

## 27º. Encontro Técnico AESABESP

# PROPOSTA DE ADAPTAÇÃO DAS METODOLOGIAS DE IDENTIFICAÇÃO E CONTAGEM DE OVOS DE HELMINTOS PARA ANÁLISE EM EFLUENTES TRATADOS

### **Ana Paula Bueno Zuza**

Graduanda de Engenharia Ambiental – Campus Juazeiro do Norte – Instituto Federal do Ceará, IFCE  
Integrante do Grupo de Pesquisa em Química, Microbiologia e Saneamento Ambiental.

### **Marise Daniele Maciel Lima**

Graduanda de Engenharia Ambiental – Campus Juazeiro do Norte – Instituto Federal do Ceará, IFCE  
Integrante do Grupo de Pesquisa em Química, Microbiologia e Saneamento Ambiental.

### **Letícia Lacerda Freire**

Graduanda de Engenharia Ambiental – Campus Juazeiro do Norte – Instituto Federal do Ceará, IFCE  
Integrante do Grupo de Pesquisa em Química, Microbiologia e Saneamento Ambiental.

### **Amanda Moreira de Sá**

Graduanda de Engenharia Ambiental – Campus Juazeiro do Norte – Instituto Federal do Ceará, IFCE  
Integrante do Grupo de Pesquisa em Química, Microbiologia e Saneamento Ambiental.

### **Anderson Formiga**

Graduado de Engenharia Ambiental – Campus Juazeiro do Norte – Instituto Federal do Ceará, IFCE  
Integrante do Grupo de Pesquisa em Química, Microbiologia e Saneamento Ambiental.

### **Yannice Tatiane da Costa Santos <sup>(1)</sup>**

Professor do curso de Engenharia Ambiental - *Campus* Juazeiro do Norte – Instituto Federal do Ceará, IFCE

Líder do Grupo de Pesquisa em Química, Microbiologia e Saneamento Ambiental.

**Endereço:** Instituto Federal do Ceará, Av. Plácido Aderaldo Castelo, 1646 – Planalto, Juazeiro do Norte, Ceará. CEP: 63040-540. Brasil. E-mail: [anazuza@outlook.com](mailto:anazuza@outlook.com), [yannice@ifce.edu.br](mailto:yannice@ifce.edu.br)

## **RESUMO**

No cenário local de escassez hídrica, inúmeros estudos vêm sendo desenvolvidos visando o reuso de efluentes provenientes de estações de tratamento de esgotos para fins de irrigação. Não obstante, as legislações nacionais ainda não apresentam uma regulamentação para estes fins e os meios de certificação da qualidade desses efluentes devem ser revistos para assegurar a população acerca de possíveis patógenos residuais. Um dos patógenos de grande interesse tratam-se dos helmintos os quais são responsáveis por inúmeras doenças de veiculação hídrica além de seus ovos serem de grande resistência principalmente no solo. A bibliografia especializada descreve uma vasta gama de métodos para a identificação e quantificação destes, entretanto como muitos autores apontam, esses métodos possuem fragilidades. Nesta problemática, podemos destacar, aqueles direcionados para águas residuárias, que além de uma baixa taxa de recuperação dos ovos ainda se restringem a determinadas concentrações de sólidos na amostra. Promovendo uma contribuição para esta área, este trabalho visa o estudo de uma das metodologias existentes, tendo como variáveis uma maior eficiência, maior taxa de recuperação no menor tempo de análise e menor custo laboratorial. Para isto, a metodologia em questão será desenvolvida em testes laboratoriais realizados com amostras provenientes de Estações de Tratamento de Esgoto.

**PALAVRAS-CHAVE:** Ovos de Helmintos, quantificação, metodologias, lagoas de estabilização.

## INTRODUÇÃO

A análise de quantificação e identificação parasitológica de efluentes de estações de tratamento de esgotos é de suma importância para a certificação da qualidade deste efluente que será lançado continuamente, direta ou indiretamente no solo, ou geralmente em algum corpo receptor, visto que a sua presença pode vir a acarretar sérios agravantes na saúde da população, por estes se tratarem de bioindicadores de uma gama de doenças de veiculação hídrica.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2015), ao redor do mundo aproximadamente 2 bilhões de pessoas, mais de 24% da população mundial, são infectadas e mais de 880 milhões de crianças estão em processo de tratamento por conta destes parasitas. A mortalidade está diretamente relacionada com os casos de helmintíases, pois quanto maior o número de larvas no infectado, maior a gravidade da sua doença. A organização ainda completa que, os casos estão distribuídos em áreas tropicais e subtropicais, com as maiores ocorrências na África Subsaariana, nas Américas, onde podemos citar o Brasil, na China e no oeste da Ásia.

No Brasil, as parasitoses intestinais ainda são bastante frequentes. Em um estudo multicêntrico realizado em escolares de 7 a 14 anos cobrindo 10 estados brasileiros, 55,3% dos estudantes foram diagnosticados com algum tipo de parasitose. Em Minas Gerais, dos 5.360 indivíduos examinados, 44,2% estavam infectados, sendo *A.lumbricoides* o parasito mais frequente (59,5%), seguido por *T. trichiura* (36,6%), *Giardia lamblia* (23,8%) e *Schistosoma mansoni* (11,6%) (CAMPOS et. al. 1988 *apud* ROCHA et. al. 2000).

Silveira (2012) afirma que no Brasil, o tratamento dos esgotos sanitários visa principalmente à remoção de matéria orgânica com tratamento biológico, seguindo a legislação para lançamento de efluentes nos corpos receptores, o que não garante a descontaminação parasitológica suficiente para o reúso direto dessas águas, ou até mesmo sua disposição. Damasceno (2015) complementa que no caso da água proveniente de estações de tratamento de esgoto, o risco principal está relacionando a presença de microrganismos patogênicos pertencentes a diversas classes, mas que, no entanto, no que se refere ao tratamento, a maior dificuldade está na remoção de ovos de helmintos. A eliminação, ou ao menos a redução desse risco, por meio de um tratamento que preserve os nutrientes ali presentes, transformaria essa água em solução nutritiva pronta para ser aplicada.

Diversos métodos para a quantificação de ovos de helmintos em águas residuárias são descritos na bibliografia especializada, cada um com suas vantagens e desvantagens. 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 (ZERBINI & CHERNICHARO, 2000).

Em vista às dificuldades apresentadas nas metodologias existentes, é positivo colaborar para o aperfeiçoamento de um método, a partir da consolidação das metodologias vigentes, com o intuito do aperfeiçoamento daquele com melhor taxa de recuperação e menor custo laboratorial, além de visar a possibilidade de redução do período de análise para que assim seja possível o desenvolvimento do método proposto, facilitando desta forma a verificação da qualidade do efluente tratado lançado nos corpos hídricos.

Dessa forma, a criação ou aperfeiçoamento de uma metodologia que seja mais eficiente, menos demorada e com orçamento mais barato por amostra analisada, viabilizará a implantação dessa técnica de quantificação e identificação dos ovos de helmintos nos laboratórios das próprias ETEs, até mesmo as pequenas, sendo possível a determinação da qualidade do efluente em período hábil para sua aplicação.

## OBJETIVOS

O presente estudo tem por objetivo apresentar os resultados preliminares do levantamento de identificação das qualidades e fragilidades dos métodos de contagem e identificação de ovos de helmintos, atualmente recomendados pela Organização Mundial da Saúde (OMS). A partir de testes laboratoriais em um dos métodos do estudo, identificar as fragilidades e propor uma metodologia adaptada selecionando os procedimentos com menor custo, menor tempo de análise, e com maior taxa de recuperação.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Tem-se como parâmetro de seleção inicial as metodologias reconhecidas pelo Guia Integrado de Parasitologia Sanitária da OMS (HINDIYEH, 2004) direcionadas à análise dos efluentes tratados proveniente das estações de tratamento de esgotos. Entre os métodos existentes foram analisados os procedimentos de uma das metodologias, explorando as vantagens e desvantagens, de forma a identificar os pontos deficientes e assim ter condições de verificar uma adaptação para aperfeiçoamento do método.

Para tanto foram seguidas as seguintes etapas:

Etapa 1 – Levantamento das qualidades e fragilidades da metodologia em estudo de acordo com o descrito na bibliografia especializada.

Os dados foram obtidos com base em análise da bibliografia especializada, identificando as melhores reconhecidas, e mais bem empregadas metodologias, na academia científica para a identificação e quantificação de ovos de helmintos, com prioridade na taxa de recuperação, a priori, das espécies de *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e *ancilostomídeos*. Entre estas, uma foi escolhida para dar início ao estudo detalhado.

Etapa 2 – Estudo dos custos e tempo de execução da metodologia

Uma análise acurada se fez necessária no intuito do detalhamento das vantagens e fragilidades do método selecionado, levando-se em consideração como parâmetros melhor custo, no menor tempo, com a maior taxa de recuperação.

Etapa 3 – Testes laboratoriais com a metodologia em estudo

Iniciou-se a partir de então a preparação dos materiais, equipamentos, acessórios e reagentes a serem utilizados, de acordo com a necessidade apresentada pela identificação de possíveis fragilidades e desvantagens na metodologia selecionada.

O desenvolvimento dos testes laboratoriais ocorreu a partir da coleta de amostras de efluentes de lagoas de estabilização (lagoa facultativa seguida de maturação). Para início foram realizadas 7 coletas de efluentes tratados oriundos da lagoa de Maturação, do sistema de Lagoas de Estabilização do município de Missão Velha no mês de fevereiro e março de 2016. Para fins de análise do efluente tratado foram coletados dez litros (10L) de amostra diretamente no ponto de saída para o corpo receptor, seguindo os procedimentos de coleta e analíticos recomendados pela metodologia em estudo.

## RESULTADOS

Para a quantificação e identificação dos ovos de helmintos, dos métodos disponíveis pela OMS, os mais utilizados apresentam como técnica a sedimentação dos sólidos contendo os ovos. Dentre esses métodos destaca-se o método de Bailenger modificado por Ayres e Mara (1996).

Estudos desenvolvidos demonstram que o método se compara favoravelmente em relação a outras técnicas devido sua capacidade de recuperação de uma maior diversidade de espécie de ovos. (Zerbini, 2001).

Desta forma, este método foi selecionado não apenas pela sua alta capacidade de recuperação, como apresentado na bibliografia especializada, mas também por conta da sua simplicidade e do baixo custo dos reagentes utilizados.

Metodologia de Bailenger modificado por Ayres & Mara (1996)

No método em questão, as amostras passam por processos de sedimentação, centrifugação e flutuação. Consecutivas séries de “lavagens”, que tratam de centrifugações com descarte do sobrenadante e suspensão do sedimentado com Triton X, são necessárias e realizadas. O sedimentado é então tratado com solução tampão aceto-acética (pH 4,5) e acetato de etila, para a separação do material gorduroso. Posteriormente, com a adição de uma solução de sulfato de zinco (ZnSO<sub>4</sub>, densidade 1,18) os ovos, com densidade menor que este valor, são separados do sedimento e flutuam. A contagem é realizada em câmara de MacMaster, com observação no microscópio em objetivas de 10x e 40x. O esquema dos procedimentos metodológicos pode ser visualizado no diagrama a seguir:



Figura 1: Procedimento analítico de Bailenger modificado por Ayres e Mara (1996).

Durante o procedimento analítico descrito foi observado que o reagente acetato de etila em solução com o tampão aceto-acético apresentou reação quando em contato com as câmaras de visualização do tipo MacMaster (material poliestireno cristal), gerando manchas de aspecto esbranquiçado e impossibilitando de certo modo a visualização em microscópio.

Para tal comprovação foram realizados testes nas câmaras e comprovou-se que os reagentes, juntamente com a solução descrita, atribuíam certa anomalia à câmara.

#### Adaptação de metodologia:

Em vista a propor uma solução para tal acontecimento, foi adicionado uma nova etapa de lavagem com Triton-X após a etapa de inserção dos reagentes causadores, afim de minimizar o montante residual. Após a lavagem a análise foi seguida naturalmente como demonstrado na figura a seguir:

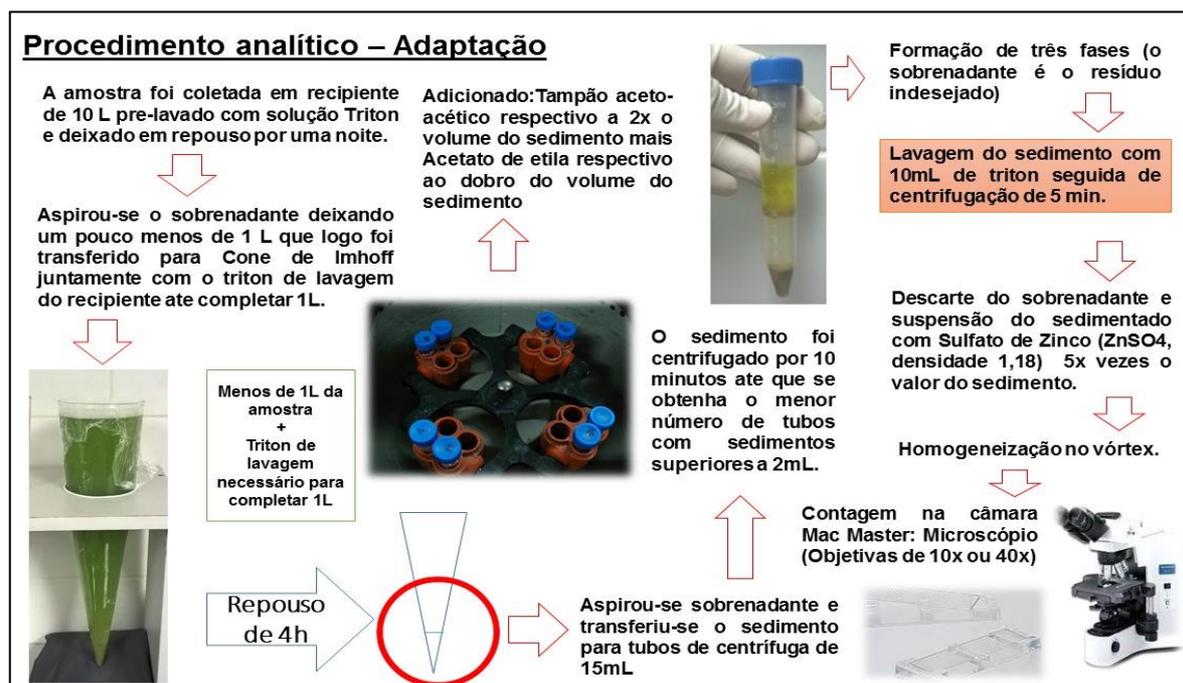
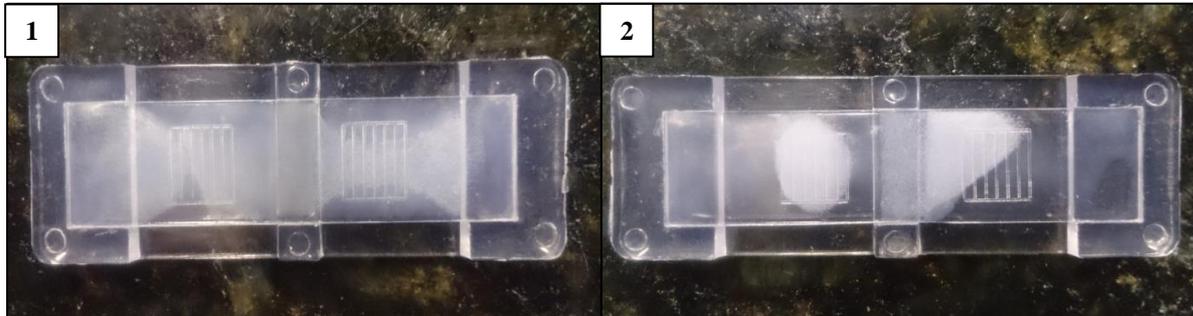


Figura 2: Procedimento analítico para proposta de adaptação.

Na observação das câmaras constatou-se que a etapa de lavagem adicionada possibilitou não apenas uma melhor visualização da amostra, de forma nítida e limpa, mas como também um desgrudamento das algas comumente encontradas neste tipo de amostra, uma vez que este trata-se de efluentes de lagoa de maturação, aumentando ainda mais a visualização dos organismos de interesse.

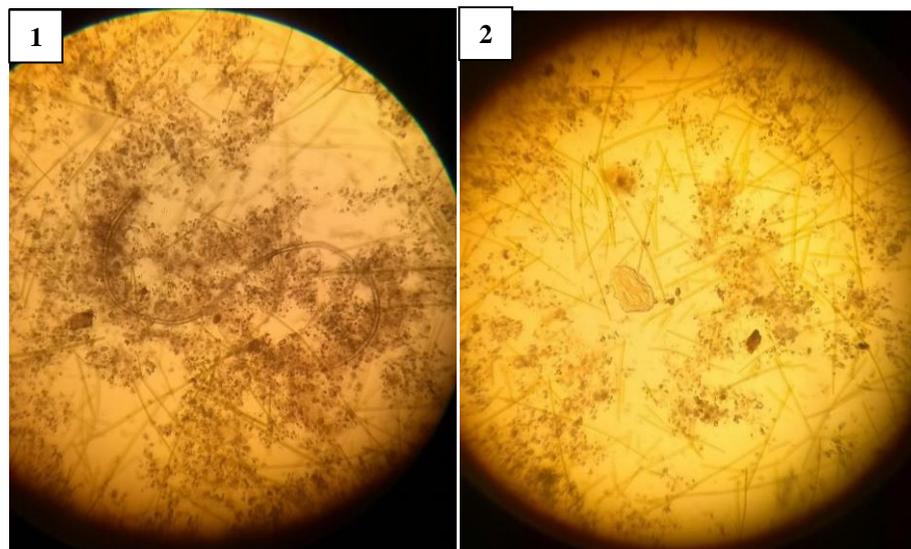
As figuras seguintes mostram a reação dos reagentes supracitados quando em contato com a câmara MacMaster ao longo do tempo (1) e de forma pontual (2).



**Figura 3: Câmaras MacMaster em contato com os reagentes: (1) de forma difusa e (2) pontual.**

Como podemos observar, a figura 3.1 apresenta um embranquecimento difuso, isso por que essa sofreu contato com as soluções durante o emprego da técnica medológica. Já a figura 3.2 trata-se do teste desenvolvido no laboratório para diagnóstico da anomalia, que se procedeu na adição de uma gota do acetato de etila e uma gota de solução tampão aceto-acética.

Na observação das câmaras constatou-se que a etapa de lavagem adicionada possibilitou não apenas uma melhor visualização da amostra, de forma nítida e limpa, mas como também um desgrudamento das algas comumente encontradas neste tipo de amostra, uma vez que este trata-se de efluentes de lagoa de maturação, aumentando ainda mais a visualização dos organismos de interesse.



**Figura 4: Visualização das câmaras na objetiva de 10x: (1) Antes da etapa de lavagem e (2) após a etapa de lavagem.**

## **CONCLUSÃO**

Para fins preliminares pode-se observar que a metodologia apresentada condiz com o que foi descrito na bibliografia especializada quanto a sua viabilidade e aplicabilidade em laboratório devido ao seu baixo custo de material de consumo e de reagentes. Quanto aos intemperes apresentados podemos ressaltar que uma pequena adequação, a qual não veio a atribuir nenhum gasto significativo à metodologia, gerou como resposta não apenas a preservação dos materiais de utilização na técnica empregada, como também uma melhor visualização do sedimento devido a dispersão das algas no meio.

## **RECOMENDAÇÕES**

É recomendado um estudo atualizado acerca da taxa de recuperação da metodologia empregada, uma vez que, ao aplica-la a efluentes tratados, esta não apresentou quantificação significativa devido à baixa concentração das espécies de interesse no meio. Ademais, faz-se necessário um aprofundamento do estudo em outras técnicas que são também bastante utilizadas para a quantificação e identificação de ovos de helmintos para um melhor desenvolvimento de proposta de adaptação dessas metodologias.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. CHAVES, A. et al. A comparative study of the coprologic methods of Lutz, Kato-Katz and the Faust modified. *Revista de Saúde Pública*, v. 13, n. 4, p. 348–352, dez. 1979.
2. COELHO, W. M.; CARVALHO, E. H. DE; ARAÚJO, J. L. DE B. Avaliação de metodologias para detecção de ovos de helmintos no lodo e determinação do percentual de recuperação. In: XXVIII CONGRESSO INTERAMERICANO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL. Cancun, Mexico: 2002. Disponível em: <<http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/mexico26/iii-012.pdf>>
3. COELHO, W. M. et al. Avaliação de metodologias para detecção de ovos de helmintos no lodo e determinação do percentual de recuperação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 23. ABES, 2005 Disponível em: <<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=REPIDISCA&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=38775&indexSearch=ID>>.
4. DAMASCENO, A. P. A. B. Desinfecção de águas servidas através de tratamento térmico utilizando coletor solar. São Paulo - Piracicaba: Universidade de São Paulo, 2015.
5. HINDIYEH, D. M. Y. Integrated Guide to Sanitary Parasitology. Amman – Jordan: WHO Library Cataloguing in Publication Data, 2004.
6. SANTOS, J. G. DOS et al. ANÁLISE PARASITOLÓGICA EM EFLUENTES DE ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS. *Revista de Patologia Tropical*, v. 41, n. 3, 2012.
7. SILVEIRA, A. P. P. Retenção de ovos de helmintos: verificação da eficiência por meio de filtração a vácuo. Dissertação (Mestrado em Tecnologia) —São Paulo: Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, 2012.
8. TOCHETTO, Camila et al. Comparação da eficácia de duas técnicas na detecção de ovos, cistos e oocistos de parasitos em amostras de água. *Veterinária e Zootecnia*, [S.l.], v. 16, n. 3, p. 528-532, june 2010. ISSN 2178-3764. Disponível em: <<http://revistas.bvs-vet.org.br/rvz/article/view/16957>>.
9. VON SPERLING, M. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. 3 ed. ed. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2005.
10. WORLD HEALTH ORGANIZATION WHO. Soil-transmitted helminths. Disponível em: <[http://www.who.int/intestinal\\_worms/en/](http://www.who.int/intestinal_worms/en/)>. Acesso em: 10 dez. 2015.
11. ZERBINI, A. M. ; CHERNICHARO, Carlos Augusto de Lemos . Metodologias para quantificação, identificação e análise de viabilidade de ovos de helmintos em esgotos brutos e tratados. In: Carlos Augusto de Lemos Chernicharo. (Org.). Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios: Aspectos metodológicos. 1ed.Belo Horizonte: FINEP/PROSAB, 2001, v. 1, p. 70-107.
12. ZERBINI, A. M. et al. Estudo da remoção de ovos de helmintos e indicadores bacterianos em um sistema de tratamento de esgotos domésticos por reator anaeróbio e aplicação superficial no solo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 20FEIRA INTERNACIONAL DE TECNOLOGIAS DE SANEAMENTO AMBIENTAL, 3. ABES, 1999 Disponível em: <<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=REPIDISCA&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=42040&indexSearch=ID>>. Acesso em: 10 dez. 2015.