/99-7) e à FINEP.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R. F., JONES, R. L., CONWAY, P. L. (1984). High-Performance Liquid Chromatography of microbial acid metabolites. *Journal of Chromatography*, v. 336, p. 125-137.
- ARELLANO, M., JOMARD, P., KADDOURI, S. E., ROQUES, C., NEPVEU, F. C. (2000). Routine analysis of short-chain fatty acids for anaerobic bacteria identification using capillary electrophoresis and indirect ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B*, v. 741, p. 89-100.
- BALDOCHI, V. M. Z. (1997). *Resíduos sólidos urbanos: aspectos básicos das transformações de compostos orgânicos em sistemas anaeróbios mesofílicos com elevada concentração de sólidos totais*. Tese de Doutorado. EESC-USP.
- BISOGNII, J. J., WITZMANN, S. W., STEDINGER, J. R. (1998). A simple method for determination of volatile acid concentration with corrections for ionic strength. *Water Environment Research*, v. 70: (7), p. 1303-1306.
- BRUZZONITI, M. C., MENTASTI, E., SARZANINI, P. H. (1997). Ion chromatographic separation of carboxylic acids. Prediction of retention data. *Journal of Chromatography A*, v. 770, p. 13-22.
- CANO, M. P., TORIJA, E., MARIN, M. A., CAMARA, M. (1994). *Zeitschrift für Lebensmittel – Untersuchung und forschung*, v. 199: (3). P. 214-218.

- CHEN, Z., ALEXANDER, P. W., HADDAD, P. R. (1997). Liquid chromatography of carboxylic acids using potentiometric detection with a tungsten oxide electrode. *Analytica Chimica Acta*, v. 338, p. 41-49.
- CHEN, Z., ADAMS, M. A. (1999). Simultaneous determination of aliphatic and aromatic acids in plant tissue extracts by ion-exclusion chromatography. *Analytica Chimica Acta*, v. 386, p. 249-256.
- CLARK, T. J., BUNCH, J. E. (1997). Determination of volatile acids in tobacco, tea, and coffee using derivatization – purge and trap gas chromatography – selected ion monitoring mass spectrometry. *Journal of Chromatographic Science*, v. 35: (5), p. 206-208.
- DEL NERY, V. (1993). *Digestão anaeróbia em duas fases com lodo acidogênico e metanogênico imobilizados separadamente em gel agar*. Tese de Doutorado. EESC-USP.
- GALLI, V., OLMO, N., BARBAS, C. (2000). Development and validation of a capillary electrophoresis method for the measurement of short-chain organic acids in natural rubber. *Journal of Chromatography A*, v. 894, p. 135-144.
- HENDERSON, M. H., STEEDMAN, T. A. (1982). Analysis of C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> monocarboxylic acids in aqueous solution using gas-chromatography. *Journal of Chromatography*, v. 244, p. 337-346.
- LUES, J. F. R., BOTHA, W. C., SMIT, E. J. (1998). Ion-exchange HPLC analysis of a broad spectrum of organic acids from matured Cheddar cheese and assessment of extraction methods. *Food Research International*, v. 31, n. 6-7, p.441-447.
- MORALES, M. L., GONZALEZ, A. G., TRONCOSO, A. M. (1998). Ion-exclusion chromatographic determination of organic acids in vinegars. *Journal of Chromatography A*, v.822, p. 45-51.
- OHTA, K., TANAKA, K. (1999). Ion-exclusion chromatography of carboxylic acids on silica gel modified with aluminium. *Journal of Chromatography A*, v. 850, p. 177-185.
- PAN, L., ADAMS, M., Pawliszyn. Determination of fatty-acids using solid-phase microextraction. *Journal of Analytical Chemistry*, v. 67: (23), p. 4396-4403.
- ROZZI, A., MASSONE, A., ANTONELLI, M. (1997). A volatile fatty acid measuring biosensor based on nitrate reduction. *Water Science and Technology*, v. 36, n. 6-7, p. 183-189.
- SHARMA, A. K., CLAUSS, S. A., MONG, G. M., WAHL, K., L., CAMPBELL, J. A. (1998). Analysis and quantification of organic acids in simulated Hanford tank waste and Hanford tank waste. *Journal of Chromatography A*, v. 805, p. 101-107.
- SINGER, A. G., BEAUCHAMP, G. K., YAMASAKI, K. (1997). Volatile signals of the major histocompatibility complex in male mouse urine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, v. 94: (6), p. 2210-2214.
- SMIGIELSKA, A. M., REES, K. C. J. V., CIESLINKI, K. G., HUANG, P. M. (1997). Comparison of liquid and gas chromatography for analysis of low molecular weight organic acids in rhizosphere soil. *Communications in soil science and plant analysis*, v. 28: (1-2), p. 99-111.
- STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER (1998) APHA (American Public Health Association), AWWA (American Water Works Association), WEF (Water Environment Federation). 20<sup>TH</sup> EDITION, Washington D.C.
- STANEK, R., GAIN, R. E., GLOVER, D. D. (1992). High-Performance ion exclusion chromatographic characterization of the vaginal organics acids in women with bacterial vaginosis. *Biomedical Chromatography*, v. 6: (5), p. 231-235.
- STAHNKE, L. H. (1995). Dried sausages fermented with *staphylococcus-sylosus* at different temperatures and with different ingredient levels. 2. Volatile components. *Meat Science*, v. 41: (2), p. 193-209.
- SU, X. L., NIE, L. H., YAO, S. Z. (1998). Flow-injection analysis based on a membrane separation module and a bulk acoustic wave impedance sensor – determination of the volatile acidity of fermentation products. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, v. 360: (2), p. 272-274.
- TANAKA, K., CHIKARA, W. H., HASEBE, K. (1999). Separation of carboxylic acids on a weakly acidic cation-exchange resin by ion-exclusion chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 850, p. 187-196.

- URDANETA, D., RAFFE, D., FERRER, A., DE FERRER, B. S., CABRERA, L., PEREZ, M. (1995). Short-chain organic acids produced on glucose, lactose and citrate media by *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus casei* and *Enterobacter aerogenes* strains. *Bioresource Technology*, v. 54: (2), p. 99-103.
- VOOREN, V. L., WILLEMS, P., OTTOY, J. P., VANSTEENKISSE, G. C., VERSTRAETE, W. (1996). Automatic buffer capacity based sensor for effluent quality monitoring. *Water Science and Technology*, v. 33, n. 1, p. 81-87.
- YO, S. P. (1999). Analysis of volatile fatty acids in wastewater collected from a pig farm by a solid phase microextraction method. *Chemosphere*, v. 38, n. 4, p. 823-834.

## COLIFORMES E pH – MÉDIAS ARITMÉTICAS, MÉDIAS GEOMÉTRICAS E MEDIANAS

**Marcos von Sperling \***

*\* Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG; Av. Contorno 842 – 7º andar; 30110-060 – Belo Horizonte Email: marcos@desa.ufmg.br*

### INTRODUÇÃO

O presente trabalho apresenta uma discussão sobre a melhor forma de se apresentar resultados de tendência central (médias) dos seguintes parâmetros de qualidade das águas: coliformes e pH. Neste contexto, são analisadas médias aritméticas, médias geométricas e medianas.

Com relação a coliformes, há um consenso de que a média que fornece uma melhor indicação é a média geométrica, pelo fato dos valores de coliformes variarem segundo diversas ordens de magnitude. Neste sentido, um único valor extremamente elevado pode aumentar substancialmente a média aritmética, mesmo que todos os outros valores sejam baixos.

No entanto, com relação a pH, há uma divergência, havendo posicionamentos no sentido de que se pode e outros de que não se pode calcular a média aritmética, já que pH é uma variável transformada da concentração de íons  $[H^+]$ .

O trabalho apresenta dois exemplos simplificados (coliformes e pH), nos quais se investigam os três tipos de representação da tendência central, com duas diferentes formas de se calcular as médias geométricas. A seguir, são utilizados dados reais de monitoramento de qualidade das águas de três postos de monitoramento, avaliando-se a aplicabilidade das médias de coliformes e de pH.

O principal objetivo do trabalho é buscar esclarecer, de forma simples, alguns conceitos importantes que interrelacionam as medidas de tendência central destas importantes variáveis de qualidade das águas.

### EXEMPLO SIMPLIFICADO DE UTILIZAÇÃO DE MÉDIA GEOMÉTRICA PARA COLIFORMES

Suponha-se que tenham sido obtidos os seguintes valores de coliformes fecais em 4 amostras d'água: 50, 400, 3.000 e 20.000 CF/100 mL. Estes dados, juntamente com os seus logaritmos na base 10 ( $\log_{10}$ ) estão apresentados na Tabela 1. Dentro do conceito de que a ordem de grandeza dos coliformes é que é realmente importante, vários pesquisadores relatam os coliformes em termos de magnitude, a qual corresponde ao  $\log_{10}$  do valor original.

Tabela 1- Dados de coliformes  
(dados originais e transformação logarítmica)

Dado	CF/100 mL	Log <sub>10</sub> (CF)
1	5,00 x 10 <sup>1</sup>	1,699
2	4,00 x 10 <sup>2</sup>	2,602
3	3,00 x 10 <sup>3</sup>	3,477
4	2,00 x 10 <sup>4</sup>	4,301

A média geométrica de CF é dada pela raiz n do produto dos n termos:

$$\text{Média geométrica} = (x_1 \cdot x_2 \cdot \dots \cdot x_n)^{1/n} \quad (1)$$

No exemplo, aplicando-se a Equação 1:

$$\text{Média geométrica} = (x_1 \cdot x_2 \cdot x_3 \cdot x_4)^{1/4} = (50 \times 400 \times 3000 \times 20000)^{1/4} = 1047 = 1,047 \times 10^3 \text{ CF/100mL}$$

A média geométrica também pode ser calculada por:

$$\text{Média geométrica} = 10^{(\text{média aritmética dos logaritmos})} \quad (2)$$

No exemplo, a média aritmética dos log<sub>10</sub> dos valores de CF apresentados na Tabela 1 é 3,020.

Assim:

$$\text{Média geométrica} = 10^{(3,020)} = 1047 = 1,047 \times 10^3 \text{ CF/100mL}$$

O valor encontrado é, naturalmente, igual ao obtido através da Equação 1.

Deve-se notar que a média aritmética dos logaritmos pode ser também calculada como: média aritmética dos expoentes + média aritmética dos log<sub>10</sub> dos termos antes dos expoentes. A média aritmética dos expoentes é (1+2+3+4)/4 = 2,500. A média aritmética dos log<sub>10</sub> dos termos antes dos expoentes é: (log5+log4+log3+log2)/4 = 0,520. A média aritmética dos logaritmos é, portanto: 2,500+0,520 = 3,020 (mesmo valor calculado anteriormente).

A seguinte afirmativa é também importante, e facilmente dedutível das considerações acima:

$$\text{Log}_{10} \text{ da média geométrica} = \text{média aritmética dos log}_{10} \quad (3)$$

No exemplo:

$$\text{Log}_{10} (1.047) = 3,020$$

## EXEMPLO SIMPLIFICADO DE UTILIZAÇÃO DE MÉDIA ARITMÉTICA PARA PH

Suponha-se que tenham sido obtidos os seguintes valores de pH em 4 amostras de água: 6,00; 6,70; 7,30; 8,00. Estes dados, juntamente com os correspondentes valores da concentração de íons H<sup>+</sup> (H<sup>+</sup> = 10<sup>-pH</sup>) estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Dados de pH e de  $H^+$   
(dados originais de pH e cálculo de  $H^+$ )

Dado	pH	$[H^+]$
1	6,00	$1,000 \times 10^{-6}$
2	6,70	$1,995 \times 10^{-7}$
3	7,30	$5,012 \times 10^{-8}$
4	8,00	$1,000 \times 10^{-8}$
$[H^+] = 10^{-pH} \quad pH = -\log_{10}(H^+)$		

A média aritmética de pH é:  $(6,00+6,70+7,30+8,00)/4 = 7,00$ .

A média geométrica de  $[H^+]$  é, segundo a Equação 1:

$$\begin{aligned} \text{Média geométrica} &= (x_1 \cdot x_2 \cdot x_3 \cdot x_4)^{1/4} = \\ &= (1,00 \times 10^{-6} \times 1,995 \times 10^{-7} \times 5,012 \times 10^{-8} \times 1,000 \times 10^{-8})^{1/4} = 1,000 \times 10^{-7} \end{aligned}$$

A média geométrica de  $[H^+]$  pode ser também calculada pela Equação 2, incluindo o sinal negativo, pelo fato de  $pH = -\log_{10}(H^+)$ :

$$\text{Média geométrica} = 10^{(-7,000)} = 1,000 \times 10^{-7}$$

Vale aqui também a Equação 3, adaptada para o sinal negativo:

$$-(\log_{10} \text{ da média geométrica de } H^+) = \text{média aritmética de pH}$$

$$-\log_{10} (1,000 \times 10^{-7}) = 7,00$$

O seguinte comentário pode então ser feito. O pH é uma mera representação da concentração dos íons  $H^+$  em uma solução. Se se pode tirar a média geométrica de  $H^+$  (da mesma forma que se tira média geométrica de CF, pelo fato de se ter diferentes ordens de magnitude dos valores), então se pode tirar a média aritmética de pH (já que a média aritmética de pH é igual a  $-\log_{10}$  da média geométrica de  $H^+$ ).

Comentário similar pode ser feito para coliformes: pode-se tirar a média geométrica de CF, assim como se pode tirar a média aritmética dos seus logaritmos.

No entanto, um ponto deve ficar bem claro: a presente análise diz respeito à busca de uma medida de tendência central. Isto não quer dizer que, se misturarmos duas amostras de igual volume, uma com pH 6,0 e outra com pH 8,0, a amostra resultante terá pH 7,0. Com pH, deve-se trabalhar, neste caso, com a concentração de  $[H^+]$ : uma amostra com concentração  $10^{-6}$  e outra com concentração  $10^{-8}$  gerarão uma amostra com a média aritmética de ambas, ou seja,  $(10^{-6} + 10^{-8})/2 = 5,05 \times 10^{-7}$ . O mesmo comentário pode ser feito para coliformes: a mistura de duas amostras gerará uma amostra com a média aritmética das concentrações de CF, e não dos seus logaritmos.

## DESVIO PADRÃO DE COLIFORMES E pH

O conceito de desvio padrão geométrico ( $DP_g$ ), relativo à média geométrica, é distinto do conceito convencional de desvio padrão, para a média aritmética ( $DP_a$ ). Tem-se, ainda, o desvio padrão, com base nos logaritmos dos valores dos dados originais ( $DP_{log}$ ).

Para os coliformes, o desvio padrão convencional, com base na média aritmética (média aritmética =  $5,86 \times 10^3$  CF/100ml), é  $DP_a = 9,52 \times 10^3$  CF/100 mL.

Com relação ao desvio padrão dos logaritmos ( $DP_{log}$ ) das concentrações de CF, tem-se os seguintes valores. No exemplo acima, a média aritmética dos  $\log_{10}$  de CF é 3,020 (já calculada acima), ao passo que o desvio padrão é 1,121 (utilizando-se a fórmula convencional de desvio padrão). A (média)  $\pm$  (1 desvio padrão) dos logaritmos é:  $3,020 \pm 1,121 = 1,899$  a  $4,141$ .

Para o cálculo do desvio padrão geométrico, são necessárias as seguintes considerações. A (média geométrica)  $\times \div$  (1 desvio padrão geométrico) é calculada de acordo com:

$$\text{média geom} \times 1 \text{ desvio padrão geom.} = 10^{(\text{média aritm. dos log} + 1 \text{ desvio padrão aritm. dos log})} \quad (4)$$

$$\text{média geom} \div 1 \text{ desvio padrão geom.} = 10^{(\text{média aritm. dos log} - 1 \text{ desvio padrão aritm. dos log})} \quad (5)$$

$$10^{(3,020 \pm 1,121)} = 10^{1,899} \text{ a } 10^{4,141} = 79 \text{ a } 13836 \text{ CF/100mL}$$

A média geométrica (calculada acima) é 1047 CF/100 mL. Observam-se as seguintes relações (CRITES & TCHOBANOGLIOUS):

$$\frac{(\text{média geom.} \times 1 \text{ desvio padrão geom.})}{\text{média geom.}} = \frac{\text{média geom.}}{(\text{média geométrica} \div 1 \text{ desvio padrão geom.})} \quad (6)$$

$$\text{desvio padrão geom.} = \frac{13836}{1047} = \frac{1047}{79} = 13,2$$

$$\text{média geom.} = \sqrt{(\text{média geom.} \times 1 \text{ desvio padrão geom.}) \times (\text{média geométrica} \div 1 \text{ desvio padrão geom.})} \quad (7)$$

$$\text{média geométrica} = \sqrt{13836 \times 79} = 1047 \text{ CF/100mL}$$

No exemplo, a média geométrica (1047 CF/100mL) é 13,2 vezes superior ao limite inferior da faixa (79 CF/100 mL), e 13,2 vezes inferior ao limite superior da faixa (13836 CF/100 mL). Não há, portanto, um afastamento uniforme entre os limites e a média geométrica, mas sim uma relação uniforme entre ambos. Desta forma, a faixa pode ser entendida como (média geométrica  $\times \div$  desvio padrão geométrico), ao invés de (média  $\pm$  desvio padrão). Caso se extraia os logaritmos destes valores, ter-se-á: média dos  $\log_{10}$   $\pm$  desvio padrão dos  $\log_{10}$ .

Raciocínio similar ao exposto nos parágrafos precedentes se aplica ao pH. O cálculo do desvio padrão para o pH pode ser feito de forma convencional. Já o desvio padrão das concentrações de  $[H^+]$ , tendo por base o conceito da média geométrica, deve seguir a sistemática utilizada acima para CF.

## DETERMINAÇÃO DAS MEDIDAS DE TENDÊNCIA CENTRAL PARA AMOSTRAS EXISTENTES DE CURSOS D'ÁGUA

O presente item apresenta os valores da média aritmética, média geométrica e mediana de 96 dados reais de CF e pH, relativos a pontos de amostragem em uma bacia hidrográfica do Estado de Minas Gerais. Os pontos foram agrupados em um conjunto único, de forma a aumentar o número de dados e a facilitar sua interpretação. Não há necessidade de se caracterizar a bacia hidrográfica, uma vez que o presente trabalho enfoca tão somente os valores numéricos de CF e pH, sem fazer inferências sobre a respectiva qualidade da água.

A Figura 1 apresenta os histogramas de distribuição de frequência de CF e de  $\log_{10}(\text{CF})$ . Observa-se claramente que CF não segue uma distribuição normal, ao passo que o  $\log_{10}(\text{CF})$  não se afasta muito da normalidade. Tal sugere que a distribuição de CF seja log-normal. Testes de aderência a distribuições podem ser feitos (fora do escopo do presente trabalho).

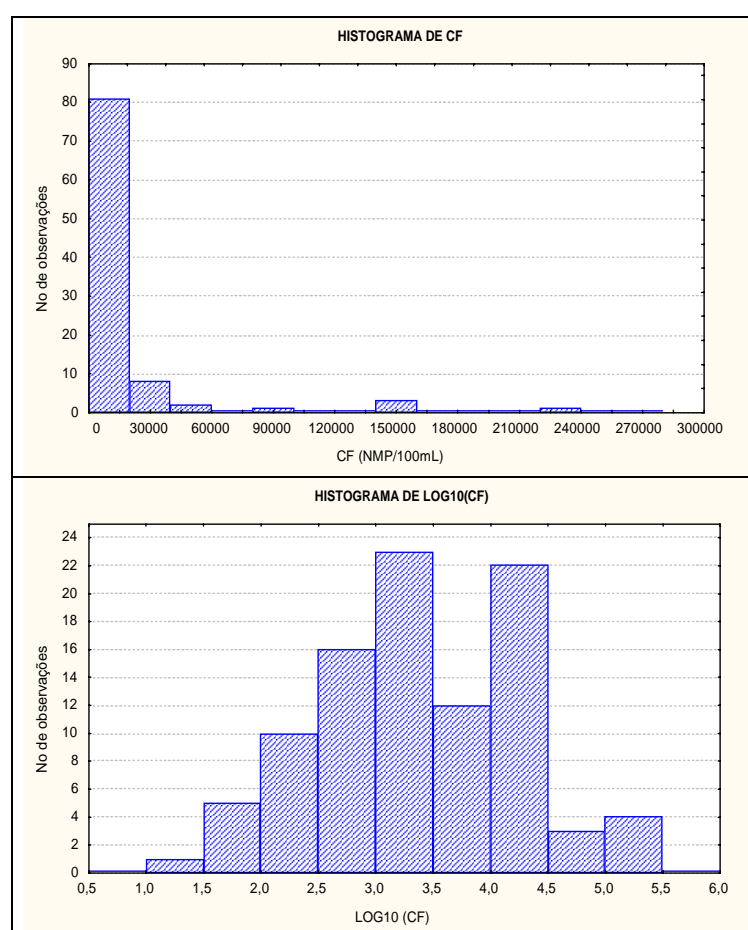


Figura 1 - Histogramas de distribuição de frequência de CF e de  $\log_{10}(\text{CF})$  das 96 amostras analisadas

A Figura 2 apresenta os histogramas de distribuição de frequência de pH e de  $[H^+] = 10^{-pH}$ . Observa-se que pH não se afasta da normalidade, o mesmo não ocorrendo com  $H^+$ , o qual exibe comportamento similar a CF.

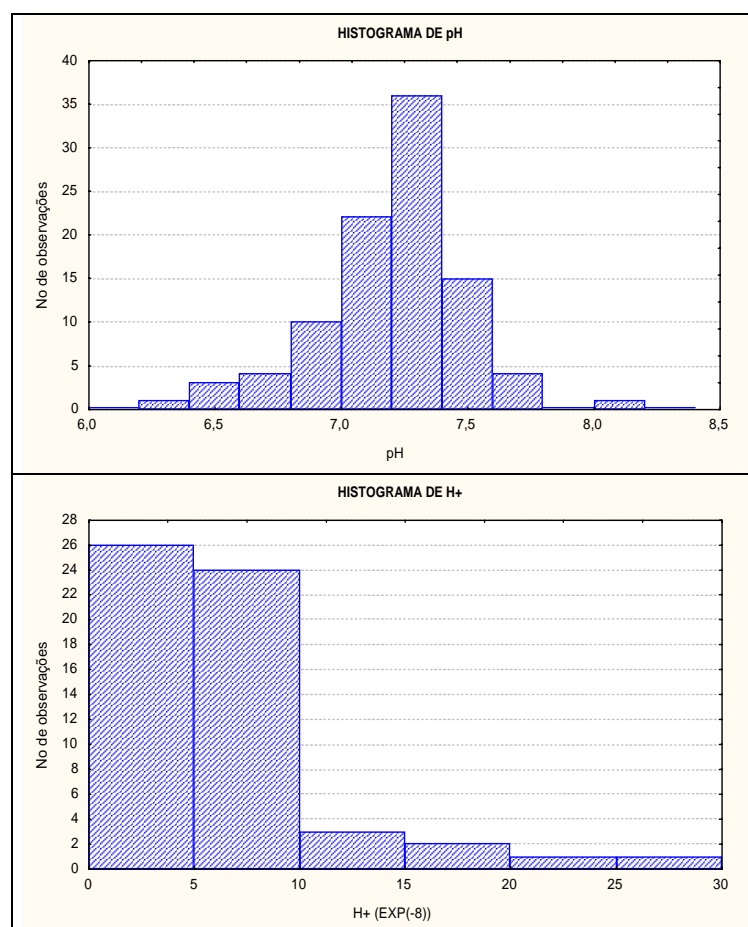


Figura 2 - Histogramas de distribuição de pH e de  $[H^+] = 10^{-pH}$  das 96 amostras analisadas

As medidas de tendência central obtidas para as amostras de CF e pH estão apresentadas na Tabela 3. Observam-se os seguintes pontos, relativos aos dados do presente exemplo:

- Para os parâmetros que variam segundo ordens de grandeza, como CF e  $[H^+]$ , a média geométrica e a mediana têm valores similares, ao passo que a média aritmética tem um valor bem distinto.
- Para os parâmetros que são uma transformação logarítmica dos dados originais, como  $\log_{10}(CF)$  e pH, as três médias possuem valores relativamente próximos entre si.
- Conforme mostrado nos exemplos acima, pode-se verificar que:
  - média geométrica de CF = 10 (média aritm.  $\log CF$ )
  - média geométrica de  $[H^+] = 10^{-}$  (média aritm. pH)

Tabela 3 - Medidas de tendência central de CF e pH das amostras de qualidade das águas

Média	CF/100mL	$\log_{10}(CF)$	pH	$[H^+]$
Média aritmética	15048	3,396	7,227	$7,604 \times 10^{-8}$
Mediana	2250	3,352	7,245	$5,689 \times 10^{-8}$
Média geométrica	2488	3,273	7,221	$5,930 \times 10^{-8}$

A Figura 3 apresenta o box-plot de CF, no qual podem ser observados os três valores das medidas de tendência central, bem como os quartis inferiores e superiores, e os valores mínimos e máximos.

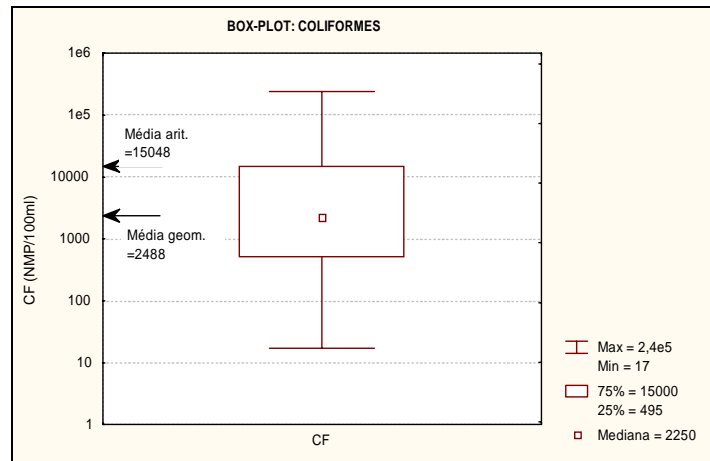


Figura 3 - Box-plot de CF, com indicação da média aritmética, média geométrica e mediana

O desvio padrão convencional ( $DP_a$ ), com base na média aritmética de CF, é 37646 CF/100mL. Desta forma, a faixa da (média)  $\pm$  (1 desvio padrão) é: 15048  $\pm$  37646 = -22598 a 52694 CF/100mL.

O desvio padrão dos log10 de CF ( $DP_{log}$ ) é 0,885. Desta forma, a faixa da (média)  $\pm$  (1 desvio padrão) dos log10 CF é: 3,396  $\pm$  0,885 = 2,511 a 4,281.

O desvio padrão geométrico ( $DP_g$ ) é calculado da seguinte forma. A faixa da (média geométrica)  $x/\div$  (1 desvio padrão geométrico) dos dados de CF é calculada com base na média  $\pm$  desvio padrão dos logaritmos dos valores originais (ver parágrafo acima):  $10^{2,511}$  a  $10^{4,281}$  = 324 a 19099 CF/100mL. Sabendo-se que a média geométrica é 2488 CF/100mL, e de acordo com a Equação 6, tem-se que: desvio padrão geométrico  $2488/324 = 19099/2488 = 7,68$ .

## CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A média aritmética de CF e  $[H^+]$  pode não dar uma boa indicação da tendência central.
- A média geométrica e a mediana de CF e  $[H^+]$  podem dar uma boa indicação da tendência central.
- A média aritmética de  $\log_{10}(CF)$  e de pH pode dar uma boa indicação da tendência central.
- Não há inconsistências em se expressar a média aritmética de pH, já que a mesma está diretamente associada à média geométrica de  $[H^+]$ .
- O desvio padrão geométrico, com base no conceito da média geométrica, é distinto do desvio padrão convencional, baseado na média aritmética.
- Pelo fato da interpretação do desvio padrão geométrico ser totalmente distinta dos desvios padrão convencionais, recomenda-se cautela e clareza na sua utilização, para evitar interpretações errôneas, já que os valores de  $DP_g$  são menores do que os de  $DP_a$ , e a faixa de variabilidade é expressa por (média geométrica  $x/\div$  desvio padrão geométrico), ao invés de (média  $\pm$  desvio padrão).

- Devido à menor utilização do conceito de desvio padrão geométrico, pode-se usar o desvio padrão aritmético (deixando claro o fato de ser  $DP_a$ ), caso se trabalhe com os dados originais, ou o desvio padrão convencional dos logaritmos ( $DP_{\log}$ ), caso se trabalhe com os  $\log_{10}$  dos dados originais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CRITES, R., TCHOBANOGLIOUS, G. (2000). *Tratamiento de aguas residuales en pequeñas poblaciones*. McGraw-Hill, Colombia, 776 pp.

## ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS MÉTODOS DA MEMBRANA FILTRANTE E DO SUBSTRATO CROMOGÊNICO PARA DETERMINAÇÃO DE COLIFORMES FECAIS E *Escherichia coli*

**Henio Normando de Souza Melo\*, Cícero Onofre de Andrade Neto, Josette Lourdes de Sousa Melo e Anita Maria de Lima**

*\* Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Departamento de Engenharia Química, Laboratório de Engenharia Ambiental e Controle de Qualidade. Campus da UFRN, Natal/RN. CEP 59.078-900. Email: henio@eq.ufrn.br*

### INTRODUÇÃO

Por volta de 1940, passou-se a adotar o critério da temperatura elevada para diferenciar os coliformes fecais no grupo de todos os organismos coliformes, baseado em estudos que indicavam que apenas os coliformes fecais tinham capacidade de fermentar a lactose à temperatura de 44-45°C.

Vários estudos e pesquisas realizados nas últimas três décadas têm demonstrado, contudo, que o critério da temperatura elevada não é suficiente para diferenciar coliformes fecais (onde predomina *Escherichia coli*) de não fecais (termosensíveis). Coliformes fecais passaram, então, a ser denominados termotolerantes (ANDRADE NETO, 1999, citando: CERQUEIRA & HORTA, 1999; CEBALLOS, 1995; HAZEN, 1988; EDBERG et al., 1988; DUFOUR, 1977).

Nos meados da década de 1980, intensificaram-se os estudos na busca da identificação e quantificação específica de *Escherichia coli*, que é a espécie termotolerante com maior probabilidade de ter origem fecal e é aceita como origem exclusivamente fecal. Surgiram, então, as técnicas cromofluorogênicas baseadas na quebra de moléculas do substrato 4-metil-umbelliferil- $\beta$ -D-glucoronida pela enzima  $\beta$ -D-glucuronidase, produzida pela *Escherichia coli*, liberando 4-metil-umbelliferil, que produz fluorescência azul intensa sob luz ultravioleta de comprimento de onda 366 nm.

Com o desenvolvimento dos testes de substrato cromogênico, ficou mais simples detectar e quantificar *Escherichia coli* do que coliformes termotolerantes. Em 1995, as técnicas cromofluorogênicas e a escolha de *Escherichia coli* como indicador de contaminação fecal mais adequado estavam suficientemente normatizadas, aceitas e consolidadas (publicadas por APHA/AWWA/WEF, em 1992 e 1995; indicado pela OMS, em 1995).

A “Norma de Qualidade da Água para consumo humano”, anexo da portaria do Ministério da Saúde N° 1469, de dezembro de 2000, define *Escherichia coli* como “sendo considerada o mais específico indicador de contaminação fecal recente e de eventual presença de organismos patogênicos” e estabelece padrão microbiológico com base na detecção de *Escherichia coli* ou coliformes termotolerantes, mas recomenda a primeira para ser, preferencialmente, adotada.

Porém, as concentrações de coliformes termotolerantes estão, geralmente, relacionadas diretamente com as de *E. coli* e, por isso, considera-se aceitável sua utilização para avaliar a qualidade bacteriológica das águas, em análises de rotina, através de técnicas de detecção e contagem consagradas, ainda muito utilizadas devido à simplicidade, à exequibilidade e aos custos.

Ademais, pesquisas e estudos recentes têm demonstrado não haver diferenças significativas quando se utilizam as técnicas usuais (membrana filtrante com meio FC) para quantificação de coliformes termotolerantes ou a técnica cromogênica para *E. coli*, em amostras de esgotos sanitários. CERQUEIRA et al. (1998) aplicando os dois métodos em amostras de afluentes e efluentes de estações de tratamento de esgotos de Belo Horizonte, concluíram que “apesar do teste da membrana filtrante detectar coliformes termotolerantes e o teste cromogênico detectar *E. coli*, os resultados obtidos foram semelhantes, indicando a predominância de *E. coli* na população termotolerante que é característica de amostras de esgotos domésticos”.

*Escherichia coli* tem sido o coliforme mais comumente encontrado em águas contaminadas por fezes e esgotos, enquanto outros gêneros têm sido mais frequentes quando se encontram coliformes termotolerantes em águas sem evidência de contaminação fecal (ANDRADE NETO, 1999).

CHERNICHARO et al. (2000), em análise comparativa das técnicas de tubos múltiplos e de substrato definido aplicadas às amostras de esgoto bruto e de efluentes anaeróbios, concluíram que as duas técnicas comparadas produziram resultados estatisticamente equivalentes, tanto para amostras de esgoto bruto como para efluentes anaeróbios.

## OBJETIVO

Este trabalho compara as técnicas da membrana filtrante e do substrato cromogênico, que identificam, respectivamente, a presença de coliformes fecais e de *Escherichia coli* na determinação de indicadores de contaminação fecal em águas naturais e em esgoto bruto e tratado.

## METODOLOGIA

Este estudo foi desenvolvido em esgoto bruto, em efluente tratado biologicamente em filtros anaeróbios e em água natural proveniente de um manancial de abastecimento da cidade de Natal, denominada Lagoa do Jiqui.

O Esgoto Bruto (EB) é originado no departamento de educação física, no ginásio poliesportivo, no restaurante e no pousou universitário, apresentando, assim, característica de esgoto doméstico. Todas essas unidades estão localizadas nos domínios do Campus Central da UFRN (Universidade Federal do Rio Grande do Norte).

O efluente tratado é proveniente do tratamento biológico realizado nos filtros anaeróbios, com conduítes cortados como material suporte, os quais integram o sistema piloto construído pelo PROSAB/RN na Estação de Tratamento de Efluente do Campus Universitário do Rio Grande do Norte.

O sistema piloto é composto por um Tanque Séptico com Filtros Anaeróbios (TS-FAN). O conjunto é constituído de duas câmaras dispostas em série seguidas de um filtro anaeróbio de

fluxo ascendente e dois filtros anaeróbios com capacidade de 3,38 m<sup>3</sup>, sendo um de fluxo descendente e o outro ascendente, ambos preenchidos com conduítes cortados que servem de material suporte.

A Lagoa do Jiqui está localizada no município de Parnamirim, a cerca de 13 km ao sul de Natal, e é alimentada em parte pelas águas do Rio Pitimbu, e em parte pelos exutórios naturais do grupo barreira, provenientes dos lençóis subterrâneos da região circundante.

### **Coleta de amostras**

Foram realizadas 4 coletas fortuitas em cada ponto estabelecido (Esgoto Bruto, Filtros anaeróbios e Lagoa do Jiqui). As amostras coletadas foram divididas em 3 provas, totalizando, ao final do estudo, 12 amostras para cada ponto estudado. O procedimento de amostragem e acondicionamento é o estabelecido pelo Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 19<sup>th</sup> Edition 1995.

A amostragem foi realizada nos dias 24/07, 01/08, 04/08 e 11/08 de 2000, nos horário de 9:00 h para coleta realizada na Lagoa do Jiqui e 9:40 h para a coleta no sistema piloto localizado na ETE-UFRN. Nessa amostragem foram utilizados recipientes de vidro com boca esmerilhada com capacidade para 1000 mL, devidamente esterilizado.

A amostragem feita na Lagoa do Jiqui foi realizada no ponto de captação, mergulhando o frasco para que fosse preenchido com a amostra. O ponto de Esgoto Bruto foi coletado após o tanque de equalização do sistema piloto, montado pelo PROSAB na ETE-UFRN. Os efluentes dos filtros foram coletados no tanque de acumulação, que tem a finalidade de reunir este efluente.

### **Procedimento de experimental**

#### Preparação do material

- Os frascos de coleta foram esterilizados a 160 °C em estufa durante 2 horas. Antes da esterilização, a tampa do frasco foi protegida com papel bodega, ou papel alumínio, e amarrada com barbante.
- As pipetas graduadas, de 10 e 5 mL foram esterilizadas em estufa a 160 °C durante 2 horas, previamente enroladas com papel.
- As placas de Petri e os tubos de ensaio foram esterilizados a 121 °C por 15 minutos, utilizando bonecas de algodão como tampa na sua extremidade superior, possibilitando condições estéreis do seu interior.

#### Preparo da solução mãe para o líquido de diluição

- Dissolver 3,4 g de fosfato de potássio monobásico em 50 mL de água destilada (o pH deverá ser 7,2). Esterilizar num erlenmeyer durante 15 minutos a 121°C em autoclave. Após a esterilização, cobrir o frasco com papel alumínio e guardar em geladeira.

#### Preparo do líquido de diluição

- Para cada litro de água de diluição, colocar 1,25 mL de solução mãe e 1 litro de água destilada. Esterilizar a 121°C em autoclave durante 15 minutos e guardar em geladeira.

Preparo do meio de cultura

- Pesar 5,2 gramas de m-FC Agar e dissolver em 100 mL de água destilada, utilizar 1 mL de ácido rosólico a 1%, preparado com hidróxido de sódio 0,2 N.
- Aquecer o meio de cultura em banho maria até consistência gelatinosa.
- Distribuir em placas de Petri, tomando o cuidado para a não formação de bolhas, esperar esfriar e acondicionar em geladeira .

**Métodos empregados**Determinação de Coliformes Fecais pelo método da membrana filtrante

## a) Material utilizado

Placas de Petri;	Bico de Busen;
Frascos de vidro com boca esmerilhada de 1.000 mL para coleta;	Membrana de acetato de celulose diâmetro 0,45 µm;
Tubos de ensaio;	Balão volumétrico de 2 litros;
Pipetas graduadas;	Autoclave;
Sistema de filtração (Millipore);	Estufa de esterilização;
Meio de cultura m-FC AGAR (Difco);	Incubadora de coliformes;
Algodão;	Pinça estéril (Millipore).
Água de diluição;	

O fundamento da técnica da membrana filtrante consiste em filtrar um volume conhecido de amostra, ou de suas diluições, através de uma membrana atóxica com porosidade extremamente pequena (0,45µm), a qual retêm as bactérias na sua superfície. As membranas, por sua vez, são acondicionadas sobre um meio de cultura apropriado e encubadas sob uma temperatura de 44,5 °C, onde ocorrerá o desenvolvimento de colônias azuis passíveis de quantificação pela Equação 1.

$$Coli.Total(NMP/100mL) = \frac{N^0 \text{ de colônias} \times 100}{\text{Volume de amostra} \times \text{Diluição}} \quad (1)$$

O meio de cultura utilizado neste estudo foi o m-FC AGAR (Agar/mFC), DIFCO, cuja composição é:

• Triptose bacteriológica	10,0g
• Peptone proteose bacteriológica	5,0g
• Extrato de levedura bacteriológico	3,0g
• Cloreto de sódio	5,0g
• Lactose	12,5g
• Bile salgado bacteriológico nº3	1,5g
• Anilina azul	0,5g
• Agar bacteriológico	15,0g

O meio é preparado utilizando-se as quantidades indicadas pelo fabricante (5,2 g para 100 mL de água) e acrescenta-se, ainda, ácido rosólico a 1% diluído em hidróxido de sódio 0,2 N (para formação coloração azul das colônias). Ao final, apresenta característica sólida.

Com o emprego de uma pinça estéril, a membrana filtrante estéril (com a parte reticulada para cima) é colocada sobre a placa porosa do receptáculo. Em seguida, a parte superior do funil é acoplada e fixada ao receptáculo. Efetua-se uma filtração apenas com água de diluição estéril com a finalidade de lavar o sistema de filtração. Em seguida, nova quantidade de água de diluição estéril é colocada sobre a membrana ainda presa ao sistema de filtração; sobre esta água goteja-se 1 mL da amostra ou diluição previamente preparada e filtra-se. Após esta operação, a membrana é retirada imediatamente com pinça estéril e colocada sobre o meio sólido (ágar) contido em uma placa de Petri, com o cuidado para evitar bolhas de ar aprisionadas. Dando prosseguimento, a placa é rotulada e encubada a  $44 \pm 0,5$  °C por 24 horas. A unidade de filtração é descontaminada, entre as amostras, com água em ebulição.

#### Determinação de Coliformes Totais e *Escherichia Coli* utilizando o substrato cromogênico

##### a) Material utilizado

- Erlenmeyer de 250 mL
- Proveta de 250 mL
- Pipeta graduada de 20 mL
- Bico de Busen
- Quanti - Tray Sealer IDEXX
- Quanti - Tray 2000 (cartelas com 97 concavidades)
- Água de diluição

Todo o material foi esterilizado seguindo os mesmos procedimentos utilizados na metodologia de membrana filtrante.

O princípio do método baseia-se na utilização, pelos coliformes, de um substrato cromogênico ( $\beta$ -D-galactopiranosido) através do emprego da enzima  $\beta$ -D- galactosidase, liberando-se uma substância que muda a cor do meio (o cromogeno onitrofenol amarelo forte). Pode-se então dizer que o teste determina a produção desta enzima (ONPG), normalmente presente nas estirpes de coliformes, e indica, em 24 horas, coliformes totais positivos. Por sua vez, *E. Coli* possui a enzima  $\beta$ -glucoronidase que cliva o  $\beta$ -D-glucoronido-4-metil-umbelliferona liberando (MUG) 4-metil-umbelliferona que é fluorescente sob a luz Ultra Violeta  $\lambda=360\text{nm}$ , ou seja, após 24 horas é possível também determinar a presença de *E.coli*.(CEBALLOS et al., 1999).

Têm sido desenvolvidos vários meios de cultura com MUG, entre eles se destaca o COLILERT<sup>®</sup>, onde o meio de cultura em pó estéril é fornecido em sachet plástico e pronto para adicionar a 100 mL de amostra ou de suas diluições. Para quantificação, usa-se a técnica de número mais provável (NMP), desenvolvida em cartelas plásticas estéreis e descartáveis, que substituem os tradicionais tubos de ensaio. A amostra é colocada na cartela que é selada e, em seguida, encubada a 35 – 37 °C durante 24 horas. Após este período, promove-se à contagem das células que desenvolveram coloração amarelo intenso e/ou fluorescência e, com o auxílio de uma tabela fornecida pela COLILERT<sup>®</sup>, obtém-se o NMP de colônias a partir das relações 2 e 3.

A Quanti – Tray 2000 IDEXX baseia-se no mesmo modelo estatístico que a tradicional diluição serial em 15 tubos. No método serial, diferentes quantidades da amostra são distribuídas em tubos. Em seguida, acrescenta-se água para fins de diluição em volume e de cobrir os tubos de Durham.

Com o sistema Quanti-Tray 2000, a amostra é automaticamente dividida nas porções apropriadas através da Seladora Quanti-Tray, não sendo necessário o uso de tubos de ensaio ou de Durham,

possibilitando a distribuição automática da amostra em 97 concavidades de 2 tamanhos diferentes, que proporciona uma faixa de contagem acima de 2000 colônias, com um nível de confiança de 95% (encarte da COLILERT®).

$$E.coli(NMP/100mL) = \frac{N^0 \text{ encontrado}_{(cartela \rightarrow tabela)}}{Diluição} \quad (2)$$

$$CT(NMP/100mL) = \frac{N^0 \text{ encontrado}_{(cartela \rightarrow tabela)}}{Diluição} \quad (3)$$

#### b) Diluições

As diluições utilizadas nos dois métodos estudados estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Diluições utilizadas nos dois métodos estudados

PONTO	Substrato cromogênico			Membrana filtrante		
Esgoto Bruto	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$
Filtros anaeróbios	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$
Água de superfície	$10^0$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^0$	$10^{-1}$	$10^{-2}$

A escolha de 3 diluições para cada ponto estudado é justificada pela variedade de concentrações de coliformes, em função das chuvas ocorridas durante o período de acompanhamento.

#### c) Avaliação estatística

Para a análise estatística dos dados foi utilizada a distribuição “t” de “Student”, adequada para amostras pequenas ( $N < 30$ ).

Assumindo um nível de significância de 0,01 e 0,05 e grau de liberdade 22 recorreu-se a dados tabelados e encontrou-se valores percentis de  $t_p(t_{0,99})$  igual a 2,51 e  $t_p(t_{0,95})$  igual a 2,07. A equação utilizada para obter os valores de t para os dados amostrais foi:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sigma \sqrt{\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}}} \quad (4) \quad \sigma = \sqrt{\frac{N_1 S_1^2 + N_2 S_2^2}{N_1 + N_2 - 2}} \quad (5)$$

nas quais:

$\bar{X}_n$  = média das amostras

N = número de amostras

$\sigma$  = desvio padrão da população

S = desvio padrão das amostras

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos dados concernente às amostras provenientes da Lagoa do Jiqui mostra (indica) que os valores referentes aos coliformes fecais, obtidos através da técnica da membrana filtrante, mostraram-se sistematicamente superiores aos obtidos pelo método do substrato cromogênico. Não obstante esta constatação, foi possível observar pouca variação nas concentrações, como pode ser comprovado pelos valores de amplitude de  $2,30 \times 10^3$  e  $3,54 \times 10^2$  para os métodos supracitados, respectivamente.

Para possibilitar a confirmação de que a diferença entre as concentrações médias obtidas por ambos os métodos não era significativa, foi aplicado o método da distribuição "t" de "Student", cujos resultados podem ser visualizados na Tabela 2.

Tabela 2 – Valores de t de student nos pontos estudados

PONTO	t	$t_{0,99}$	$t_{0,95}$
Esgoto Bruto	1,894	2,51	2,07
Efluente dos filtros	1,099	2,51	2,07
Lagoa do Jiqui	5,98	2,51	2,07

No caso da água natural da Lagoa do Jiqui, o procedimento da análise de variância mostra que o valor de t (5,98) é muito maior que os valores de  $t_{0,95}$  (2,07) e  $t_{0,99}$  (2,51). Isso indica que a hipótese nula deve ser rejeitada pois a diferença entre as médias das concentrações é significativa.

Contudo, algumas considerações podem ser levantadas como embasamento de uma hipótese explicativa: as amostras foram coletadas nas imediações do ponto de captação para o abastecimento da cidade, com a expectativa de que as concentrações de coliformes fecais sejam realmente pequenas. Assim sendo, a teoria das pequenas amostras  $N < 30$  talvez não seja a mais indicada, devendo-se realizar um aprofundamento do trabalho com uma população amostral superior a 30 amostras para que as conclusões sejam mais precisas.

As amostras de esgoto bruto e tratado apresentaram bastante variações em ambos os métodos utilizados. Os efluentes dos filtros anaeróbios descendentes tiveram amplitudes de variação de  $5,72 \times 10^6$  e  $5,48 \times 10^6$  para os métodos de *E. coli* e coliformes fecais, respectivamente, enquanto que as amplitudes para o esgoto bruto foram de  $5,63 \times 10^6$  e  $4,9 \times 10^6$ .

A comparação estatística efetuada por meio da análise de variância mostrou que, em ambos os casos, as diferenças das médias não foram significativas. Os resultados no Esgoto Bruto apresentou  $t=1,894$ , sendo, portanto, menor que os valores de  $t_{0,95}=2,07$  e  $t_{0,99}=2,51$ . Isso posto, pode-se concluir que está confirmada a hipótese nula, indicando que as diferenças médias de concentração de coliformes nesses casos não são representativas.

Os resultados obtidos de *Escherichia coli*, pelo método cromogênico, e de coliforme fecal, por meio da metodologia de membrana filtrante em m-FC AGAR, podem ser observados na Tabela 3 e nas Figuras 1, 2 e 3.

Tabela 3 – Resultados obtidos nos pontos estudados

Amostra	Esgoto Bruto		Filtros anaeróbios		Lagoa do Jiqui	
	<b>E. coli*</b>	Coli. fecais	E. Coli*	Coli. fecais	E. coli*	Coli. fecais
1	$5,50 \times 10^5$	$5,00 \times 10^6$	$1,33 \times 10^6$	$1,80 \times 10^5$	$3,24 \times 10^1$	$6,00 \times 10^2$
2	$2,47 \times 10^6$	$4,47 \times 10^6$	$1,39 \times 10^6$	$2,00 \times 10^5$	$4,78 \times 10^1$	$7,00 \times 10^2$
3	$5,65 \times 10^6$	$2,00 \times 10^6$	$1,41 \times 10^6$	$2,10 \times 10^5$	$5,31 \times 10^1$	$5,00 \times 10^2$
4	$5,16 \times 10^5$	$2,45 \times 10^6$	$4,48 \times 10^5$	$1,30 \times 10^6$	$1,17 \times 10^2$	$7,00 \times 10^2$
5	$4,20 \times 10^4$	$2,74 \times 10^6$	$9,36 \times 10^5$	$5,66 \times 10^6$	$9,71 \times 10^1$	$1,40 \times 10^3$
6	$2,00 \times 10^4$	$1,00 \times 10^5$	$4,53 \times 10^6$	$3,74 \times 10^6$	$7,28 \times 10^1$	$1,00 \times 10^3$
7	$4,45 \times 10^5$	$8,37 \times 10^5$	$6,17 \times 10^6$	$6,40 \times 10^5$	$2,44 \times 10^2$	$1,70 \times 10^3$
8	$1,26 \times 10^6$	$3,55 \times 10^6$	$1,16 \times 10^6$	$1,64 \times 10^6$	$1,72 \times 10^2$	$1,80 \times 10^3$
9	$5,98 \times 10^5$	$1,34 \times 10^6$	$2,06 \times 10^6$	$3,58 \times 10^5$	$2,50 \times 10^2$	$2,00 \times 10^3$
10	$6,98 \times 10^5$	$2,24 \times 10^6$	$1,41 \times 10^6$	$2,49 \times 10^5$	$2,18 \times 10^2$	$1,80 \times 10^3$
11	$5,39 \times 10^5$	$2,32 \times 10^6$	$1,96 \times 10^6$	$3,30 \times 10^5$	$3,87 \times 10^2$	$1,70 \times 10^3$
12	$3,76 \times 10^6$	$4,58 \times 10^6$	$1,56 \times 10^6$	$3,98 \times 10^5$	$2,81 \times 10^2$	$2,80 \times 10^3$
<b>média</b>	<b><math>1,38 \times 10^6</math></b>	<b><math>2,64 \times 10^6</math></b>	<b><math>2,03 \times 10^6</math></b>	<b><math>1,24 \times 10^6</math></b>	<b><math>1,64 \times 10^2</math></b>	<b><math>1,39 \times 10^3</math></b>
<b>mínimo</b>	<b><math>2,00 \times 10^4</math></b>	<b><math>1,00 \times 10^5</math></b>	<b><math>4,48 \times 10^5</math></b>	<b><math>1,80 \times 10^5</math></b>	<b><math>3,24 \times 10^1</math></b>	<b><math>5,00 \times 10^2</math></b>
<b>máximo</b>	<b><math>5,65 \times 10^6</math></b>	<b><math>5,00 \times 10^6</math></b>	<b><math>6,17 \times 10^6</math></b>	<b><math>5,66 \times 10^6</math></b>	<b><math>3,87 \times 10^2</math></b>	<b><math>2,80 \times 10^3</math></b>
<b>amplitude</b>	<b><math>5,63 \times 10^6</math></b>	<b><math>4,90 \times 10^6</math></b>	<b><math>5,72 \times 10^6</math></b>	<b><math>5,48 \times 10^6</math></b>	<b><math>3,54 \times 10^2</math></b>	<b><math>2,30 \times 10^3</math></b>
<b>desv.pad</b>	<b><math>1,65 \times 10^6</math></b>	<b><math>1,46 \times 10^6</math></b>	<b><math>1,64 \times 10^6</math></b>	<b><math>1,73 \times 10^6</math></b>	<b><math>1,07 \times 10^2</math></b>	<b><math>6,71 \times 10^2</math></b>
<b>int.conf</b>	<b><math>9,36 \times 10^5</math></b>	<b><math>8,27 \times 10^5</math></b>	<b><math>9,31 \times 10^5</math></b>	<b><math>9,78 \times 10^5</math></b>	<b><math>6,07 \times 10^1</math></b>	<b><math>3,80 \times 10^2</math></b>

\**Escherichia coli* – obtido pela técnica do substrato cromogênico utilizando COLILERT®

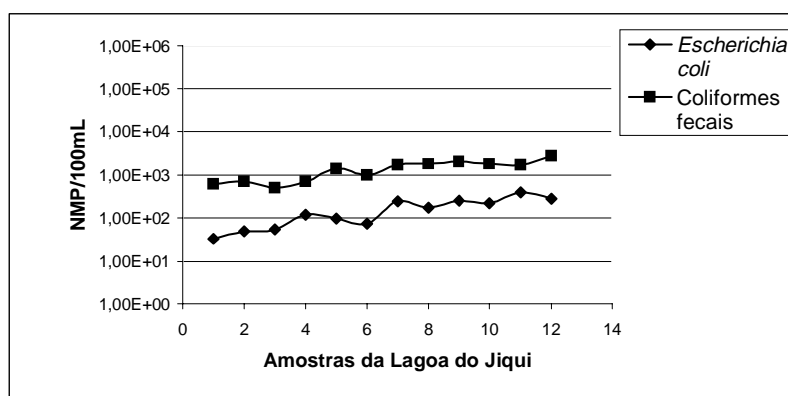


Figura 1 – Concentrações na Lagoa do Jiqui (água natural)

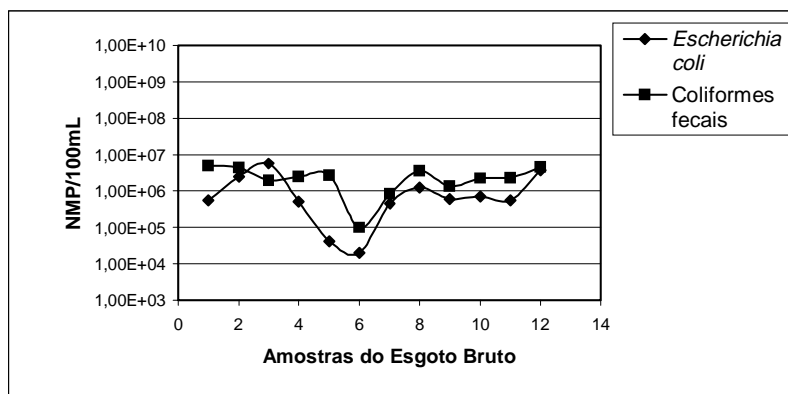


Figura 2 – Concentrações nos Filtros (efluente tratado)

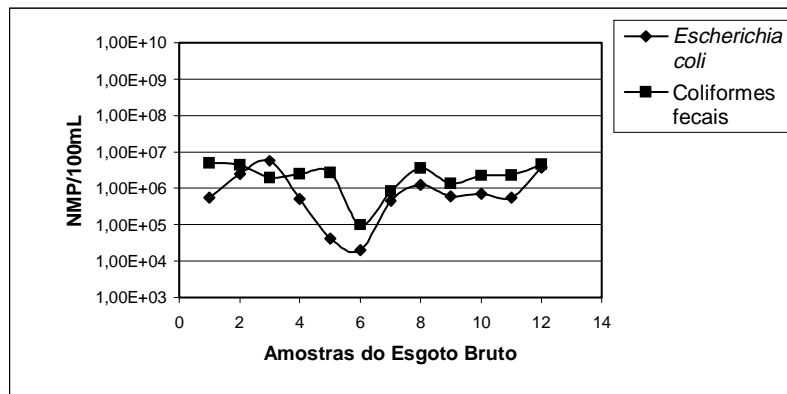


Figura 3 – Concentrações no Esgoto Bruto

Observa-se que, sobretudo na água natural da lagoa do Jiqui, os valores das concentrações de coliformes fecais, obtidos pelo método da membrana filtrante, são maiores quando comparados com as concentrações de *Escherichia coli*, obtidos a partir do substrato cromogênico. Este fato indica que a determinação de coliformes termotolerantes é mais abrangente e a quantificação de *Escherichia coli*, como indicador de contaminação, é mais seletiva, justificando as diferenças apresentadas.

A utilização do substrato cromogênico, como método analítico de determinação da contaminação em efluentes, mostrou-se bastante confiável, podendo ser utilizado em substituição ao método da membrana filtrante que determina a concentração de coliformes fecais.

## CONCLUSÕES

Nas amostras de Esgoto Bruto e do efluente do filtro anaeróbio não se verificam diferenças estatisticamente significativas, quando aplicadas as técnicas da membrana filtrante com meio m-FC Agar ou da COLILERT®.

Para amostras de água natural, provenientes de manancial e com baixa contaminação fecal, as técnicas comparadas mostraram resultados diferentes, sendo o número de coliformes fecais sistematicamente maior que o de *E. coli*. Contudo, em face da reduzida representatividade dos indicadores, recomenda-se estudos mais profundos e com maior número de amostras, antes de formular conclusões definitivas em relação às águas naturais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE NETO, C. O. de. (1999). *Bactérias Indicadoras de Contaminação Fecal*. Monografia Inédita (cópias restritas). UFRN, Natal, 31p.
- APHA/AWWA/WEF (1995). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 19<sup>th</sup> edition. New York American Public Health Association.
- CEBALLOS, B. S. O. (1995). *Utilização de Indicadores Microbiológicos na Tipologia de Ecossistemas Aquáticos do Trópico Semi-Árido*. (Tese de Doutorado) São Paulo, USP, 192p. 1995.

- CEBALLOS, B.S.O., PELLIZARI, V.H., KONIG, A., CATÃO, R.M.R. (1999). *Novas Metodologias em Microbiologia Ambiental*. Notas de Aulas do Curso “Novas Metodologias em Microbiologia Ambiental”. Campina Grande – PB, AESA/DEC/CCT/UFPB. 34p.
- CERQUEIRA, D.A., GALINARI, P.C., BRITO, L.L.A., AMARAL, G.C.M. (1998). Detecção de Coliformes Fecais pela Técnica da Membrana Filtrante (m – FC – 44,5 +/- 0,2 °C) e pelo Sistema Cromogênico (Colilert – Quanti-Tray 2000). *Anais do XXVI Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental*, Lima-Peru, AIDIS, 4p. 1998.
- CERQUEIRA, D.A., HORTA, M.C. (1999). Coliformes Fecais Não Existem. *Anais do 20º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*. Rio de Janeiro, ABES, p.1239-1244. 1999.
- CHERNICHARO, C.A.L., ZERBINI, A.M., BITTENCOURT, R.B. (2000). *Análise comparativa das técnicas de tubos múltiplos e de substrato definido, aplicadas à identificação de coliformes em amostras de esgotos brutos e de efluentes anaeróbios*. Projeto PROSAB. 1998.
- DUFOUR, A. P. (1977). *Escherichia coli*: The fecal coliform. In: Bacterial indicators/ Health Hazards Associated with Water. (*Special Technical Publication 635*). Philadelphia, American Society for Testing and Materials, p.48-58.
- EDBERG, S.C., ALLEN, M.J., SMITH, D.B. (1988). Rapid, Specific, Defined Substrate Technology for the Simultaneous Detection of Total Coliforms and *Escherichia coli*. *Toxicity Assessment: An International Journal*, vol. 3, p.565-580.
- HAZEN, T.C. (1988). Fecal Coliforms as Indicators in Tropical Waters: a Review. *Toxicity Assessment: An International Journal*, vol. 3, p.461-463.
- OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. (1995). *Guías para la Calidad del Agua Potable*. (vol. 1, Recomendaciones, cap. 2: Aspectos Microbiológicos). Ginebra, OMS.
- SPIEGEL, M. R. (1975). *Estatística: resumo da teoria, 875 problemas resolvidos, 619 problemas propostos*; São Paulo. McGraw Hill do Brasil.

## ANÁLISE COMPARATIVA DAS TÉCNICAS DE TUBOS MÚLTIPLOS E DE SUBSTRATO DEFINIDO, APLICADAS À IDENTIFICAÇÃO DE COLIFORMES EM AMOSTRAS DE ESGOTOS BRUTOS E DE EFLUENTES ANAERÓBIOS

**Carlos Augusto de Lemos Chernicharo\*, Adriana Molina Zerbini, Roseli Bernardo Bittencourt**

*\*Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - Av. do Contorno, 842 – 7º andar – 30110-060 – Belo Horizonte – MG - Tel: (031) 238.1020 – Fax: (031) 238.1879 – E-mail: [calemos@desa.ufmg.br](mailto:calemos@desa.ufmg.br)*

### INTRODUÇÃO

Para avaliação das condições sanitárias de uma água, freqüentemente são empregadas as bactérias do grupo coliformes, que atuam como indicadores de poluição fecal. Seu emprego, dentre outros fatores, se deve ao fato de que estão sempre presentes no trato intestinal humano e de outros animais de sangue quente, sendo eliminadas pelas fezes em grandes números.

Como o grupo dos coliformes totais inclui gêneros que não são de origem exclusivamente fecal, isto limita sua aplicação como indicador específico de contaminação fecal. O reconhecimento deste fato levou ao desenvolvimento de métodos de enumeração de um subgrupo dos coliformes, denominado coliformes fecais (coliformes termotolerantes), os quais são diferenciados dos coliformes totais pela sua capacidade de fermentar a lactose sob temperatura elevada ( $44,5 \pm 0,2$  °C).

Embora a utilização dos coliformes termotolerantes, em substituição aos totais, tenha determinado uma melhoria significativa na detecção da contaminação fecal, logo tornou-se evidente a existência de outros coliformes termotolerantes, além da *Escherichia coli*, podendo-se estimar que cerca de 15% dos testes positivos para coliformes termotolerantes referem-se a outros coliformes que não *E. coli*. Segundo CAPELNAS & KANAREK (1984) e EDBERG et al. (1988), citados por CERQUEIRA (1999), os organismos presentes nesse percentual são representados por espécies dos gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Citrobacter*, provenientes de contribuição ambiental (solo, vegetais e águas pristinas). Em ambientes aquáticos tropicais, esses gêneros são facilmente isolados em condições em que não se observa poluição fecal humana e animal.

Nesse sentido, as tendências atuais se direcionam para a detecção específica de *Escherichia coli*, que é o único componente do grupo coliforme de origem exclusivamente fecal, apresentando um percentual de ocorrência em fezes humanas e animais próximo a 94% (ALLEN, 1995, citado por CERQUEIRA, 1999).

De acordo com STANDARD METHODS (AWWA/APHA/WEF, 1998), as técnicas usuais empregadas para se detectar microrganismos indicadores de contaminação fecal em amostras de água e esgoto são: i) Tubos Múltiplos; ii) Membrana Filtrante; e iii) Substrato Definido. Cada uma dessas técnicas apresenta suas vantagens e desvantagens em termos de simplicidade, rapidez, custos e demanda de equipamentos laboratoriais e de pessoal qualificado. Anteriormente, justificava-se utilizar o teste da temperatura elevada para a diferenciação da

porção fecal dos coliformes, uma vez que a detecção de *E. coli* era demorada e complexa para exames de rotina. Atualmente, com o advento dos testes cromogênicos (substrato definido), a detecção e identificação da *E. coli* tornou-se simples e rápida, embora os custos de materiais para realização das análises sejam ainda relativamente elevados.

## OBJETIVOS

Considerando-se as grandes vantagens do teste cromogênico (substrato definido) para a enumeração de *E. coli*, principalmente em termos de simplicidade e rapidez, objetivou-se nesse trabalho a análise comparativa entre as técnicas de tubos múltiplos e de substrato definido, a partir dos perfis de ocorrência de coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*, em esgoto bruto e no efluente de um reator anaeróbio.

Tal análise comparativa foi motivada, primariamente, para se saber se as contagens (número mais provável) de coliformes totais e *E. coli* obtidas com o método de substrato definido (Colilert, Quanti-Tray 2000) seriam estatisticamente equivalentes às obtidas com o método de tubos múltiplos, possibilitando, dessa forma, a comparação dos resultados entre as diferentes pesquisas que integram o PROSAB – Edital 2 – Tema 2, uma vez que as mesmas utilizam diferentes métodos para detecção e enumeração de coliformes.

Adicionalmente, a análise comparativa dos dois métodos possibilitaria verificar se os resultados obtidos com o método de substrato definido podem ser comparados com limites máximos estabelecidos pela legislação ambiental (Resolução nº. 20 – CONAMA), visando a verificação de enquadramento, ou não, dos corpos receptores, em termos de coliformes totais e coliformes fecais (termotolerantes).

## METODOLOGIA

Para se avaliar comparativamente os métodos de tubos múltiplos e de substrato definido, foram analisadas, simultaneamente, amostras de esgoto bruto e de efluentes anaeróbios, coletadas, também, simultaneamente, em dias e horários distintos.

Tendo em vista que a técnica de substrato definido possibilita a enumeração de coliformes totais (CT) e *Escherichia coli* (EC), enquanto a técnica de tubos múltiplos possibilita a enumeração de coliformes totais (CT) e coliformes fecais (CF), a comparação entre as contagens pelos dois métodos foi feita considerando-se:

- Coliformes totais: técnica de tubos múltiplos (CT) x técnica de substrato definido (CT).
- Coliformes fecais/*Escherichia coli*: técnica de tubos múltiplos (CF) x técnica de substrato definido (EC).

### Amostragem e preparo das amostras

Foram coletadas amostras pontuais do esgoto bruto e do efluente de um reator UASB, no período de setembro a outubro/99, provenientes do Laboratório de Instalações Piloto (LIP) do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (DESA), da Escola de Engenharia da UFMG.

O esgoto bruto foi coletado na saída da tubulação de recalque, após ser bombeado para o LIP, a partir de um interceptor da margem direita do Ribeirão Arrudas, configurando-se, dessa forma, um esgoto representativo da cidade de Belo Horizonte.

O efluente anaeróbio foi coletado na saída de um reator UASB (420 L), que se encontra em operação no LIP há mais de quatro anos. O esgoto bruto, antes de ser encaminhado ao reator

UASB, era submetido a um tratamento preliminar, constituído de um cesto coletor de sólidos, caixa de areia e caixa de acumulação/distribuição.

Após a coleta, as amostras foram transportadas para o Laboratório de Análises Bacteriológicas do DESA, sendo imediatamente processadas, não havendo necessidade de preservação. Foram processadas 12 amostras de esgoto bruto e 12 de efluente anaeróbio, segundo a rotina de coleta e preparo das amostras apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 – Rotina de coleta e preparo das amostras

Data	Horário de coleta (horas)	Diluições utilizadas								
		Técnica de Tubos Múltiplos						Técnica de Substrato Definido		
		Esgoto bruto			Efl. UASB			Esgoto bruto		
20/09/99	9:30	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	-
	10:30	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	-
	11:30	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	-
28/09/99	9:30	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>9</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	-	-
	10:30	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>9</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	-	-
	11:30	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>9</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	-	-
05/10/99	9:30	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>6</sup>	-	-
	10:30	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>6</sup>	-	-
	11:30	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>6</sup>	-	-
18/10/99	9:30	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>6</sup>	-	-
	10:30	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>6</sup>	-	-
	11:30	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>6</sup>	-	-

### Quantificação de coliformes pela técnica de tubos múltiplos

Para a quantificação de coliformes totais e coliformes fecais pela técnica de tubos múltiplos, foram utilizadas três séries de cinco tubos, com concentração simples de caldo lactosado. O número mais provável (NMP/100 mL) de coliformes foi obtido através de tabelas estatísticas, com um limite de confiança de 95% para cada valor de NMP determinado, de acordo com os procedimentos descritos no STANDARD METHODS (AWWA/APHA/WEF, 1998).

### Quantificação de coliformes pela técnica de substrato definido

Para a quantificação de coliformes totais e *Escherichia coli* pela técnica de substrato definido, foi utilizado o sistema quanti-tray 2000, que permite uma leitura de coliformes totais/*E. coli* variando de 1 a 2419,20 (NMP/100 mL), a partir de uma tabela estatística com limite de confiança de 95% para os valores determinados. As análises foram realizadas de acordo com os procedimentos descritos no STANDARD METHODS (AWWA/APHA/WEF, 1998).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises bacteriológicas efetuadas pelos métodos de tubos múltiplos e substrato definido são apresentados nas Tabelas 2 e 3. Nas Figuras 1 a 3 são mostrados os resultados de coliformes totais e nas Figuras 4 a 6 os resultados de coliformes fecais e *Escherichia coli*.

Tabela. 2 – Concentrações de coliformes totais, coliformes fecais e *Escherichia coli* no esgoto bruto

Amostra	Dia da coleta	Horário da coleta (h)	Tubos Múltiplos (NMP/100 mL)		Substrato Definido (NMP/ 100 mL)	
			Col. Totais	Col. Fecais	Col. Totais	<u>E. coli</u>
1	20/09/99	9:30	3,3E+07	1,60E+09	5,4E+07	5,2E+06
2		10:30	2,8E+08	2,60E+07	7,2E+07	5,2E+06
3		11:30	2,8E+08	2,60E+07	3,8E+06	6,3E+06
4	28/09/99	9:30	4,0E+07	2,0E+07	2,4E+09	4,4E+07
5		10:30	2,2E+08	8,0E+07	4,5E+08	2,1E+07
6		11:30	1,6E+10	3,4E+08	1,9E+08	2,0E+07
7	05/10/99	9:30	2,4E+07	3,90E+07	1,5E+09	5,6E+07
8		10:30	4,8E+07	3,90E+07	2,1E+08	3,7E+07
9		11:30	1,6E+09	4,8E+07	2,6E+08	9,6E+06
10	18/10/99	9:30	1,4E+07	4,0E+06	1,6E+09	5,0E+07
11		10:30	4,2E+08	2,1E+08	2,5E+08	8,6E+06
12		11:30	4,0E+07	4,8E+07	1,2E+09	2,4E+07

Tabela. 3 – Concentrações de coliformes totais, coliformes fecais e *Escherichia coli* no efluente do reator UASB

Amostra	Dia da coleta	Horário da coleta (h)	Tubos Múltiplos (NMP/100 mL)		Substrato Definido (NMP/100 mL)	
			Col. Totais	Col. Fecais	Col. Totais	<u>E. coli</u>
13	20/09/99	9:30	4,0E+06	2,00E+06	1,0E+06	1,0E+06
14		10:30	2,0E+06	2,00E+06	5,9E+07	2,0E+07
15		11:30	6,0E+06	6,00E+06	1,2E+07	6,3E+06
16	28/09/99	9:30	7,0E+05	4,0E+05	8,8E+07	2,0E+07
17		10:30	2,6E+06	1,7E+06	5,3E+07	1,1E+07
18		11:30	1,4E+06	4,0E+05	2,8E+07	8,6E+06
19	05/10/99	9:30	6,0E+06	4,0E+06	1,8E+07	2,0E+06
20		10:30	4,0E+06	4,0E+06	5,3E+07	3,0E+06
21		11:30	1,0E+07	8,0E+06	1,0E+08	8,6E+06
22	18/10/99	9:30	3,9E+07	3,2E+07	1,2E+07	4,1E+06
23		10:30	8,0E+06	8,0E+06	4,4E+07	3,1E+06
24		11:30	(*)	(*)	(*)	(*)

(\*) A amostra n°. 24 foi perdida

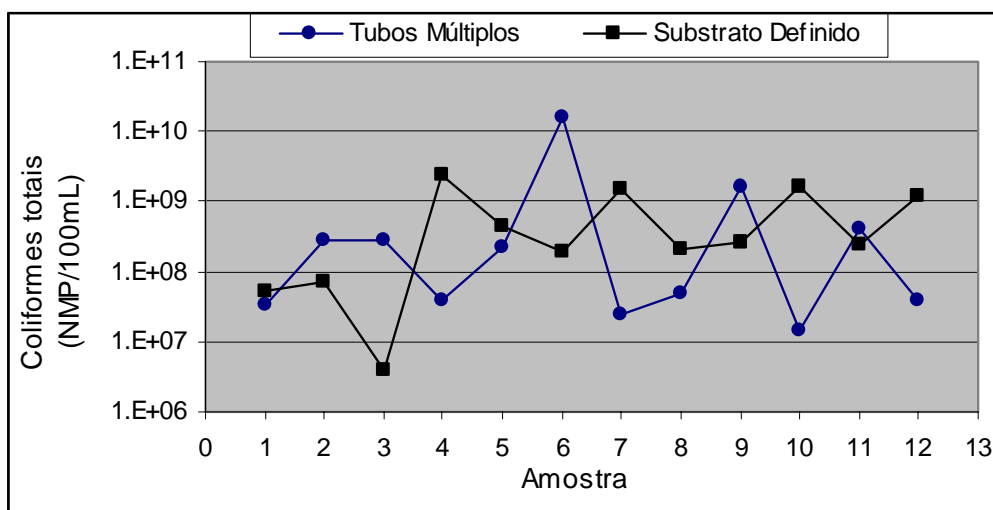


Figura 1 – Concentrações de coliformes totais no esgoto bruto

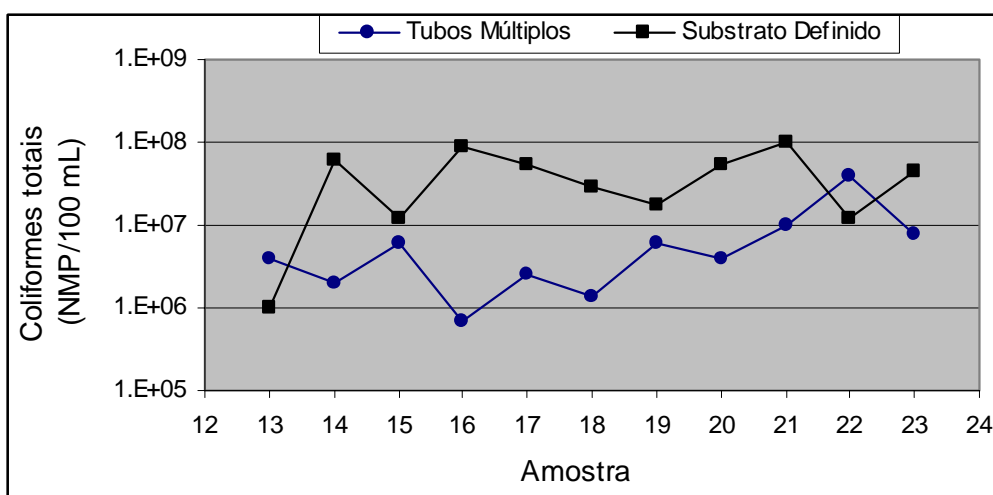


Figura 2 – Concentrações de coliformes totais no efluente do reator UASB

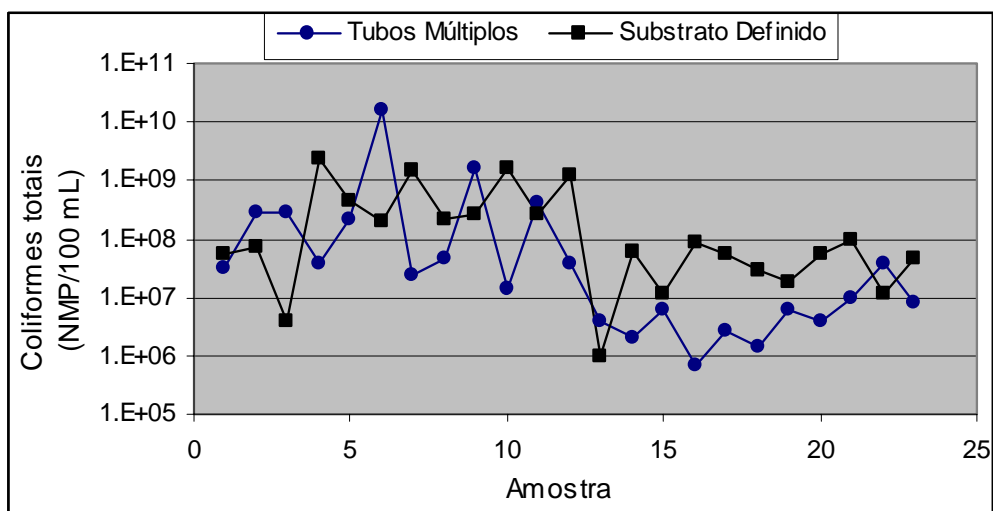


Figura 3 – Concentrações de coliformes totais no esgoto bruto e no efluente do reator UASB

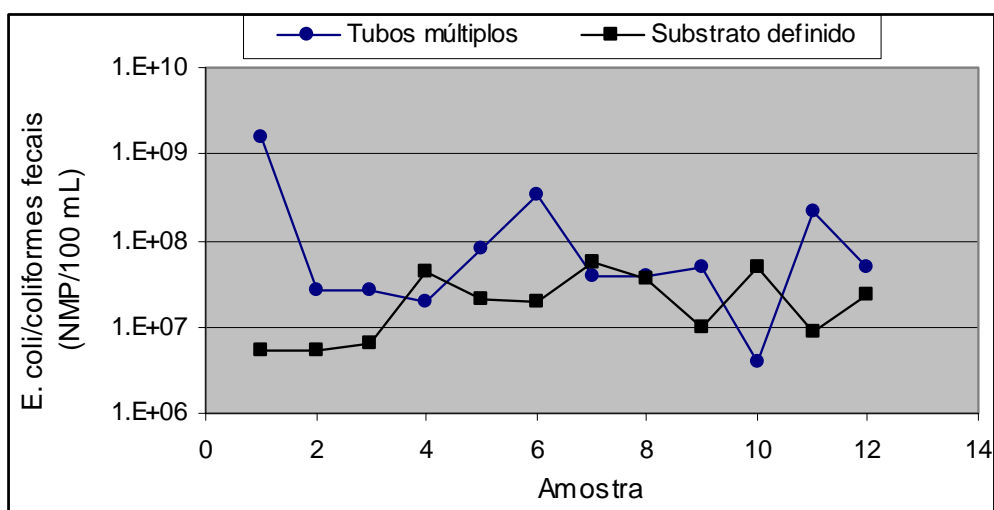


Figura 4 – Concentrações de *E. coli* e coliformes fecais no esgoto bruto

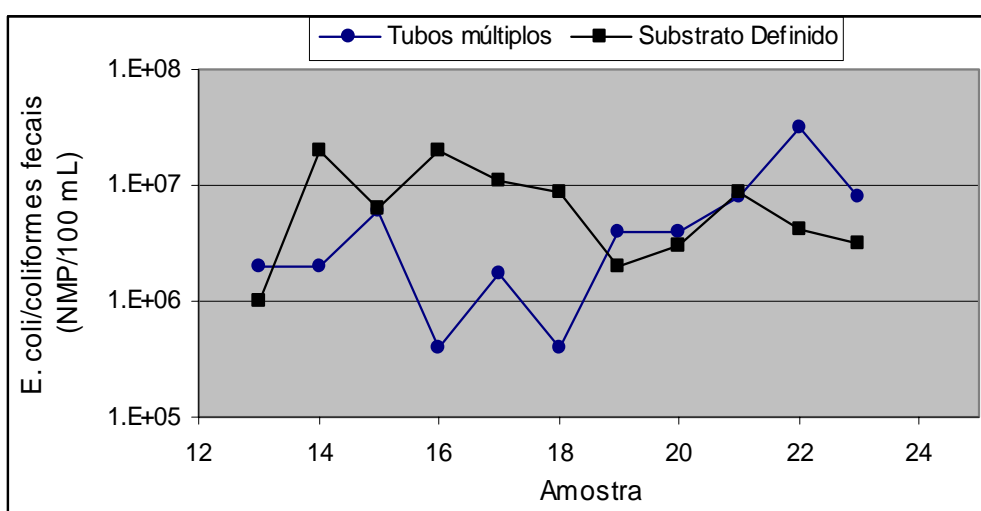


Figura 5 – Concentrações de *E. coli* e coliformes fecais no efluente do UASB

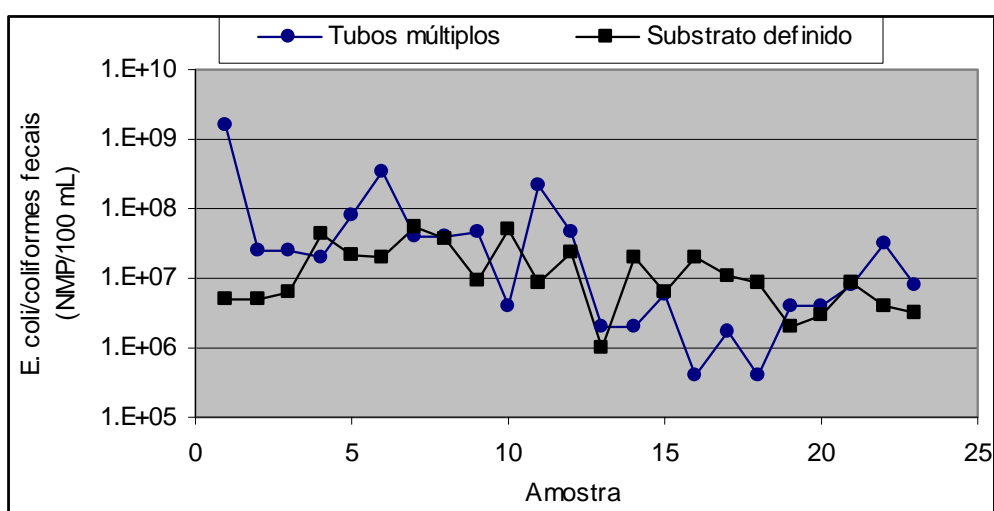


Figura 6 – Concentrações de *E. coli* e coliformes fecais no esgoto bruto e no efluente do reator UASB

## Coliformes totais

Nas Figuras 1 a 3 são mostrados os resultados de coliformes totais obtidos pelas duas técnicas, inicialmente para o esgoto bruto (Figura 1), depois para o efluente anaeróbio (Figura 2) e, por último, para o conjunto de resultados obtidos com o esgoto bruto e com o efluente anaeróbio (Figura 3).

### Esgoto bruto

Pela análise da Figura 1, pode-se observar que as concentrações de coliformes totais no esgoto bruto apresentaram-se bastante variáveis ao longo do período de monitoramento (para diferentes dias e horários de coleta de amostras), para ambas as técnicas de enumeração. No entanto, as concentrações de coliformes totais obtidas com as duas técnicas testadas apresentaram-se aparentemente equivalentes, não tendo sido possível observar nenhuma tendência de super- ou sub-estimação de uma técnica em relação à outra. Para se confirmar que os resultados obtidos com a técnica de substrato definido não foram diferentes dos obtidos com a técnica de tubos múltiplos, foi realizado o teste estatístico de análise de variância, com intervalo de confiança de 95%, tendo sido obtidos os dados de saída apresentados na Tabela 4. Pode-se observar, a partir da Tabela 4, a confirmação da hipótese nula, ou seja, de não haver diferença entre as médias das concentrações de coliformes totais obtidas com os dois métodos, uma vez que o valor de  $F$  (0,454) é muito inferior ao valor de  $F_{\text{crítico}}$  (7,945).

### Efluente do reator UASB

Em relação ao efluente do reator UASB, a análise da Figura 2 mostra que as contagens de coliformes totais pelas duas técnicas mantiveram-se mais estáveis ao longo do período de monitoramento, mas com uma tendência de obtenção de resultados mais elevados com a técnica de substrato definido. Para avaliar se esses resultados mais elevados obtidos com a técnica de substrato definido configuravam-se estatisticamente diferentes dos resultados obtidos com a técnica de tubos múltiplos, foi novamente realizado o teste de análise de variância, tendo sido obtidos os dados de saída apresentados na Tabela 4. Observa-se, nesse caso, que o valor de  $F$  (11,316) é maior que o valor de  $F_{\text{crítico}}$  (7,945), indicando que a hipótese nula deve ser rejeitada, ou seja, que os resultados obtidos com os dois métodos podem ser considerados estatisticamente diferentes. Todavia, a análise estatística foi efetuada para um pequeno conjunto de dados (12 análises), sendo recomendado que mais testes sejam realizados para se inferir com maior precisão as tendências observadas nesse estudo comparativo das duas técnicas.

Tabela 4 – Resultados dos testes de análise de variância entre as concentrações de coliformes totais obtidas com as técnicas de substrato definido e tubos múltiplos

Amostra	Grupo	Técnica	F	valor-P	F crítico
<b>Esgoto bruto</b>	C. totais	Substrato Definido	0,454	0,507283	7,945
	C. totais	Tubos Múltiplos			
<b>Efluente UASB</b>	C. totais	Substrato Definido	11,316	0,002802	7,945
	C. totais	Tubos Múltiplos			

### Coliformes fecais/*Escherichia coli*

Nas Figuras 4 a 6 são mostrados os resultados de coliformes fecais e *Escherichia coli* obtidos pelas duas técnicas, inicialmente para o esgoto bruto (Figura 4), depois para o efluente anaeróbio (Figura 5) e, por último, para o conjunto de resultados obtidos com o esgoto bruto e com o efluente anaeróbio (Figura 6).

#### Esgoto bruto

Pela análise da Figura 4, pode-se observar que as concentrações de coliformes fecais e de *E. coli* no esgoto bruto apresentaram-se bastante variáveis ao longo do período de monitoramento (para diferentes dias e horários de coleta de amostras), para ambas as técnicas de enumeração. No entanto, as concentrações de coliformes fecais e de *E. coli* obtidas com as técnicas de tubos múltiplos e de substrato definido, respectivamente, apresentaram-se aparentemente equivalentes, com uma maior diferença sendo observada apenas para a amostra 1. Não foi possível observar nenhuma tendência de super- ou subestimação de uma técnica em relação à outra. Para se confirmar que os resultados obtidos com a técnica de substrato definido (*E. coli*) não foram diferentes dos obtidos com a técnica de tubos múltiplos (coliformes fecais), foi realizado o teste estatístico de análise de variância, tendo sido obtidos os dados de saída apresentados na Tabela 5. Os resultados da análise estatística confirmam a aceitação da hipótese nula, ou seja, de não haver diferença entre as médias das concentrações de coliformes fecais e de *E. coli*, uma vez que o valor de  $F(1,570)$  é muito inferior ao valor de  $F_{\text{crítico}}(7,945)$ .

#### Efluente do reator UASB

Em relação ao efluente do reator UASB, a análise da Figura 5 mostra que as contagens de coliformes fecais e de *E. coli* também foram muito variáveis ao longo do período de monitoramento, para as duas técnicas de análise testadas. Aparentemente, não houve super- ou subestimarão de contagens de uma técnica em relação à outra. A confirmação de que os resultados obtidos com a técnica de substrato definido (*E. coli*) não foram diferentes dos obtidos com a técnica de tubos múltiplos (coliformes fecais), foi obtida, novamente, com a utilização do teste estatístico de análise de variância, conforme mostram os dados de saída apresentados na Tabela 5. Os resultados da análise estatística confirmam a aceitação da hipótese nula, ou seja, de não haver diferença entre as médias das concentrações de coliformes fecais e de *E. coli*, uma vez que o valor de  $F(0,280)$  é muito inferior ao valor de  $F_{\text{crítico}}(7,945)$ .

Tabela 5 – Resultados dos testes de análise de variância entre as concentrações de coliformes fecais e de *E. coli* obtidas com as técnicas tubos múltiplos e de substrato definido

Amostra	Grupo	Técnica	F	Valor-P	F crítico
<b>Esgoto bruto</b>	E. coli C. fecais	Substrato Definido	1,570	0,223422	7,945
		Tubos Múltiplos			
<b>Efluente UASB</b>	E. coli C. fecais	Substrato Definido	0,280	0,601829	7,945
		Tubos Múltiplos			

## CONCLUSÕES

As técnicas de tubos múltiplos e de substrato definido, para enumeração de **coliformes totais** em esgoto bruto, se mostraram estatisticamente equivalentes, com grau de confiança de 95%, conforme demonstrado pelos testes de análise de variância efetuados. Já para o efluente anaeróbio, os resultados de enumeração obtidos com as duas técnicas se mostraram estatisticamente diferentes. Todavia, a análise estatística foi efetuada para um pequeno conjunto de dados (12 análises), sendo recomendado que mais testes sejam realizados para se inferir com maior precisão as tendências observadas.

As duas técnicas comparadas, utilizadas para enumeração de **coliformes fecais** (tubos múltiplos) e *Escherichia coli* (substrato definido), produziram resultados estatisticamente equivalentes, tanto para amostras de esgoto bruto quanto de efluente anaeróbio. Dessa forma, pode-se inferir que os resultados obtidos nas diferentes pesquisas que integram o PROSAB – Edital 2 – Tema 2, em termos de coliformes fecais e *E. coli*, podem ser analisados de forma comparativa. Além disso, pode-se verificar o enquadramento dos corpos receptores, definidos pela legislação ambiental em termos de coliformes fecais, com base nos resultados de *E. coli* obtidos pela técnica de substrato definido.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, M. J., EDBERG, S. C (1995). The public health significance of bacterial indicators in drinking water. International Conference “Coliforms and *E. coli*: Problem or solution?”, University of Leeds, UK, september, 24 – 27, apud CERQUEIRA, D. A. et al. (1999). Perfis de ocorrências de coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* em diferentes amostras de água. In: *Anais eletrônicos do 20º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*, ABES, Rio de Janeiro.
- AWWA/APHA/WEF. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20ª edition, Washington, 1998.
- CAPELNAS, N. R., KANAREK, M. S. (1984). Thermotolerant nonfecal source of *Klebsiella pneumoniae*: validity of the fecal coliform test in recreational waters. American Journal of Public Health, v. 74, n.11, p. 1273 – 1275, apud CERQUEIRA, D. A. et al. (1999). Perfis de ocorrências de coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* em diferentes amostras de água. In: *Anais eletrônicos do 20º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*, ABES, Rio de Janeiro.
- CERQUEIRA, D. A., BRITO, L. L. A., GALINARI, P. C. & AMARAL, G. C. M. (1999). Perfis de ocorrências de coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* em diferentes amostras de água. In: *Anais eletrônicos do 20º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*, ABES, Rio de Janeiro.
- CETESB (1993). *Norma técnica L5.202 – Coliformes totais e fecais – Determinação pela técnica de Tubos Múltiplos – Método de ensaio*, 39 p.
- EDBERG, S. C., ALLEN, M. J. & SMITH, D. B (1988). National field evaluation of a defined substrate method for the simultaneous enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* from drinking water: comparison with the standard multiple tube fermentation method. Applied Bacteriology, v. 54, n. 6, p. 1595 – 1601, apud CERQUEIRA, D. A. et al. (1999). Perfis de ocorrências de coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* em diferentes amostras de água. In: *Anais eletrônicos do 20º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*, ABES, Rio de Janeiro.

# METODOLOGIAS PARA QUANTIFICAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE VIABILIDADE DE OVOS DE HELMINTOS EM ESGOTOS BRUTOS E TRATADOS

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>71</b>
<b>QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE OVOS DE HELMINTOS.....</b>	<b>71</b>
<i>Considerações preliminares.....</i>	<i>71</i>
<i>Principais metodologias para quantificação e identificação .....</i>	<i>72</i>
<i>Método de Bailenger modificado .....</i>	<i>75</i>
Descrição do método de <i>Bailenger modificado</i> .....	75
Equipamentos, materiais e reagentes .....	76
Preparação de soluções .....	76
Procedimentos para quantificação dos ovos.....	76
Expressão de resultados .....	78
Ilustração fotográfica dos procedimentos .....	79
<i>Identificação de ovos de helmintos.....</i>	<i>80</i>
Considerações preliminares.....	80
Critérios para diferenciação de ovos de helmintos .....	80
Ilustração fotográfica de ovos de helmintos .....	83
<b>DETERMINAÇÃO DE VIABILIDADE DE OVOS DE HELMINTOS .....</b>	<b>85</b>
<i>Considerações preliminares.....</i>	<i>85</i>
<i>Principais técnicas disponíveis.....</i>	<i>85</i>
Técnica de incubação.....	86
Técnica de critérios morfológicos .....	87
Técnica da flutuação com n-butanol.....	87
Técnica de inclusão ou exclusão de corantes biológicos.....	88
<i>Descrição da técnica de incubação adaptada .....</i>	<i>89</i>
Equipamentos, materiais e reagentes .....	89
Preparação de soluções .....	89
Coleta de amostras.....	90
Procedimento .....	90
Expressão dos resultados .....	90
Ilustração fotográfica dos procedimentos .....	92
Ilustração fotográfica do desenvolvimento de ovos de <i>Ascaris lumbricoides</i> .....	94
<i>Descrição da técnica de inclusão ou exclusão de corantes biológicos .....</i>	<i>95</i>
Aplicação para esgotos brutos (técnica da concentração por centrifugação) .....	95
Equipamentos, materiais e reagentes .....	95
Preparação de soluções .....	95
Coleta de amostras.....	96
Procedimento .....	96
Expressão dos resultados .....	97
Ilustração fotográfica dos procedimentos .....	98
Aplicação para esgotos tratados (técnica da concentração por filtração).....	99
Equipamentos, materiais e reagentes .....	99
Preparação de soluções .....	99
Coleta de amostras.....	99
Procedimento .....	100
Expressão dos resultados .....	100
Ilustração fotográfica dos procedimentos .....	102
Ilustração fotográfica de ovos de helmintos pela técnica da coloração.....	103
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>104</b>
<i>Metodologia de quantificação e identificação de ovos de helmintos .....</i>	<i>104</i>
<i>Metodologias de viabilidade de ovos de helmintos.....</i>	<i>104</i>
<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>105</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>105</b>

## **METODOLOGIAS PARA QUANTIFICAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE VIABILIDADE DE OVOS DE HELMINTOS EM ESGOTOS BRUTOS E TRATADOS**

**Adriana Molina Zerbini e Carlos Augusto de Lemos Chernicharo\***

*\* Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - Escola de Engenharia da UFMG.  
Avenida do Contorno, 842/701 - 30110-060 - Belo Horizonte - MG.  
E-mail: calemos@desa.ufmg.br*

### **INTRODUÇÃO**

Este trabalho apresenta uma consolidação de metodologias para análises de ovos de helmintos em esgotos brutos e tratados, no que diz respeito à sua quantificação, identificação e determinação de viabilidade, objetivando a padronização de procedimentos nas pesquisas apoiadas pelo PROSAB – Edital 2 – Tema 2.

Esta consolidação foi realizada a partir da implementação de procedimentos laboratoriais de rotina, que vêm propiciando o acompanhamento das pesquisas com ovos de helmintos em esgotos brutos e tratados. Os procedimentos ora descritos são oriundos, primariamente, dos trabalhos desenvolvidos por AYRES & MARA (1996); GALVÁN, GUTIÉRREZ & de VICTORICA (1996); GALVÁN & de VICTORICA (1998) e ROJAS, GALVÁN & de VICTORICA (1998), os quais foram parcialmente adaptados pelo Laboratório de Análises Microbiológicas do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – DESA/UFMG, para atender às necessidades das pesquisas desenvolvidas no âmbito do PROSAB.

### **QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE OVOS DE HELMINTOS**

#### **Considerações preliminares**

Com o desenvolvimento da parasitologia médica, diversas técnicas foram propostas para a quantificação 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 quantificação de ovos de helmintos em esgotos (AYRES, 1989; STIEN & SCHWARTZBROD, 1988; WHO, 1989; AYRES & MARA, 1996) e em lodo (MEYER et al., 1978).

Diversos métodos para a quantificação de ovos de helmintos em esgotos 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 (ver Tabela 1). 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 esgotos 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 quantificação 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 são conhecidas. Deve-se levar em consideração o objetivo da pesquisa e o tipo de sistema que está sendo utilizado para o tratamento dos esgotos, 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 será satisfatória dependerão do balanço hidrofílico-lipofílico dos organismos 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 e cada espécie responderá diferentemente a essas alterações. Assim, nenhum método concentrará todas as espécies com a mesma eficiência (AYRES & MARA, 1996).

### Principais metodologias para quantificação e identificação

Diversos estudos foram efetuados comparando as metodologias para análises de ovos de helmintos em fezes, visando a sua adaptação para amostras de esgotos, 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 esgotos. 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*.

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, iodomercurato 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 Nematódeos, a exemplo de *Trichuris* sp. e *Capillaria* sp.;
- 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 quantificação 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 rotineiramente encontradas em esgotos sanitários.

AYRES et al. (1991) testaram os seguintes métodos para a quantificação de ovos de helmintos em efluentes tratados:

- método correntemente recomendado pela WHO, mais comumente conhecido como método de *Bailenger modificado*, 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 *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 1 L da amostra para efluente 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. 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 quantificação de ovos de helmintos em esgotos tratados;
- 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 a 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 modificado* (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.

CRISPIM et al. (1995) testaram e avaliaram o desempenho dos métodos EXTRABES e *Leeds I* (citados por AYRES et al., 1989), em comparação ao método de *Bailenger modificado*. Observou-se que este último apresentou uma eficiência 1,5 vezes maior que o método EXTRABES e 7,8 vezes maior que o método de *Leeds I*, e os autores concluíram que o percentual de recuperação de ovos diminui à medida em que se aumenta o valor de sólidos sedimentáveis.

As principais características dos métodos mais comumente utilizados para quantificação e identificação de ovos de helmintos são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Principais métodos para quantificação de ovos de helmintos em esgotos

Método	Princípio	Volume (L)	Período de Sedimentação	Centrifugação	Tampão ou Detergente	Flutuação	Cálculo	Taxa de recuperação	Observações	Referência
WHO	Sedimentação	≥ 1	De um dia para outro	1.000 g durante 15 minutos	Ácido acético (pH 4,5)	Sulfato de zinco (densidade relativa 1,18)	$N = \frac{X.V}{P.S}$	-	Esgotos brutos e tratados	WHO (1989)
WHO	Centrifugação e flutuação	1	De um dia para outro	700 g durante 10 minutos	-	Nitrato de sódio (densidade relativa 1,30)	No. total recuperado de 1 L	70% / 100 ovos 50% / 10 ovos 33% / 1 ovo	Esgotos brutos e tratados	WHO (1989)
Leeds I	Sedimentação	1	Não há (Toda a amostra é centrifugada)	2.500 rpm durante 10 minutos	0,01% Triton X100	MgSO <sub>4</sub> ou NaCl (densidade relativa 1,30)	-	24 ± 4%	Esgotos brutos	AYRES et al. (1989)
Leeds II	Sedimentação	4	1 hora	2.500 rpm durante 10 minutos	0,01% Triton X100	NaCl (densidade relativa 1,04)	Câmara de contagem de Doncaster	80%	Efluentes de lagoas de estabilização	AYRES et al. (1989)
Stien & Schwartzbrod	Sedimentação e flutuação	25	2 horas	1.000 g durante 15 minutos	Eter/butanol/ácido acético (pH 4,5)	*reagente Janeckso-Urbanyi (densidade relativa 1,42)	$N = \frac{M.A}{P.V}$	50%	Esgotos brutos e tratados	STIEN & SCHWARTZBROD (1988)
BAILENGER Modificado	Sedimentação e flutuação	1 (esgoto bruto) 10 (esgoto tratado)	1 a 2 horas	1.000 g durante 15 minutos	Aceto-acético (pH 4,5) 0,1 Triton X100	Sulfato de zinco (densidade relativa 1,18)	$N = \frac{A.X}{P.V}$	-	Esgotos brutos e tratados	AYRES & MARA (1996)

Fonte: Adaptado de HINDIYEH (1995)

\* 100 g iodeto de mercúrio

80 g iodeto de potássio

250 mL água destilada

◇ N = número de ovos/L

X = número de ovos contados

V = volume do produto final (mL)

P = volume do produto na câmara de contagem (mL)

S = volume da amostra de esgotos (L)

◆ N = número de ovos/L

A = número de ovos contados

M = volume do menisco (mL)

P = volume da câmara de McMaster (mL)

V = volume original da amostra (L)

♣ N = número de ovos/L

A = número de ovos contados (média)

X = volume final do amostra (mL)

P = volume da câmara de McMaster (mL)

V = volume original da amostra (L)

### Método de Bailenger modificado

Para a quantificação e identificação de ovos de helmintos em esgotos domésticos, a técnica mais utilizada é a da sedimentação dos sólidos contendo os ovos de helmintos. Dos métodos disponíveis, destacam-se o descrito em WHO (1989) e o de *Bailenger modificado* (AYRES & MARA, 1996).

Embora a percentagem de recuperação do método de *Bailenger modificado* não seja conhecida (AYRES & MARA, 1996), e este não seja adequado para a identificação de vários ovos de trematódeos operculados e de alguns ovos de cestódeos, estudos desenvolvidos por BOUHOUM & SCHWARTZBROD (1989) e AYRES *et al.* (1991) demonstraram que o método se compara favoravelmente em relação a outras técnicas, sendo capaz de recuperar uma maior diversidade de espécies de ovos de helmintos, incluindo *Ascaris* sp., *Trichuris* sp., *Capillaria* sp., *Enterobius vermicularis*, *Toxocara* sp., *Taenia* sp., *Hymenolepis* sp e Ancilostomídeos.

Nesse sentido, o presente trabalho descreve o método de BAILENGER (1979), modificado por AYRES & MARA (1996), que deu origem à metodologia atualmente recomendada pela Organização Mundial de Saúde para a quantificação de ovos de helmintos em esgotos brutos e tratados, conforme descrito na publicação "Analysis of wastewater for use in agriculture – a laboratory manual for parasitological and bacteriological techniques" (AYRES & MARA, 1996). Este método foi escolhido em função de sua simplicidade e de seu baixo custo dos reagentes utilizados, além do que propicia a recuperação de uma ampla faixa de ovos de helmintos, particularmente ovos de nematódeos (*Ascaris* sp., *Trichuris* sp. e ancilostomídeos), que são especificados no guia da Organização Mundial de Saúde para o reúso na agricultura, conforme estudo específico desenvolvido por AYRES *et al.* (1991).

### Descrição do método de *Bailenger modificado*

As amostras de esgotos a serem processadas passam pelas etapas de sedimentação, centrifugação e flutuação. Após sucessivas centrifugações da amostra, com descarte do sobrenadante, o sedimento é 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 ( $\text{ZnSO}_4$  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 2. Pode-se observar, que com exceção dos ovos de *Schistosoma 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 2 - Tamanho, densidade e velocidade de sedimentação de algumas espécies de ovos de helmintos

Espécie	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	1,06	0,26

Fonte: DUNN (1991)

### Equipamentos, materiais e reagentes

Para a preparação das amostras e quantificação de ovos de helmintos, de acordo com o método de *Bailenger modificado*, são necessários os seguintes equipamentos, materiais e reagentes (AYRES & MARA, 1996):

- Microscópio óptico comum, com objetivas de 10x e 40x
- Centrífuga para operar a 1.000 g
- Tubos de centrífuga
- Agitador Vortex
- Bomba de sucção ou sifão
- Câmara de McMaster
- Pipetas de Pasteur
- Pipetas volumétricas
- Densímetro
- Béquer de 1 litro
- Balde de 10 litros
- Garrações de plástico com tampa de rosca e capacidade para 1 e 10 litros
- Solução tampão aceto-acética (pH 4,5)
- Solução de sulfato de zinco (densidade 1,18)
- Solução Triton X-100 ou Tween 80
- Éter ou acetato de etila

### Preparação de soluções

São os seguintes os principais procedimentos para preparação das soluções, necessárias à quantificação de ovos de helmintos pelo método de *Bailenger modificado*:

- Solução de sulfato de zinco: pesar 33 g de  $\text{ZnSO}_4$  e diluir em 100 mL de água destilada (utilizar um densímetro para verificar se a densidade é igual a 1,18).
- 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 1.000 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.

### Procedimentos para quantificação dos ovos

De acordo com o método de *Bailenger modificado*, são adotados os seguintes procedimentos para preparação das amostras e quantificação 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 (ver nota 1).
- b) Deixar a amostra sedimentar em um béquer (esgoto bruto) ou em um balde (esgoto tratado). Usualmente, têm sido adotados tempos de sedimentação de cerca de 1 hora para o esgoto bruto e de 2 horas para o esgoto tratado (ver nota 2).
- 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. Inclinando 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 o 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 1.000 g (ver nota 3) por 15 minutos.
- f) Após a primeira centrifugação, descartar o sobrenadante. Transferir todos os sedimentos para um único tubo e centrifugar novamente a 1.000 g (ver nota 3) 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. Exemplo: se o volume do sedimento for 2 mL, adicionar 4 mL de éter ou acetato de etila.
- i) Centrifugar a 1.000 g (ver nota 3) 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 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, sedimento + sulfato de zinco (X mL) e homogeneizar a amostra com equipamento tipo Vortex.
- 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 durante 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 (ver nota 4). Para uma melhor precisão na quantificação dos ovos, deve-se fazer a leitura de mais de uma câmara, preferencialmente três, e calcular a média aritmética das contagens obtidas (ver expressão de cálculo no item seguinte).

#### **Notas:**

- (1) o método é muito eficiente quando utilizado para esgotos brutos, os quais usualmente apresentam uma elevada concentração de ovos de helmintos. Para esgotos tratados, no entanto, o número de ovos tende a ser muito baixo; nestes casos, o volume da amostra deve ser aumentado pelo menos para 10 litros, objetivando uma melhor recuperação dos ovos. Caso o número de ovos de helmintos no esgoto bruto também seja baixo, deve-se aumentar o volume da amostra de 1 para 5 litros.
- (2) dependendo da altura do recipiente utilizado, o período de sedimentação dos ovos deve ser aumentado. A lei de Stokes' pode ser utilizada para se estimar as taxas de sedimentação dos ovos de

nematódeos em esgotos, conforme a seguir (taxas usualmente adotadas, para uma temperatura de 20 °C):

- *Ascaris lumbricoides*: 20 mm/min
- *Trichuris trichiura*: 16 mm/min
- Ancilostomídeos: 6 mm/min

Para garantir a recuperação de todos os ovos, é recomendado que o tempo de sedimentação adotado seja pelo menos o dobro do tempo de sedimentação teórico (calculado de acordo com a lei de Stokes'). A experiência do DESA/UFMG tem indicado que tempos de sedimentação ainda maiores favorecem uma maior recuperação dos ovos.

(3) a expressão que relaciona “g” com “rpm” é como a seguir:

$$rpm = \sqrt{\frac{k \cdot g}{r}}$$

na qual:

k: 89.456

r: o raio da centrífuga (distância entre o eixo da centrífuga e o centro do recipiente), em cm

(4) se a quantidade de ovos contidos dentro do retículo for zero, ou muito baixa, deve-se contar os eventuais ovos que poderão estar fora do retículo

### Expressão de resultados

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

$$N = \frac{A \times X}{P \times V}$$

na qual:

N: número de ovos (nº de 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 (ver procedimento "a")

### Ilustração fotográfica dos procedimentos

Alguns dos procedimentos para preparação das amostras e quantificação dos ovos de helmintos são ilustrados a seguir:



Fig. 1 – Remoção do sobrenadante após o período de sedimentação (procedimentos "b" e "c")



Fig. 2 – Etapas de centrifugação (procedimentos "e", "f" e "i")



Fig. 3 – Separação de fases da amostra (procedimento "i")



Fig. 4 – Homogeneização da amostra com Vortex (procedimentos "h" e "k")

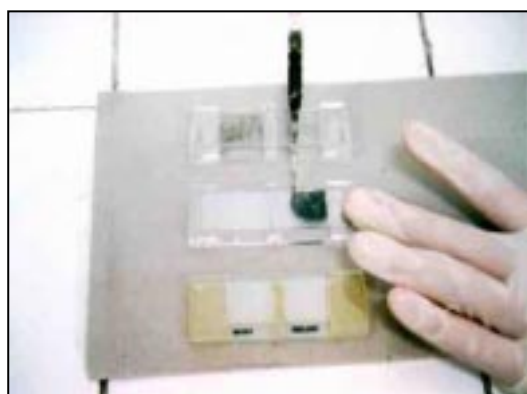


Fig. 5 – Transferência do sedimento homogeneizado para a câmara de McMaster (procedimento "l")



Fig. 6 – Observação dos ovos no microscópio, em objetivas de 10x e 40x (procedimento "m")

## **Identificação de ovos de helmintos**

### Considerações preliminares

Os esgotos domésticos podem conter uma variedade de ovos de helmintos provenientes das fezes humanas. Além disso, podem apresentar, com frequência, ovos de parasitos de animais, como de porcos, ratos, cachorros e pássaros, juntamente com os ovos de parasitos intestinais humanos. Nesse sentido, a correta identificação dos ovos de helmintos deve ser realizada baseando-se, principalmente, nas suas características morfológicas e de tamanho. Para tal, torna-se indispensável proceder à medição exata dos ovos, utilizando-se um microscópio calibrado, de forma a se conseguir a correta identificação e diferenciação dos ovos de helmintos presentes na amostra. Isso porque o tamanho dos ovos é um dos principais critérios que diferencia a classificação das espécies de parasitos.

### Critérios para diferenciação de ovos de helmintos

A identificação dos ovos de helmintos é baseada, principalmente, no tamanho e na identificação de características morfológicas específicas dos ovos, tais como: forma, conteúdo do ovo, espessura da membrana externa (casca) etc. São os seguintes os principais critérios para identificação dos ovos (STOTT, 1998):

- tamanho: os ovos de helmintos variam, em comprimento, de pequenos (18  $\mu\text{m}$ ) a grandes (150  $\mu\text{m}$  ou maiores) e possuem diâmetros tão pequenos como 12 a 14  $\mu\text{m}$  (como é o caso de alguns ovos de trematódeos) a 90  $\mu\text{m}$  ou mais (caso dos maiores ovos de trematódeos);
- forma: os ovos de helmintos podem ser de forma esférica ou oval, embora alguns poucos possam ser assimétricos;
- membrana externa: os ovos de helmintos usualmente apresentam parede externa lisa, variando na espessura, dependendo da espécie;
- conteúdo interno: os ovos recentemente excretados apresentam estágios de desenvolvimento que são característicos para cada espécie. Em sua maioria, os ovos de nematódeos não apresentam-se embrionados quando liberados com as fezes;
- várias modificações da estrutura dos ovos também se constituem ferramentas importantes de identificação, a exemplo de: protuberâncias, espinhos, rolhas polares e opérculos.

Um resumo das principais características que auxiliam na diferenciação de alguns ovos de helmintos é apresentado na Tabela 3. Na Figura 7 são apresentados os tamanhos relativos dos ovos de helmintos.

Tabela 3 – Principais características de alguns ovos de helmintos usualmente encontrados em esgotos brutos e tratados

Ovo	Tamanho	Principais características
<i>Ascaris lumbricoides</i> (fértil)	55 a 75 $\mu\text{m}$ x 35 a 50 $\mu\text{m}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• forma: esférica ou oval</li> <li>• cor: castanho-amarelada</li> <li>• possui membrana mamilonada (alguns ovos podem apresentar-se sem essa membrana – ovo descorticado)</li> <li>• casca espessa</li> </ul>
<i>Ascaris lumbricoides</i> (infértil)	85 a 95 $\mu\text{m}$ x 43 a 47 $\mu\text{m}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• forma: alongada</li> <li>• membrana mamilonada delgada</li> </ul>
<i>Trichuris trichiura</i>	50 a 55 $\mu\text{m}$ x 22 a 24 $\mu\text{m}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• forma: aspecto típico de um pequeno barril</li> <li>• cor: castanho</li> <li>• possui duas rolhas polares</li> <li>• possui duas membranas</li> </ul>
Ancilostomídeo	<i>Ancylostoma duodenale</i> : em torno de 60 $\mu\text{m}$ <i>Necator americanus</i> : em torno de 70 $\mu\text{m}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• forma: ovóide ou elíptica</li> <li>• sem segmentação ou clivagem</li> <li>• entre a casca e a célula-ovo há sempre um espaço claro que diminui à medida que avança a segmentação</li> <li>• membrana fina e transparente envolvida por uma linha preta</li> </ul>
<i>Enterobius vermicularis</i>	50 a 60 $\mu\text{m}$ x 20 a 32 $\mu\text{m}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• membrana dupla, lisa e transparente</li> <li>• ligeiramente achatado de um lado</li> <li>• possui no seu interior uma larva já formada</li> </ul>
<i>Hymenolepis diminuta</i>	70 a 80 $\mu\text{m}$ de diâmetro	<ul style="list-style-type: none"> <li>• forma: aproximadamente esférica</li> <li>• apresenta dupla casca</li> <li>• não possui filamentos dispostos no espaço que separa a casca interna da externa</li> <li>• oncosfera típica, com seus três pares de acúleos, estando envolvida por duas membranas</li> </ul>
<i>Hymenolepis nana</i>	30 a 47 $\mu\text{m}$ de diâmetro	<ul style="list-style-type: none"> <li>• forma: ovóide ou arredondada</li> <li>• cor: transparente</li> <li>• oncosfera típica, com seus três pares de acúleos, estando envolvida por duas membranas</li> <li>• possui filamentos polares</li> </ul>
<i>Taenia</i> sp	30 $\mu\text{m}$ de diâmetro	<ul style="list-style-type: none"> <li>• forma: esférica</li> <li>• possui uma casca protetora denominada embrióforo</li> <li>• dentro do embrióforo se encontra a oncosfera ou embrião hexacanto com dupla membrana e três pares de acúleos</li> </ul>

Fonte: REY (1991)

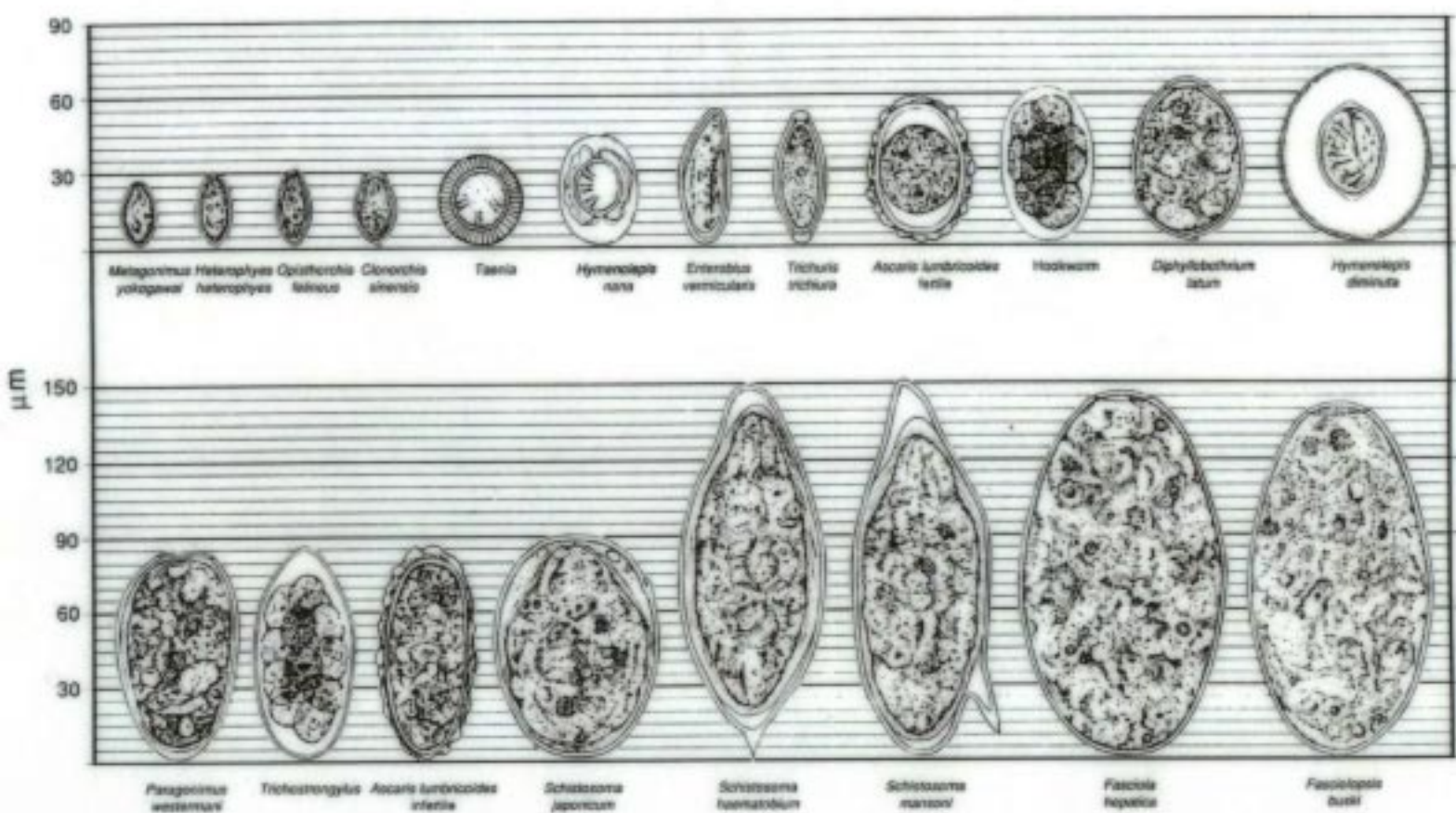


Figura 7 – Tamanhos relativos dos ovos de helmintos

Fonte: WHO (1994)

Ilustração fotográfica de ovos de helmintos

Alguns dos ovos de helmintos, usualmente encontrados em esgotos brutos e tratados, são ilustrados nas Figuras 8 a 15 (Fonte: AYRES & MARA ,1996).

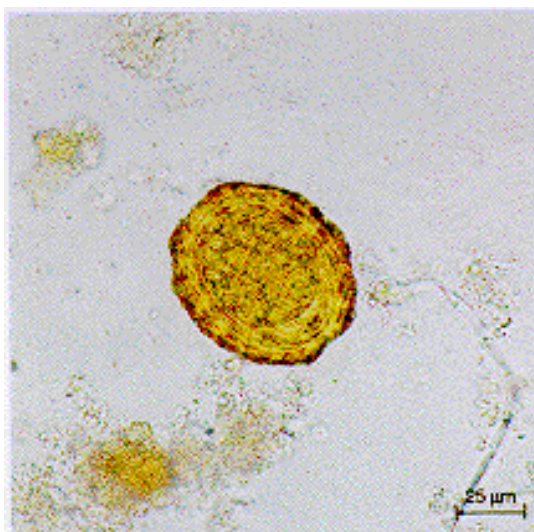


Fig. 8 – Ovo fértil de *Ascaris lumbricoides*

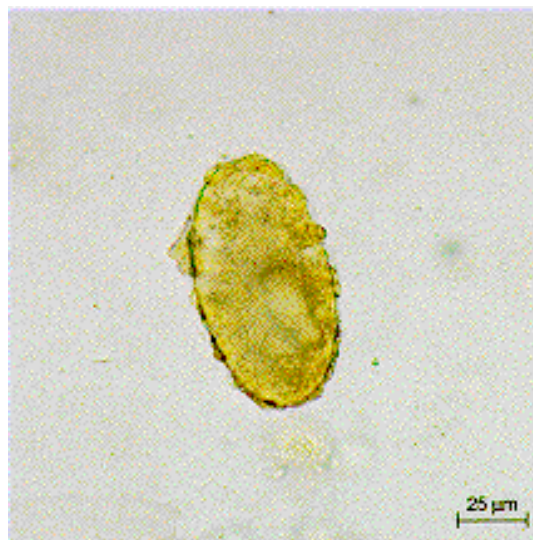


Fig. 9 – Ovo infértil de *Ascaris lumbricoides*

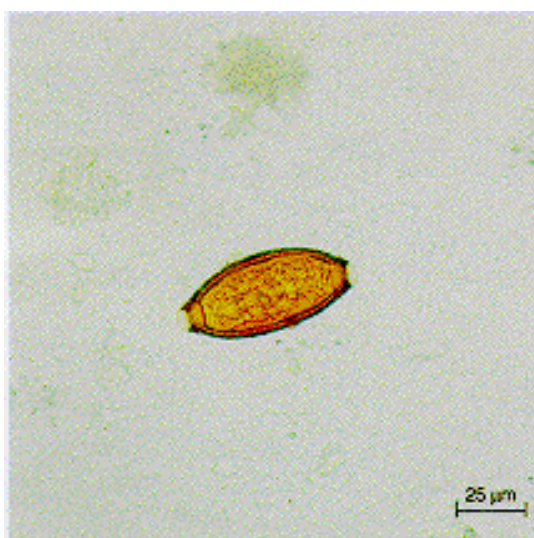


Fig. 10 – Ovo de *Trichuris trichiura*

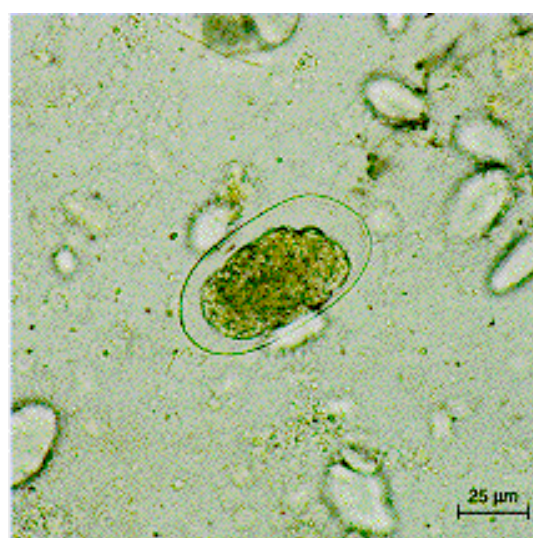


Fig. 11 – Ovo de Ancilostomídeo

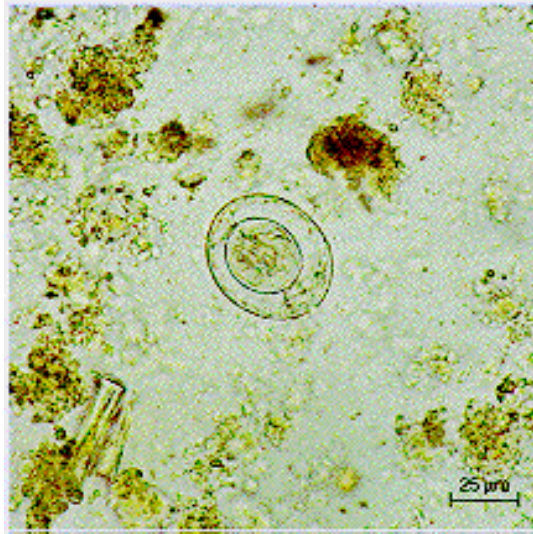


Fig. 12 – Ovo de *Hymenolepis nana*



Fig. 13– Ovo de *Hymenolepis diminuta*

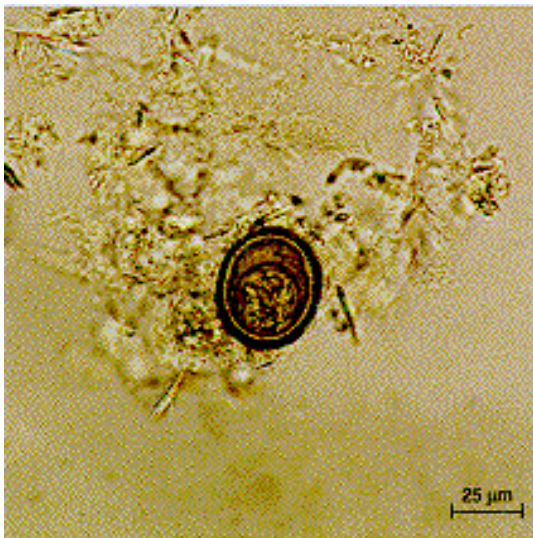


Fig. 14 – Ovo de *Taenia* sp



Fig. 15 – Ovo de *Enterobius vermicularis*

## DETERMINAÇÃO DE VIABILIDADE DE OVOS DE HELMINTOS

### **Considerações preliminares**

Em relação aos ovos de helmintos, não basta apenas avaliar o aspecto quantitativo de sua presença em esgotos. Também o aspecto qualitativo, relativo à viabilidade destes, adquire grande relevância do ponto de vista epidemiológico. A viabilidade dos ovos de helmintos é uma característica de primordial importância, já que, de acordo com o ciclo de vida de grande parte dos helmintos (notadamente os nematódeos *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e ancilostomídeos), os ovos fertilizados que são eliminados nas fezes do hospedeiro não serão infecciosos até que se tornem embriões ativos. Ou seja, não serão capazes de causar enfermidade até que se transformem, dentro do ovo, em larvas infectivas. A etapa de desenvolvimento, desde o embrião até a larva infectiva, ocorre no solo ou nos cultivos, sendo que esta capacidade infectiva pode permanecer latente durante anos se as condições ambientais forem adequadas (GALVÁN & VICTORICA, 1998).

Os ovos férteis são considerados, também, ovos potencialmente viáveis, ou seja, que possuem a capacidade para se desenvolver até a etapa infectiva. É considerada viabilidade potencial porque o desenvolvimento pode ser interrompido, por diferentes causas, e o ovo (larva) pode não chegar à etapa infectiva (ROJAS et al., 1998). Porém, a simples presença do agente infeccioso nos efluentes utilizados na irrigação, não implica, necessariamente, na imediata transmissão de doenças, caracterizando apenas um risco potencial. O risco real de um indivíduo ser infectado depende, na verdade, da combinação de uma série de fatores, dentre os quais (MARA & CAIRNCROSS, 1989):

- dose infectiva;
- patogenicidade;
- suscetibilidade e grau de imunidade do hospedeiro;
- grau de exposição humana aos focos de transmissão;
- resistência dos organismos patogênicos ao tratamento de esgotos e às condições ambientais.

Na maioria dos sistemas de tratamento de esgotos, alguns ovos são removidos, enquanto outros, mais resistentes, como os ovos de *Ascaris*, *Toxocara*, *Toxascaris* e *Trichuris*, persistem nesses sistemas. As condições do meio ambiente em torno dos ovos contribuem para o seu desenvolvimento ou morte, observando-se que, em condições adequadas, os ovos de *Ascaris* podem sobreviver por mais de 6 anos, pois estes são altamente resistentes aos agentes físicos e químicos (PAWLOWSKI, 1982). Esses ovos são muito resistentes, sendo vulneráveis quase que exclusivamente ao calor e à dessecação (OGATA, 1924 e FEACHEM et al., 1983).

Em termos de saúde pública, os ovos de helmintos não-viáveis são irrelevantes, porém, quando esses são viáveis, os riscos para a saúde pública são muito elevados. Dessa forma, a informação sobre a quantidade de ovos viáveis é considerada de grande importância, quando esses ovos são isolados do meio ambiente, seja no solo, no lodo ou em efluentes líquidos.

### **Principais técnicas disponíveis**

Existem diversas técnicas propostas para a avaliação da viabilidade de ovos de helmintos, podendo-se destacar as seguintes como as mais utilizadas:

- a técnica da incubação, descrita por HASS et al., (1962) e MEYER et al. (1978), modificada por CARRINGTON & HARMAN (1981), utilizada para quantificar e determinar a viabilidade de ovos de helmintos em amostras de lodo de esgoto;
- a técnica de critérios morfológicos, para a diferenciação entre ovos viáveis e não-viáveis (KAGEI, 1982; CEMAT, 1987; REIMERS et al., 1989);
- a técnica de flutuação, com a utilização de n-butanol para separar os ovos férteis dos inférteis (STIEN & SCHWARTZBROD, 1988);
- a técnica de inclusão ou exclusão de corantes biológicos (SHEPHERD, 1962; KAGEI, 1982; KANESHIRO & STERN, 1985; ZHOU et al., 1985; GALVÁN et al., 1998).

### Técnica de incubação

Na prática atual, para determinar se um ovo é verdadeiramente viável, é necessário observar seu desenvolvimento embrionário em condições naturais, por meio das seguintes técnicas de incubação:

- (a) incubação *in vivo*, que consiste em inocular, em animais de experimentação, os ovos de helmintos, esperar o tempo requerido para o desenvolvimento dos embriões e depois sacrificar os animais, ao término do ciclo biológico do parasito, para examinar os órgãos afetados pela presença de larvas;
- (b) incubação *in vitro*, que consiste na inoculação dos ovos em um suporte sólido ou líquido e incubação em condições favoráveis, para que os embriões se desenvolvam até a etapa infectiva.

Em ambas as técnicas, o tempo de resposta demanda, no mínimo, 21 dias (dependendo do ciclo biológico das distintas espécies de helmintos), o que significa que não são análises práticas para a determinação do risco à saúde para esgotos tratados aplicados na irrigação. Além disso, essas técnicas de incubação são utilizadas, usualmente, para a determinação de viabilidade de ovos de helmintos em amostras de fezes ou de lodo, onde estes encontram-se presentes em grandes quantidades. No caso de esgotos brutos ou tratados, a determinação de viabilidade pelo método da incubação se torna mais difícil, devido aos seguintes aspectos principais:

- necessidade de coleta e processamento de grandes volumes de amostra. Por exemplo, o método de flutuação com n-butanol (STIEN & SCHWARTZBROD, 1988) utiliza uma amostra com volume inicial de 25 L e processa, por meio de centrifugação, um volume de 2,5 L;
- dificuldade em se obter resultados confiáveis (representativos), no caso de amostras que contenham pequenas quantidades de ovos de helmintos.

Tendo em vista estes aspectos, notadamente a necessidade de coleta e processamento de grandes volumes de amostra, o Laboratório de Microbiologia do DESA/UFMG implementou uma *técnica de incubação adaptada*, que possibilita a coleta de amostras de pequeno volume (5 L) e o processamento, por centrifugação, de um volume de 1,0 L. Ressalta-se, no entanto, que essa técnica adaptada deve ser utilizada somente para análises de viabilidade em amostras que contenham elevadas quantidades de ovos de helmintos (preferencialmente acima de 100 ovos/L).

A *técnica de incubação adaptada* foi testada para amostras de efluente tratado, onde foram inoculados ovos de *Ascaris lumbricoides*, retirados de uma fêmea adulta. O efluente tratado era proveniente de um filtro biológico percolador, sendo que, após a inoculação dos ovos de *Ascaris*, o mesmo foi submetido à desinfecção em um foto-reator UV operando com diferentes tempos de detenção hidráulica. A técnica apresentou excelentes resultados, possibilitando observar as

alterações morfológicas e os diferentes estágios de desenvolvimento dos ovos de *Ascaris*, quando os mesmos foram expostos a diferentes doses de radiação ultra violeta. As Figuras 26 a 31 ilustram alguns dos estágios de desenvolvimento de ovos de *Ascaris lumbricoides*.

#### Técnica de critérios morfológicos

A técnica de avaliação de viabilidade pelos critérios morfológicos, para se distinguir entre ovos viáveis e não-viáveis de *Ascaris*, é baseada nas mudanças morfológicas que aparecem nos ovos mortos ou não-viáveis, conforme a seguir (KAGEI, 1982):

- descontinuidade e ruptura da membrana ou do revestimento da casca do ovo;
- citoplasma vacuolizado, possivelmente devido à degeneração da gordura;
- encolhimento por inteiro do ovo ou do núcleo;
- citólise.

De acordo com o Centro para Estudos Mesoamericano em Tecnologia Apropriada CEMAT (1987), os critérios básicos para a determinação da viabilidade de ovos de *Ascaris*, com base nas alterações morfológicas, são os apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Principais critérios morfológicos para determinação de ovos viáveis e não viáveis de *Ascaris*

Ovos viáveis	Ovos não-viáveis
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Estruturas intactas com coberturas contínuas e simétricas</li> <li>▪ Continuação do desenvolvimento do ovo a estágios mais evoluídos, como células duplas, mórula, gástrula e larva</li> <li>▪ Diferenciação entre cada estágio indicando uma seqüência de maturação</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Estruturas mal definidas</li> <li>▪ Vacuolização do citoplasma e condensação celular</li> <li>▪ Ovo no estágio unicelular, com citoplasma granulado e vacuolizado</li> <li>▪ Contração, ruptura e perda de continuidade da membrana</li> </ul>

Fonte: CEMAT (1987)

REIMERS et al. (1989) encontraram uma boa correlação entre a avaliação de ovos de *Ascaris* usando critérios morfológicos e o método de incubação, enquanto AYRES (1992), observou que o método de diferenciação dos ovos viáveis e não-viáveis pelos critérios morfológicos não foi tão preciso quanto o método da incubação. O método para identificação dos critérios morfológicos no microscópio é simples, mas falta um padrão objetivo e requer habilidade e experiência, além de ser difícil para principiantes. No entanto, de acordo com a experiência do CEMAT, essa técnica tem sido utilizada há vários anos para a identificação de ovos de *Ascaris* provenientes de fossas secas (CÁCERES et al., 1987).

#### Técnica da flutuação com n-butanol

O método desenvolvido por STIEN & SCHWARTZBROD (1988) utiliza o n-butanol como parte do procedimento para separar os ovos férteis dos inférteis. Os ovos férteis possuem alterações das estruturas da casca que permitem a esterificação de lipídeos pelo álcool. Dessa forma, verifica-se o aumento da densidade específica dos ovos férteis, possibilitando a sua sedimentação, enquanto os ovos inférteis permanecem em suspensão. Os trabalhos desenvolvidos em laboratório demonstraram uma elevada correlação entre ovos viáveis e férteis,

demonstrando a aplicabilidade dessa técnica para a quantificação de ovos viáveis de *Ascaris*. No entanto, não se sabe se o mesmo procedimento se aplica a outras espécies de ovos de helmintos, além do que, o reagente utilizado para flutuação dos ovos (*Janeckso-urbanyi*, densidade específica 1,42), apresentou-se muito corrosivo e caro para ser utilizado com rotina. O n-butanol não pode ser utilizado em amostras de lodo ou de composto, porque esse é absorvido pelo material sólido e torna impossível a verificação final do material, mesmo se a amostra for completamente lavada.

#### Técnica de inclusão ou exclusão de corantes biológicos

Vários autores relatam o uso de métodos com corantes biológicos para a determinação da viabilidade, embora, no passado, esses não tenham sido considerados suficientemente confiáveis para serem utilizados (WHO, 1967; HINDIYEH, 1995 e CÁCERES et al., 1987). A determinação da viabilidade com o uso de corantes foi realizada inicialmente por OGATA (1923) e BROWN (1927b), e ainda é utilizada em pequenos laboratórios, apesar de suas limitações. Desde o início da utilização desses testes, até os dias de hoje, diversos corantes vêm sendo utilizados, podendo-se destacar os seguintes:

- solução de Sudam III em 75% de álcool (OGATA, 1928 e KAGEI, 1982);
- solução sulfato de azul nilo (MEYER et al., 1978);
- azul de metileno eosina borax (ZHOU et al., 1985 e GALVÁN et al., 1998);
- solução de azul de metileno ou azul de Evans a 0,06% (CEMAT, 1984);
- Safranina O, azul de Tripán e Eosina Y (GALVÁN et al., 1998).

Os estudos mais recentes de utilização da técnica de inclusão ou exclusão de corantes biológicos foram realizados por GALVÁN et al. (1998), objetivando o desenvolvimento de metodologias simples, rápidas e confiáveis para a determinação da viabilidade de ovos de helmintos em esgotos. Nesse sentido, desenvolveram um método rápido para determinar a viabilidade de ovos de helmintos, utilizando os corantes Azul Tripán, Eosina Y e Safranina O, em uma concentração de 0,1% em solução aquosa.

Este método é baseado no uso de corantes biológicos para detectar as trocas de permeabilidade da membrana vitelina dos ovos, que está relacionada com o metabolismo embrionário e a viabilidade, sendo que um ovo viável é impermeável a certos corantes e, portanto, não se cora, enquanto um ovo que tenha perdido sua viabilidade é permeável e se cora.

Para a realização do método da coloração, este foi acoplado a dois procedimentos rápidos, eficientes e baratos, desenvolvidos pelo Instituto de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Nacional Autônoma do México (UNAM), para a quantificação de ovos de helmintos em esgotos. Os procedimentos envolvem a concentração da amostra por centrifugação (esgoto bruto) e filtração em membrana (esgoto tratado). Para tornar a amostra mais clara, é utilizada solução salina (NaCl 0,85%) ou solução de detergente (0,01%). Para a flutuação dos ovos de helmintos é utilizado sulfato de zinco (densidade 1,20) ou sulfato de magnésio (densidade 1,30).

O método é relativamente simples, mas recomenda-se que seja desenvolvido por técnicos com conhecimentos práticos e experiência na identificação de ovos de helmintos. O mesmo demanda um tempo de 2 a 6 horas para se obter os resultados, além de apresentar baixo custo, se comparado com outros métodos. Isto significa que o procedimento da coloração apresenta vantagens bastante relevantes. No entanto, algumas limitações do método são apresentadas a seguir (ROJAS et al., 1998):

- a detecção da viabilidade ocorre apenas no momento do teste. Ou seja, não possibilita o monitoramento do embrião, sendo por isso considerado um método que avalia a “viabilidade potencial”;
- o método é eficiente para determinar a viabilidade potencial de ovos de *Ascaris* e de *Trichuris*, havendo, porém, a necessidade de estudos mais aprofundados para possibilitar a avaliação da eficiência da técnica da coloração em outras espécies de helmintos.

### ***Descrição da técnica de incubação adaptada***

A técnica de incubação adaptada foi desenvolvida com o intuito de possibilitar a avaliação de viabilidade de ovos de helmintos em esgotos brutos e tratados, utilizando-se pequenos volumes de amostras (5 L), desde que estas apresentem grandes quantidades de ovos de helmintos.

As amostras de esgotos passam pelas seguintes etapas: sedimentação, centrifugações sucessivas com solução salina (NaCl 0,85%), flutuação com solução de sulfato de zinco (densidade 1,18), filtração em membrana de 47 mm e 0,45 µm de porosidade e incubação a 28° C durante 28 dias. Após 28 dias de incubação, a contagem é realizada utilizando-se uma câmara de Sedgewick Rafter, com observação no microscópio dos ovos viáveis (com larva) e não viáveis.

### Equipamentos, materiais e reagentes

- Centrífuga para operar a 1.000 g
- Equipamento de filtração para membrana de 47 mm de diâmetro (Millipore ou equivalente)
- Microscópio com objetivas de 10x, 40x e 100x, com bom poder de resolução
- Equipamento tipo Vortex
- Sistema de vácuo
- Membranas de éster de celulose de 47 mm de diâmetro e porosidade de 0,45 µm (Millipore ou equivalente)
- Estufa para operar a 28° C
- Frascos para centrífuga de 250 mL de capacidade
- Tubos para centrífuga de 50 mL de capacidade
- Placa de Petri
- Garrações de plástico com tampa de rosca e capacidade de 5 litros
- Câmara de Sedgewick Rafter
- Solução salina isotônica (NaCl a 0,85% em água destilada)
- Solução aquosa de sulfato de zinco ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) a 33,1% (p/v)
- Solução Triton X-100 ou Tween 80
- Ácido sulfúrico 0,1 N

### Preparação de soluções

São os seguintes os principais procedimentos para a preparação das soluções necessárias ao desenvolvimento das análises de viabilidade em esgotos brutos:

- Solução salina isotônica (NaCl a 0,85%): pesar 0,85 g de NaCl e diluir em água destilada até completar o volume de 100 mL de solução.
- Solução aquosa de sulfato de zinco ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) a 33,1% (p/v): pesar 33,1 g de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e dissolver em água destilada até completar o volume de 100 mL de solução.
- Solução de ácido sulfúrico 0,1 N: adicionar 2,8 mL de ácido sulfúrico concentrado em 1.000 mL de água destilada.

### Coleta de amostras

Coletar 5 litros da amostra e proceder à análise preferencialmente logo após a coleta ou, eventualmente, em um prazo máximo de 48 horas. Caso não seja possível a análise neste período (48 horas), as amostras deverão ficar armazenadas, sob refrigeração, por um período máximo de 15 dias.

### Procedimento

- a) Coletar uma amostra de esgoto de volume conhecido ( $V_i = 5$  litros).
- b) Deixar a amostra sedimentar em um balde por um período de 24 horas. Remover o sobrenadante usando uma bomba de sucção ou um sifão, garantindo que fique no recipiente um volume de aproximadamente 1L. Inclinar o recipiente, caso necessário, tendo o cuidado para não ressuspender o sedimento.
- c) Transferir cuidadosamente o sedimento para os tubos da centrífuga, enxaguando o balde com solução Triton X-100 ou Tween 80.
- d) Distribuir a amostra em frascos de centrífuga e proceder à centrifugação a 1.000 g durante 5 minutos.
- e) Descartar o sobrenadante, ressuspender os sedimentos em solução salina (NaCl a 0,85%).
- f) Agitar com o equipamento tipo Vortex.
- g) Centrifugar novamente a 1.000 g durante 5 minutos e descartar o sobrenadante; repetir o procedimento até obter um sobrenadante claro.
- h) Após descartar o sobrenadante da última etapa de centrifugação, transferir todo o sedimento restante para um tubo de centrífuga de 50 mL de capacidade. Utilizar solução de sulfato de zinco para auxiliar na lavagem do tubo e transferência do sedimento.
- i) Adicionar mais solução de sulfato de zinco, até completar o volume de 25 mL, e agitar com Vortex. Completar novamente com sulfato de zinco até obter o volume final de 50 mL e agitar novamente com Vortex. Centrifugar a 1.000 g durante três minutos.
- j) Transferir o sobrenadante para o recipiente de filtração a vácuo e proceder à filtração em membrana de 47 mm e porosidade de 0,45  $\mu\text{m}$ .
- k) Ao término da filtração, retirar a membrana e raspar o material retido, com o auxílio de uma lamínula, para uma placa de Petri contendo 10 mL de ácido sulfúrico a 0,1 N.
- l) Envolver a placa com papel alumínio e colocá-la em uma incubadora a 28 °C, onde deverá permanecer durante 28 dias. É necessário que se proceda uma aeração da placa em dias alternados. Quando da aeração, verificar se ocorreu evaporação parcial do volume do conteúdo da placa de Petri e completar com ácido sulfúrico, caso necessário.
- m) Após 28 dias, retirar uma alíquota bem homogeneizada da amostra final, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, e transferir para a câmara de Sedgewick Rafter. Examinar no microscópio, em objetivas de 10x ou 40x, e contar os ovos viáveis (com larva) e não viáveis. Para uma melhor representatividade dos resultados, deve-se fazer a leitura de mais de uma câmara, preferencialmente três, e calcular a média aritmética das contagens obtidas.

*Nota: antes de retirar as alíquotas do conteúdo da placa, para contagem na câmara de Sedgewick Rafter, medir o volume total do conteúdo da placa ( $V_f$ ).*

### Expressão dos resultados

O número final de ovos viáveis e não viáveis da amostra de esgotos pode ser calculado por meio da seguinte equação:

$$N = \frac{(N_c \times V_f)}{(V_i \times V_v)}$$

na qual:

N: número de ovos (ovos/litro)

N<sub>c</sub>: número médio de ovos contados nas câmaras de Sedgewick Rafter (nº de ovos)

V<sub>f</sub>: volume do conteúdo final da placa de Petri (mL)

V<sub>c</sub>: volume da câmara de Sedgewick Rafter (1 mL)

V<sub>i</sub>: volume original da amostra (ver procedimento "a")

### Ilustração fotográfica dos procedimentos

Alguns dos procedimentos para preparação da amostra e análise de viabilidade de ovos de helmintos são ilustrados nas Figuras 16 a 25.



Fig. 16 - Remoção do sobrenadante após o período de sedimentação (procedimentos "a" e "b")



Fig. 17 - Concentração da amostra por centrifugação (procedimentos "d" e "g")



Fig. 18 - Adição de Cloreto de Sódio para clareamento da amostra (procedimento "e")

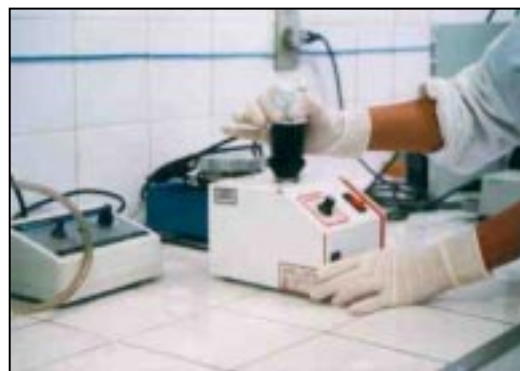


Fig. 19 - Homogeneização da amostra com Vortex (procedimento "f")



Fig. 20 - Filtração do sobrenadante (procedimento "j")



Fig. 21 - Membrana de 47 mm e 0,45  $\mu$  de porosidade contendo os ovos



Fig. 22 – Raspagem do material retido e transferência para a placa de Petri (procedimento “k”)



Fig. 23 – Placas envolvidas em papel alumínio e incubadas a 28 °C, durante 28 dias (procedimento “l”)



Fig. 24 – Transferência do material da placa de Petri para câmara de Sedgewick Rafter (procedimento “m”)



Fig. 25 – Observação dos ovos no microscópio, com objetivas de 10x e 40x

Ilustração fotográfica do desenvolvimento de ovos de *Ascaris lumbricoides*

Alguns estágios de desenvolvimento de ovos de *A. lumbricoides* são ilustrados nas Fig. 26 a 31.



Fig. 26 – Estágio de uma célula<sup>(a)</sup>



Fig. 27 – Estágio de mórula precoce<sup>(b)</sup>

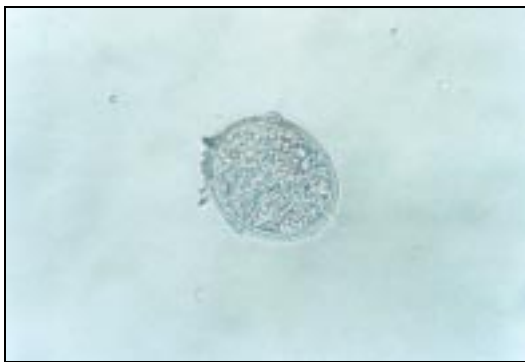


Fig. 28 – Estágio de mórula tardia<sup>(c)</sup>



Fig. 29 – Estágio de gástrula<sup>(d)</sup>



Fig. 30 – Estágio de larva<sup>(e)</sup>



Fig. 31 – Eclosão da larva

- (a) Estágio de uma célula: esse estágio é facilmente reconhecido por uma única célula grande, ocupando a maior parte do ovo.
- (b) Estágio de mórula precoce: o embrião, dentro do ovo, se divide em 2 a 16 células.
- (c) Estágio de mórula tardia: ocorre uma rápida clivagem, onde os blastômeros não são claramente definidos e o embrião é denominado blástula, uma esfera compacta de pequenas células. A blástula marca o término da proliferação e o início da morfogênese.
- (d) Estágio de gástrula: mórula encurvada ao estágio vermiforme precoce, onde o embrião alonga-se e curva-se, ventralmente, assumindo a forma de um grão de feijão, com a extremidade anterior ligeiramente maior e normalmente mais escura que a extremidade posterior.
- (e) Estágio de larva: a partir do estágio inicial vermiforme, até o de larva completamente formada, a larva começa a alongar-se e mover-se. A larva completamente formada é mais estreita e mais transparente que a larva imatura e pode mover-se livremente no interior do ovo. As extremidades anterior e posterior são distintas. Nesse estágio, a larva é completamente diferenciada morfologicamente, permanecendo nesse estágio até receber estímulo adequado para eclodir.

### ***Descrição da técnica de inclusão ou exclusão de corantes biológicos***

O método da coloração fundamenta-se nas trocas de permeabilidade da camada externa dos ovos, provocadas pelas modificações das estruturas químicas dos componentes que envolvem o ovo, quando este perde sua viabilidade. Os ovos que são viáveis não permitem a entrada do corante, permanecendo, portanto, com a sua cor natural (castanho-amarelada). Já os ovos não-viáveis permitem a entrada do corante e, portanto, se coram de acordo com o corante utilizado (MEYER et al., 1978 e ZHOU et al., 1985, citados por GALVÁN et al., 1998).

### **Aplicação para esgotos brutos (técnica da concentração por centrifugação)**

Esta técnica é aplicada a esgotos brutos que contenham sólidos suspensos ou turbidez, com possíveis ocorrências de grandes quantidades de ovos de helmintos. A técnica também é aplicada a análises de sedimentos.

A técnica consiste em centrifugações sucessivas da amostra com solução salina isotônica, permitindo, assim, o clareamento do sobrenadante. Após o descarte do sobrenadante, os ovos que se encontram no sedimento são recuperados, por flutuação, com solução de sulfato de zinco a 33,1%, e o sobrenadante é filtrado em membrana de 25 mm e 8 µm de porosidade.

A contagem é realizada por observação microscópica da lâmina contendo a membrana tingida com o corante biológico.

### **Equipamentos, materiais e reagentes**

- Centrífuga para operar a 1.000 g
- Equipamento de filtração para membrana de 25 mm de diâmetro (Millipore ou equivalente)
- Microscópio com objetivas de 10x, 40x e 100x, com bom poder de resolução
- Equipamento tipo Vortex
- Membranas de éster de celulose de 25 mm de diâmetro e porosidade de 8 µm (Millipore ou equivalente)
- Frascos para centrífuga de 250 mL de capacidade
- Tubos para centrífuga de 50 mL de capacidade
- Garrações de plástico com tampa de rosca e capacidade de 5 litros
- Lâminas e lamínulas
- Solução salina isotônica (NaCl a 0,85% em água destilada)
- Solução aquosa de 0,1% (p/v) de um dos seguintes corantes biológicos: Azul de Tripán, Safranina O, Eosina Y
- Solução aquosa de sulfato de zinco ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) a 33,1% (p/v)
- Glicerol

### **Preparação de soluções**

São os seguintes os principais procedimentos para a preparação das soluções necessárias ao desenvolvimento das análises de viabilidade em esgotos brutos:

- Solução salina isotônica (NaCl a 0,85%): pesar 0,85 g de NaCl e diluir em água destilada até completar o volume de 100 mL de solução.
- Solução aquosa de 0,1% (p/v) de safranina O: pesar 0,1 g do corante safranina e dissolver em água destilada até completar o volume de 100 mL de solução.
- Solução aquosa de sulfato de zinco ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) a 33,1% (p/v): pesar 33,1 g de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e dissolver em água destilada até completar o volume de 100 mL de solução.

### Coleta de amostras

Coletar 5 litros da amostra no ponto em que se encontra mais homogênea (representativa). Caso o líquido amostrado esteja parado ou com pouco movimento, coletar também o sedimento e processá-lo pelo mesmo método.

Tampar os recipientes e transportá-los ao laboratório, se possível preservados com gelo. As amostras deverão ser analisadas preferencialmente logo após a coleta ou, eventualmente, em um prazo máximo de 48 horas. Caso não seja possível a análise neste período (48 horas), as amostras deverão ficar armazenadas sob refrigeração por um período máximo de 15 dias.

### Procedimento

Para amostras contendo grandes quantidades de detritos/sólidos grosseiros, homogeneizar a mesma com um bastão de vidro e filtrar através de uma gaze. Lavar perfeitamente os sólidos que ficarem aderidos à gaze, e processar 1 litro da amostra de acordo com os seguintes passos:

- a) Distribuir a amostra em frascos de centrífuga e proceder a centrifugação a 1.000 g durante 5 minutos; descartar o sobrenadante, ressuspender os sedimentos em solução salina isotônica e agitar com o equipamento tipo Vortex. Transferir o sedimento para um ou dois tubos de centrífuga. Centrifugar novamente a 1.000 g durante 5 minutos e descartar o sobrenadante; repetir o procedimento até obter um sobrenadante claro (geralmente, são necessárias de duas a três centrifugações).
- b) Após descartar o sobrenadante da última etapa de centrifugação, transferir todo o sedimento restante para um tubo de centrífuga de 50 mL de capacidade. Utilizar solução de sulfato de zinco para auxiliar na lavagem do tubo e transferência do sedimento.
- c) Adicionar mais solução de sulfato de zinco até completar o volume de 25 mL e agitar com Vortex. Completar novamente com sulfato de zinco até obter o volume final de 50 mL e agitar novamente com Vortex. Centrifugar a 1.000 g durante três minutos.
- d) Transferir o sobrenadante para o recipiente de filtração a vácuo e proceder à filtração em membrana de 25 mm e porosidade de 8 µm.

*Nota: Tendo em vista a eventual dificuldade de filtração (devido à porosidade, ao tamanho da membrana e ao teor de sólidos presentes na amostra, pode-se tornar necessária a filtração de alíquotas menores, utilizando-se várias membranas).*

- e) Ao término da filtração, adicionar 5 mL do corante selecionado e filtrar lentamente. Retirar a membrana e colocá-la sobre um papel filtro para perder o excesso de umidade (no máximo por dois minutos).
- f) Colocar uma gota de glicerol na lâmina e espalhar sobre uma área correspondente ao tamanho da membrana (aproximadamente 25 mm de diâmetro). Colocar a membrana, com cuidado, sobre o glicerol, para que não apareçam bolhas de ar. Adicionar outra gota de glicerol sobre a membrana, colocar a lamínula e esperar até que a visualização dos ovos se torne possível. Caso se deseje acelerar este processo, deve-se colocar a lâmina na incubadora a 37 °C.
- g) Observar no microscópio, usando objetivas de 10x e 40x de aumento. Se desejar um maior aumento, observar com objetiva de 100x, aplicando uma gota de óleo de imersão.

### Expressão dos resultados

Para cada lâmina, contar o número de ovos corados (*ovos não-viáveis*) e não corados (*ovos viáveis*) e expressar o percentual de ovos viáveis, por litro de amostra.

Lâmina <sup>(a)</sup>	Número de ovos (Nº/L)			Percentual de ovos não corados (viáveis)
	Corados (1)	Não corados (2)	Total (3)	(2)/(3)
1				-
2				-
3				-
Total				
Média				

#### Notas:

- O número de lâminas pode ser bastante variável, dependendo das características de filtrabilidade do esgoto.*
- Os resultados obtidos por meio da técnica de coloração devem ser usados apenas para expressar a fração de ovos viáveis e não-viáveis. Para a quantificação de ovos de helmintos, deve-se utilizar o método de Bailenger modificado.*
- Para se saber o número de ovos viáveis na amostra processada, deve-se aplicar o percentual de ovos viáveis (obtido pela técnica da coloração) sobre o número total de ovos da amostra (obtido pelo método de Bailenger modificado).*

### Ilustração fotográfica dos procedimentos

Alguns dos procedimentos para preparação das amostras, visando a análise/quantificação de ovos de helmintos viáveis, em esgoto bruto, são ilustrados nas Figuras 32 a 37.



Fig. 32 – Concentração da amostra por centrifugação (procedimento "a")



Fig. 33 – Homogeneização da amostra com Vortex (procedimentos "a" e "c")



Fig. 34 – Nova centrifugação (procedimentos "a" e "c")



Fig. 35 – Filtração do sobrenadante em membrana de 25 mm e 8 µm (procedimento "d")



Fig. 36 – Adição de 5 mL do corante safranina (procedimento "e")



Fig. 37 – Lâmina contendo a membrana para visualização no microscópio (procedimento "f")

### **Aplicação para esgotos tratados (técnica da concentração por filtração)**

Esta técnica foi desenvolvida e validada originalmente para ser aplicada em águas naturais e de abastecimento, entretanto foi comprovado que pode ser aplicada também para esgotos tratados, que contenham pouca turbidez e sólidos suspensos, e baixas concentrações de ovos de helmintos.

A técnica é baseada na concentração da amostra por filtração a vácuo, através de uma membrana de éster de celulose de 47 mm, com porosidade de 8 µm. Os ovos aderidos à membrana são recuperados, por flutuação, com solução de sulfato de zinco a 33,1%, e a contagem é realizada por observação microscópica direta da membrana tingida com o corante biológico.

#### Equipamentos, materiais e reagentes

- Equipamento de filtração para membrana de 47 mm de diâmetro
- Equipamento de filtração para membrana de 25 mm de diâmetro
- Sistema de vácuo (para operar até 40 cm Hg)
- Centrífuga para operar a 1.000 g
- Microscópio com objetivas de 10x, 40x e 100x, com um bom poder de resolução
- Membranas de éster de celulose de 47 mm de diâmetro e 8 µm de porosidade (Millipore ou equivalente)
- Membranas de éster de celulose de 25 mm de diâmetro e 8 µm de porosidade (Millipore ou equivalente)
- Tubos para centrífuga de 50 mL de capacidade
- Garrações de plástico com tampa de rosca e capacidade de 5 e 10 litros
- Lâminas e lamínulas
- Solução salina isotônica (NaCl a 0,85% em água destilada)
- Solução aquosa a 0,1% (p/v) de um dos seguintes corantes biológicos: Azul de Tripán, Safranina O, Eosina Y
- Solução aquosa de sulfato de zinco ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) a 33,1% (p/v)
- Glicerol

#### Preparação de soluções

São os seguintes os principais procedimentos para a preparação das soluções necessárias ao desenvolvimento das análises de viabilidade em efluentes tratados:

- Solução salina isotônica (NaCl a 0,85%): pesar 0,85 g de NaCl e diluir em água destilada até completar o volume de 100 mL de solução.
- Solução aquosa de 0,1% (p/v) de safranina O: pesar 0,1 g do corante safranina e dissolver em água destilada até completar o volume de 100 mL de solução.
- Solução aquosa de sulfato de zinco ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) a 33,1% (p/v): pesar 33,1 g de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e dissolver em água destilada até completar o volume de 100 mL de solução.

#### Coleta de amostras

Para fontes de abastecimento público, poços, mananciais e águas com baixos teores de turbidez e sólidos suspensos, coletar uma amostra com volume de 10 litros. Para esgotos tratados, coletar uma amostra com volume de 5 litros.

Tampar os recipientes e transportá-los ao laboratório, se possível preservados com gelo. As amostras deverão ser analisadas preferencialmente logo após a coleta ou, eventualmente, em um prazo máximo de 48 horas. Caso não seja possível a análise neste período (48 horas), as amostras deverão ficar armazenadas sob refrigeração por um período máximo de 15 dias.

### Procedimento

Para amostras contendo grandes quantidades de detritos/sólidos grosseiros, misturar a mesma com um bastão de vidro e filtrar através de uma gaze. Lavar perfeitamente os sólidos que ficarem aderidos à gaze e processar 1 litro da amostra de acordo com os seguintes passos:

*Nota: Para os casos de amostras que contenham teores elevados de sólidos, pode-se tornar necessário centrifugar a mesma algumas vezes, com solução salina e com descartes sucessivos do sobrenadante. Nesses casos, deve-se eliminar os procedimentos (a) e (b) e iniciar pelo (c).*

- a) Homogeneizar a amostra e filtrar 1 litro em membrana de 47 mm de diâmetro e porosidade de 8  $\mu\text{m}$ , aplicando um vácuo máximo de 40 cm de Hg. Ao término da filtração, lavar as paredes dos recipientes de filtração com solução salina isotônica e filtrar essa água de lavagem na mesma membrana.
- b) Após a filtração, retirar a membrana e colocá-la sobre a parede interna de um tubo de centrífuga e raspar com uma espátula; lavar a membrana e a espátula com solução de sulfato de zinco.
- c) Adicionar sulfato de zinco gradativamente (agitando perfeitamente em cada adição) até completar o volume de 50 mL. Centrifugar a 1.000 g durante três minutos.
- d) Transferir o sobrenadante para o recipiente de filtração, com uma membrana de 25 mm de diâmetro e 8  $\mu\text{m}$  de porosidade. Filtrar aplicando pouca pressão.
- e) Ao término da filtração, adicionar 5 mL do corante selecionado e filtrar lentamente. Retirar a membrana e colocá-la sobre um papel filtro para perder o excesso de umidade (no máximo por dois minutos).
- h) Colocar uma gota de glicerol na lâmina e espalhar sobre uma área correspondente ao tamanho da membrana (aproximadamente 25 mm de diâmetro). Colocar a membrana, com cuidado, sobre o glicerol, para que não apareçam bolhas de ar. Adicionar outra gota de glicerol sobre a membrana, colocar a lamínula e esperar até que a visualização dos ovos se torne possível. Caso se deseje acelerar este processo, deve-se colocar a lâmina na incubadora a 37 °C.
- i) Observar no microscópio, usando objetivas de 10x e 40x de aumento. Se desejar um maior aumento, observar com objetiva de 100x, aplicando uma gota de óleo de imersão.

### Expressão dos resultados

Para cada lâmina, contar o número de ovos corados (*ovos não-viáveis*) e não corados (*ovos viáveis*) e expressar o percentual de ovos viáveis, por litro de amostra.

Lâmina <sup>(a)</sup>	Número de ovos (Nº/L)			Percentual de ovos não corados (viáveis)
	Corados (1)	Não corados (2)	Total (3)	(2)/(3)
1				-
2				-
3				-
Total				
Média				

Notas:

- a) O número de lâminas pode ser bastante variável, dependendo das características de filtrabilidade do esgoto.

- 
- b) *Os resultados obtidos por meio da técnica de coloração devem ser usados apenas para expressar a fração de ovos viáveis e não-viáveis. Para a quantificação de ovos de helmintos, deve-se utilizar o método de Bailenger modificado.*
  - c) *Para se saber o número de ovos viáveis na amostra processada, deve-se aplicar o percentual de ovos viáveis (obtido pela técnica da coloração) sobre o número total de ovos da amostra (obtido pelo método de Bailenger modificado).*

### Ilustração fotográfica dos procedimentos

Alguns dos procedimentos para preparação das amostras, visando a análise/quantificação de ovos de helmintos viáveis, em esgoto tratado, são ilustrados nas Figuras 38 a 43.



Fig. 38 – Filtração de 1 L da amostra em membrana de 47 mm e 8 µm. (procedimento “a”)



Fig. 39 – Membrana contendo material filtrado (ovos)



Fig. 40 – Transferência do material (ovos) para o tubo da centrífuga (procedimento “b”)



Fig. 41 – Filtração do sobrenadante em membrana de 25 mm e 8 µm (procedimento “d”)



Fig. 42 – Adição de 5 mL do corante safranina, seguida de filtração (procedimento “e”)

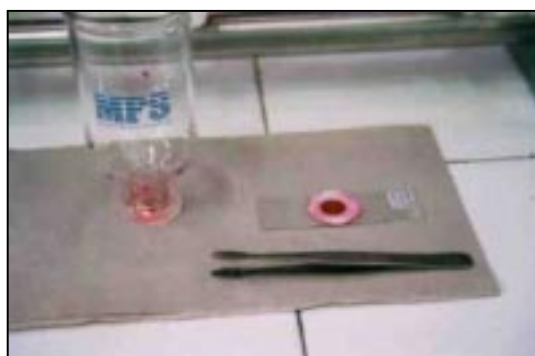


Fig. 43 – Lâmina contendo a membrana para visualização no microscópio (procedimento “f”).

**Ilustração fotográfica de ovos de helmintos pela técnica da coloração**

Ilustrações de ovos viáveis e não-viáveis, identificados de acordo com a técnica da coloração, são apresentados nas Figuras 44 a 47 (Fonte: ROJAS et al., 1998).

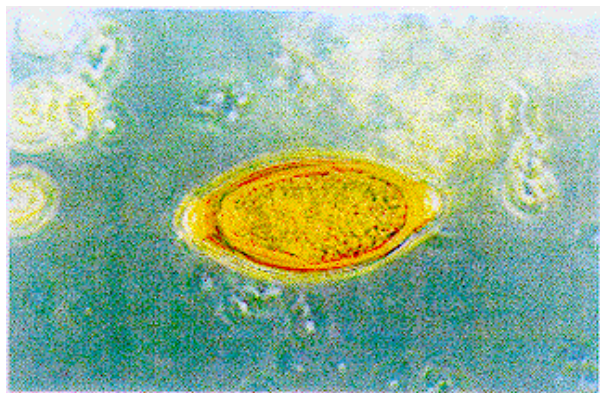


Fig. 44 – Ovo viável de *Trichuris trichiura* corado com Azul de Tripán



Fig. 45 – Ovo não viável de *Trichuris trichiura* corado com Azul de Tripán

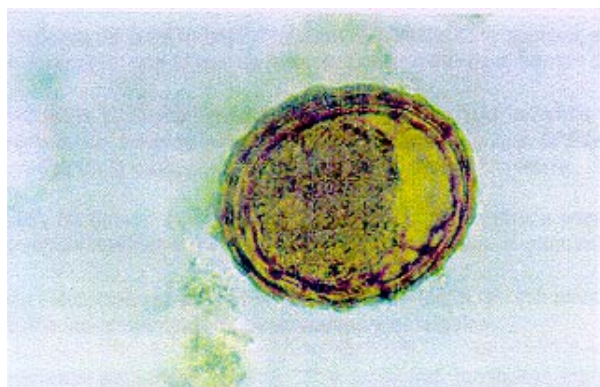


Fig. 46 – Ovo viável de *Ascaris lumbricoides* corado com Azul de Tripán

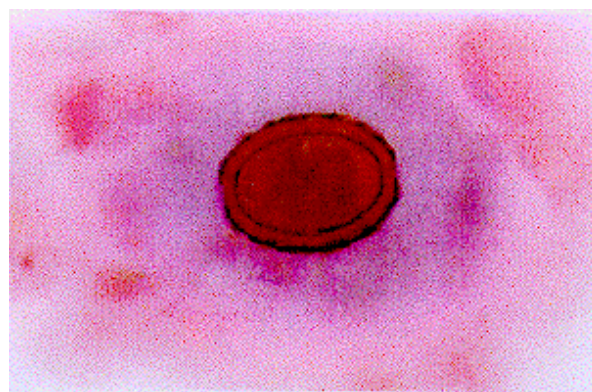


Fig. 47 – Ovo não-viável de *Ascaris lumbricoides* corado com Eosina Y

## CONCLUSÕES

### **Metodologia de quantificação e identificação de ovos de helmintos**

A partir de estudos e pesquisas desenvolvidos no âmbito do PROSAB, onde foi utilizado o método de *Bailenger modificado* para quantificação e identificação de ovos de helmintos em esgotos brutos e tratados, foi possível concluir:

- O método de *Bailenger modificado* mostrou-se adequado para a quantificação e identificação de ovos de helmintos em esgotos brutos e tratados. O método é simples, utiliza equipamentos e material de baixo custo e demanda poucos reagentes químicos. O tempo requerido para a leitura final é relativamente rápido, dependendo das características do esgoto.
- Foi possível a recuperação de várias espécies de ovos de helmintos usualmente encontrados em esgotos brutos e tratados, a exemplo de ovos de *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, ancilostomídeos, *Hymenolepis nana*, *Hymenolepis diminuta*, *Enterobius vermicularis*.
- De acordo com a experiência na utilização do método, e com o número muito grande de análises processadas no decorrer desse trabalho, foi adotado um tempo de 24 horas para a etapa de sedimentação de amostras brutas e tratadas (ao invés do tempo de 1 a 2 h, usualmente empregado), o que resultou em uma melhora sensível da recuperação de ovos. KÖNIG (2000) investigando o tempo de sedimentação como fator determinante da concentração final de ovos de helmintos (*Ascaris*) em esgoto bruto, observou claramente a influência do tempo de sedimentação sobre a concentração final de ovos de helmintos. Esses resultados preliminares sugerem a introdução desta modificação (incremento no tempo de sedimentação) no protocolo de rotina do método, visando a obtenção de maiores taxas de recuperação.
- Em algumas amostras de efluentes de reatores anaeróbios, o sobrenadante resultante do processamento da amostra apresentou-se muito escuro, dificultando a leitura na câmara de McMaster. A cor escura pareceu estar mais relacionada com a rotina operacional do reator anaeróbio e com a qualidade do efluente do mesmo, do que com o método utilizado.

### **Metodologias de viabilidade de ovos de helmintos**

A partir de estudos e pesquisas desenvolvidos no âmbito do PROSAB, onde foram testadas as técnicas de *incubação adaptada* e de *corantes biológicos* para a avaliação de viabilidade de ovos de helmintos em esgotos brutos e tratados, foi possível concluir:

- A técnica de *incubação adaptada* se mostrou muito favorável para a avaliação de viabilidade de ovos de *Ascaris lumbricoides*, em esgotos com elevadas concentrações de ovos de helmintos e baixos teores de sólidos suspensos. A técnica possibilitou a identificação de todos os estágios de desenvolvimento de ovos de *Ascaris lumbricoides*.
- O método da coloração possibilitou a observação tanto de ovos viáveis (não corados), quanto de ovos não viáveis (corados). No entanto, algumas incertezas relativamente à cor dos ovos expostos ao corante indicam que o método se apresenta, em alguns momentos, muito subjetivo, onde realmente não há um padrão de cor tanto para os ovos viáveis e quanto dos não viáveis.
- As técnicas de concentração por filtração e por centrifugação podem ser aplicadas para vários tipos de amostras (esgotos brutos e tratados). A técnica de concentração por centrifugação apresenta menores custos iniciais de equipamento e pode ser aplicada para efluentes tratados.

Porém, um volume maior de amostra deve ser processado para se obter um volume adequado de sedimento para a recuperação dos ovos (por exemplo 5 L).

- Para amostras com turbidez elevada, a técnica de concentração por filtração não é a mais adequada, devido ao entupimento dos filtros e à necessidade de constantes trocas dos mesmos, conferindo, assim, um aumento do tempo e dos custos para as análises. Essa é uma forte desvantagem da técnica, mas a eficiência de recuperação é bem maior do que a técnica de concentração por centrifugação.
- Foram observadas interferências com a utilização da técnica da coloração para o efluente de reatores anaeróbios, possivelmente, devido à presença de ácidos orgânicos.
- As amostras com elevados teores de sólidos apresentaram, geralmente, uma cor mais intensa, após a filtração com o corante, interferindo, por vezes, na observação. Nesse sentido, o uso de um menor volume de corante (ex. 1 mL) pode minimizar esse problema.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FINEP, ao CNPq, aos bolsistas Eduardo Sales Machado Borges, Reginaldo Vieira de Souza, Roseli Bernardo Bittencourt, Sérgio Ferreira Ribeiro e Valéria Martins Godinho, e ao pesquisador Cristiano Lara Massara, pelo apoio na realização desse trabalho.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AYRES, R. (1989). Enumeration of parasitic helminths in raw and treated wastewater. *A brief practical guide*. Department of Civil Engineering. University of Leeds.
- AYRES, R., STOTT, R., LEE, D. L., MARA, D. D. & SILVA, S. A (1991). Comparison of techniques for the enumeration of human parasitic helminth eggs in treated wastewater. *Environmental Technology*. 12, p. 617-623
- AYRES, R. (1992). On the removal of nematode eggs in waste stabilisation ponds and consequent potential health risks from effluent reuse. *PhD Theses*, Department of Civil Engineering and Pure Applied Biology, University of Leeds.
- AYRES, R & MARA, D. (1996). Analysis of wastewater for use in agriculture. *A laboratory manual of parasitological and bacteriological techniques*. WHO, Geneva.
- BAILINGER, J. (1979). Mechanisms of parasitological concentration in coprology and their practical consequences. *Journal of American medical technology*, 41, p. 65 – 71
- BOUHOUM, K. & SCHWARTZDROD, J. (1989). Quantification of helminth eggs in wastewater. *Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin*, 188, p. 322 – 330
- BROWN, H.W. (1927b). Studies on the rate of development and viability of eggs of *Ascaris lumbricoides* and *Trichuris trichiura* under field conditions. *Journal Parasitology*. p. 14: p. 1 - 15.
- CÁCERES, A., XET, A. M & FLORES, G. (1987). Simplified methodology for helminth egg counts and viability in organic fertiliser. In: *Use of Human Waste in Agriculture and Aquaculture*. IRCWD, Duebendorf (Switzerland)
- CARRINGTON, E. G & HARMAN, S. A. (1981). Recovery of *Ascaris* eggs from sludge. *WRC Process Evaluation*. Stevenage, UK., Water Research Centre.
- CEMAT (1984). *Manual de control biológico y fisicoquímico simplificado de digestores*. Guatemala, CEMAT/OLADE, 55 p.

- CEMAT (1987). Effect ash on the microbiology of faecal material processed in dry latrines (Not published information). Guatemala, CEMAT/IRCWD/EAWAG.
- CRISPIM, W.M.C & BARBOSA, D. C. (1995). 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.
- DUNN, A. J. (1991). *The Development of a predictive model for the removal of helminth eggs during rapid sand filtration*. PhD Thesis, University of Southampton, Department of Civil Engineering.
- FAUST, E. C., SAWITZ, W., TOBIE, J., ODOM, V., PERES, C. & LINCICOME, D. R. (1939). Comparative efficiency of various techniques for the diagnosis of protozoa and helminth in feces. *Journal of Parasitology*. p. 241 - 261
- FEACHEM, R. G., BRADLEY, D. J., GARELICK, H. & MARA, D. (1983). *Sanitation and Disease: Health Aspects of Excreta and wastewater Management*.
- GALVÁN, M., GUTIÉRREZ, A. L and de VICTORICA, J. (1996). Efficiency of rapid quantitative procedures adapted for the analysis of helminth eggs in irrigation waters. In: *IAWQ Symposium on Health Related Water Microbiology*, Mallorca, Spain, October.
- GALVÁN, M., de VICTORICA J. and ROJAS N. (1998). Potential viability of helminth eggs in wastewater assessed by vital staining. In: *Proc. of the IAWQ 19<sup>th</sup> Biennial International Conference*, 10, p. 32-26, Vancouver, Canada.
- GALVÁN, M. & de VICTORICA J. (1998). Implicaciones sanitarias de la presencia de huevos viables de nemátodos en el agua para riego y necesidad de su evaluación rápida. In: *Anais eletrônico XXVI Congresso Interamericano de ingenieria sanitaria y ambiental*. Lima, Peru, 9 p.
- HASS, D. K & TODD, A. C. (1962). Extension of a technique for hatching *Ascaris* eggs *In Vitro*. *American Journal of Veterinary Research*, 11: p. 169 - 170.
- HINDIYEH, M. Y. (1995). *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.
- KANESHIRO, E. S & STERN, G. (1985). Survival of parasite eggs in stored sludge. EPA Report No.600/2-85/142.
- KAGEI, N. (1982). Techniques for the measurement of environmental pollution by infective stage of soil-transmitted helminths. *Collected Papers on the Control of Soil-Transmitted Helminthiasis*. Asian Parasite Control Organisation., Tokyo, Japan, Vol. 2, p. 227 - 246.
- KÖNIG, A. (2000). Influência do tempo de decantação na concentração de ovos de helmintos em esgoto doméstico bruto. In: *Anais do I Seminário Nacional de Microbiologia Aplicada ao Saneamento*. P28-33. Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória-ES
- MARA, D.D. CAIRNCROSS, S. (1989). *Guidelines for the safe use of wastewater and excreta in agriculture and aquaculture. Measures for public health protection*. United Nations Environment Programme. World Health Organization, Geneva.
- OGATA, S.(1923). Studies on development of *Ascaris*. The true nature of my so called fatty corpuscule, and staining method of *Ascaris* eggs.
- OGATA, S. (1924). My method for destruction of *Ascaris* eggs. Experiment of resistance to temperature. counts and viability in organic fertiliser. In: *Use of Human Waste in Agriculture and Aquaculture*. IRCWD, Duebendorf (Switzerland)
- OGATA, S. (1928). On Sudan III staining of *Ascaris* eggs. *Nippon No Ikai* 18; p. 12 - 13.
- MEYER, K. B., MILLER, K. D & KANESHIRO, E. S. (1978). Recovery of *Ascaris* eggs from sludge. *Journal Parasitology*. 64 (2), p. 380 - 383
- PAWLOWSKI, Z.S. (1982). Ascariasis: Host-pathogen biology. *Ver Infec. Dis*. 4: p 806-814.

- REIMERS, R. S., LITTLE, M. D., AKERS, T. G., HENRIQUES, W. D., BORDEAUX, R. C. & McDONNELL, D. (1989). Persistence of pathogens in lagoon-stored sludge. *EPA*, 600/2-89/015.
- REY, L. (1991). *Parasitologia. Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África*. 2ª edição. Editora Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro, 731 p.
- ROJAS, M. N., GALVÁN, M. & de VICTORICA J. (1998). Evaluación rápida de la viabilidad de los huevos de helmintos con colorantes biológicos. In: *Anais do Congresso Interamericano de ingeniería sanitaria y ambiental*. Lima, Peru, 9 p.
- SHEPHERD, A. M. (1962). New Blue R, a stain differentiates between living and dead nematodes. *Nematologica*, 8: p. 201 - 208.
- STOTT, R. (1998). Enumeration of intestinal helminth ova in raw and treated wastewaters. A training manual. Department of Civil Engineering. University of Portsmouth.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (1967). Report of a WHO Expert Committee on Control of Ascariasis. Wld. Hlth. Org. Techn. Rep. Ser. No. 379, 19.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (1989). Health guidelines for use of wastewater in agriculture and aquaculture. *Technical Report Series*. **778**. WHO, Geneva.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (1994). Bench aids for the diagnosis of intestinal Parasites. WHO, Geneva.
- ZHOU, B., LI, F. & LIANG, J. (1985). The use of methylene blue – eosin – borax stain in determining the viability of *Ascaris* ova. *Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, 3 (1), p. 48 - 49.