

Fundação Nacional de Saúde

MANUAL PRÁTICO DE ANÁLISE DE ÁGUA

4ª Edição



Fundação
Nacional
de Saúde

Fundação Nacional de Saúde

**Manual Prático de
Análise de Água**
4ª edição

Brasília, 2013

Copyright © 2004 Fundação Nacional de Saúde.

Todos os direitos reservados. É permitida a reprodução parcial ou total desta obra, desde que citada a fonte e que não seja para venda ou qualquer fim comercial.

A responsabilidade pelos direitos autorais de textos e imagens desta obra é da área técnica.

A coleção institucional do Ministério da Saúde pode ser acessada, na íntegra, na Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde: <http://www.saude.gov.br/bvs>

O conteúdo desta e de outras obras da Editora do Ministério da Saúde pode ser acessado na página: <http://www.saude.gov.br/editora>

Tiragem: 4ª edição – 2013 – 6.000 exemplares

Elaboração, distribuição e informações:

MINISTÉRIO DA SAÚDE

Fundação Nacional de Saúde

Departamento de Saúde Ambiental

Coordenação de Controle da Qualidade da Água

Setor de Autarquias Sul, Quadra 4, Bloco N, 9º andar, Ala Sul

CEP: 70070-040, Brasília – DF

Tel.: (61) 3314-6670 / 6396

Home page: <http://www.funasa.gov.br>

Editor:

Coordenação de Comunicação Social

Divisão de Editoração e Mídias de Rede

Setor de Autarquias Sul, Quadra 4, Bloco N, 2º andar, Ala Norte

CEP: 70070-040, Brasília – DF

Home page: <http://www.funasa.gov.br>

Impresso no Brasil / *Printed in Brazil*

Ficha Catalográfica

Brasil. Fundação Nacional de Saúde.

Manual prático de análise de água / Fundação Nacional de Saúde – 4. ed. – Brasília : Funasa, 2013.

150 p.

ISBN

1. Análise da água. 2. Controle da qualidade da água. 3. Consumo de água (Saúde ambiental). I. Título. II. Série.

CDU 628

Títulos para indexação:

Em inglês: Practical manual on water analysis

Em espanhol: Manual práctico de análisis de agua

Sumário

Apresentação	5
Exame bacteriológico da água	7
– Introdução	9
– Bactérias do grupo coliforme	11
– Material utilizado em bacteriologia	13
– Preparo do material de vidro	14
– Preparação dos meios de cultura	15
– Modo de usar a água de diluição quando for determinar o NMP de coliformes	17
– Coleta de amostras de água para exames bacteriológicos	18
– Procedimentos para o exame	21
– Coliformes totais – TM	21
– Coliformes termotolerantes – TM	26
– Contagem de bactérias heterotróficas	28
– Coliformes totais – MF	29
– Coliformes termotolerantes – MF	32
– Coliformes totais e <i>Escherichia coli</i>	36
– Esterilização	38
Análises físico-químicas da água	41
– Análises Titulométricas	43
– Alcalinidade total	43
– Gás carbônico livre	46
– Cloretos	48
– pH	54
– Análises colorimétricas	56
– Cloro residual livre	56
– Cor	57

- Alumínio	59
- Turbidez	63
- Temperatura	67
- Fluoretos	68
- Coleta e preservação de amostras para análise físico-químicas.....	73
- Ensaio de coagulação (<i>Jar-test</i>)	74
- Determinação do teor de cloro ativo.....	80

Preparação dos reagentes utilizados nas análises

constantas nesse manual	83
– Reagentes para alcalinidade	85
– Reagentes para CO ₂	87
– Reagentes para análise de cloretos	89
– Reagentes para análise de dureza.....	91
– Reagentes para análise de alumínio	94
– Reagentes para análise de fluoretos.....	96
– Regras gerais para corrigir as soluções tituladas	99
– Limpeza de material de vidro no laboratório.....	100
– Relação de materiais de laboratório de análise de água	102
– Biossegurança em laboratório	107

Apêndice A – Coleta e preservação de amostras para contagem de células de cianobactérias e cianotoxinas.....

111

Apêndice B – Determinação de *Giardia sp* e

<i>Cryptosporidium sp</i> em água.....	119
--	-----

Bibliografia.....	143
-------------------	-----

Elaboração	147
------------------	-----

Apresentação

Esse manual, elaborado de forma e linguagem simples, tem como objetivo auxiliar pessoas que trabalham nos laboratórios de controle da qualidade da água de estações de tratamento de pequeno e médio portes no desenvolvimento de suas atividades diárias.

A ideia surgiu da necessidade de se ter no laboratório um instrumento de consulta que pudesse acompanhar os passos do técnico a todo instante e em qualquer lugar.

Nele estão descritos os procedimentos mais comuns realizados rotineiramente no laboratório de uma Estação de Tratamento de Água (ETA). Todas as técnicas adotadas nesse manual atendem ao Artigo 22 da Portaria nº 2.914/2011 do Ministério da Saúde, estando de acordo com as normas nacionais e internacionais mais recentes, tais como: I) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater de autoria das instituições American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) e Water Environment Federation (WEF); II) United States Environmental Protection Agency (USEPA); III) Normas publicadas pela International Standardization Organization (ISO); e Metodologias propostas pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Para qualquer procedimento abordado aqui que necessite de um conhecimento mais profundo, deve-se consultar os grandes compêndios que tratam do assunto.

A primeira parte do manual aborda os exames bacteriológicos envolvendo a pesquisa de coliformes totais e termotolerantes, inclusive *Escherichia coli*, e a contagem padrão de bactérias heterotróficas, desde a preparação do material a ser utilizado, passando pela realização dos ensaios, até a emissão de resultados. Na segunda parte, estão descritas as técnicas das análises físico-químicas e testes de rotina de

uma ETA e, finalmente, a preparação de todos os reagentes utilizados. Foram incluídos, também, alguns procedimentos de biossegurança em laboratório, bem como uma relação de equipamentos e materiais de laboratório.

No Apêndice I, são apresentadas as técnicas de coleta e preservação de amostras para contagem de células de cianobactérias e cianotoxinas. No Apêndice II, a técnica de determinação de *Giardia sp* e *Cryptosporidium sp* em água pela técnica de filtração, separação imunomagnética e microscopia de imunofluorescência.

Acredita-se que os parâmetros aqui descritos são suficientes para monitorar o controle da qualidade da água distribuída para consumo humano.

O exame da água destinada ao consumo humano é de fundamental importância, uma vez que permite aferir a ausência ou não de micro-organismos ou substâncias químicas nela presentes, que podem ser prejudiciais à saúde das pessoas.

Exame bacteriológico da água

Coliformes totais

Coliformes termotolerantes

Bactérias heterotróficas



Introdução

A detecção e quantificação de todos os micro-organismos patogênicos potencialmente presentes na água é trabalhosa, demanda tempo, os custos são elevados e nem sempre se obtêm resultados positivos ou que confirmem a presença dos micro-organismos.

O objetivo do exame microbiológico da água é fornecer subsídio a respeito da sua potabilidade, isto é, ausência de risco de ingestão de micro-organismos causadores de doenças, geralmente provenientes da contaminação pelas fezes humanas e outros animais de sangue quente. Vale ressaltar que os micro-organismos presentes nas águas naturais são, em sua maioria, inofensivos à saúde humana. Porém, na contaminação por esgoto sanitário estão presentes micro-organismos que poderão ser prejudiciais à saúde humana.

Os micro-organismos patogênicos incluem vírus, bactérias, protozoários e helmintos.

Na tabela estão relacionadas algumas doenças veiculadas pela água e seus agentes.

Doenças	Agentes patogênicos
Origem bacteriana Febre tifoide e paratifoide Disenteria bacilar Cólera Gastroenterites agudas e Diarreias	<i>Salmonella typhi</i> <i>Salmonella paratyphi A e B</i> <i>Shigella sp</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Escherichia coli enterotóxica</i> <i>Campylobacter</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Salmonella sp</i> <i>Shigella sp</i>
Origem viral Hepatite A e E Poliomielite Gastroenterites agudas e crônicas	Vírus da hepatite A e E Vírus da poliomielite Vírus Norwalk Rotavírus Enterovírus Adenovírus
Origem parasitária Disenteria amebiana Gastroenterites	<i>Entamoeba histolytica</i> <i>Giárdia lâmbliã</i> <i>Cryptosporidium</i>

A água potável não deve conter micro-organismos patogênicos e deve estar livre de bactérias indicadoras de contaminação fecal. Como indicadores de contaminação fecal, são eleitas como bactérias de referência as do grupo coliforme. O principal representante desse grupo de bactérias chama-se *Escherichia coli*.

A razão da escolha desse grupo de bactérias como indicador de contaminação da água deve-se aos seguintes fatores:

- a. São encontradas nas fezes de animais de sangue quente, inclusive dos seres humanos.
- b. São facilmente detectáveis e quantificáveis por técnicas simples e economicamente viáveis, em qualquer tipo de água.
- c. Sua concentração na água contaminada possui uma relação direta com o grau de contaminação fecal desta.
- d. Tem maior tempo de sobrevivência na água que as bactérias patogênicas intestinais, por serem menos exigentes em termos nutricionais, além de serem incapazes de se multiplicarem no ambiente aquático ou se multiplicarem menos que as bactérias entéricas.
- e. São mais resistentes aos agentes tensoativos e agentes desinfetantes do que bactérias patogênicas.

A Portaria nº 2.914/2011 do Ministério da Saúde (Portaria de Potabilidade) estabelece que seja verificada, na água para consumo humano para garantir sua potabilidade, a ausência de coliformes totais e *Escherichia coli* e determinada a contagem de bactérias heterotróficas.

A mesma portaria determina que a contagem de bactérias heterotróficas deva ser realizada como um dos parâmetros para avaliar a integridade do sistema de distribuição (reservatório e rede), devendo ser feita em 20% das amostras mensais de coliformes totais nos sistemas de distribuição, recomendando que não deva exceder a 500 Unidades Formadoras de Colônias por 1 mililitro de amostra (500 UFC/mL).

Para a conformidade do padrão microbiológico de potabilidade é obrigatório a ausência de coliformes totais em 100 mL de amostra na saída do tratamento. No entanto, conforme Anexo I da Portaria MS nº 2.914/2011, admite-se a presença de coliformes totais em apenas 1 amostra mensal para sistemas ou soluções coletivas que abastecem menos de 20.000 habitantes e em 5% das amostras mensais em sistemas ou soluções coletivas que abastecem mais de 20.000 habitantes. Ressalta-se que em ambas as situações não é permitida a presença de *Escherichia coli* na água para consumo humano.

Bactérias do grupo coliforme

Conceitos:

- **Coliformes totais** (bactérias do grupo coliforme) - bacilos gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, oxidase-negativos, capazes de desenvolver na presença de sais biliares ou agentes tensoativos que fermentam a lactose com produção de ácido, gás e aldeído a $35,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ em 24-48 horas, e que podem apresentar atividade da enzima β - galactosidase. A maioria das bactérias do grupo coliforme pertence aos gêneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Enterobacter*, embora vários outros gêneros e espécies pertençam ao grupo.

- **Coliformes termotolerantes** - subgrupo das bactérias do grupo coliforme que fermentam a lactose a $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ em 24 horas; tendo como principal representante a *Escherichia coli*, de origem exclusivamente fecal.

- *Escherichia coli* - bactéria do grupo coliforme que fermenta a lactose e manitol, com produção de ácido e gás a $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ em 24 horas, produz indol a partir do triptofano, oxidase negativa, não hidroliza a ureia e apresenta atividade das enzimas β galactosidase e β glucoronidase, sendo considerado o mais específico indicador de contaminação fecal recente e de eventual presença de organismos patogênicos.

A origem fecal da *E. coli* é inquestionável e sua natureza ubíqua pouco provável, o que valida seu papel mais preciso de organismo indicador de contaminação tanto em águas naturais quanto tratadas.

A Contagem Padrão de Bactérias é muito importante durante o processo de tratamento da água, visto que permite avaliar a eficiência das várias etapas do tratamento.

É importante, também, conhecer a densidade de bactérias, tendo em vista que um aumento considerável da população bacteriana pode comprometer a detecção de organismos coliformes. Embora a maioria dessas bactérias não seja patogênica, pode representar riscos à saúde, como também deteriorar a qualidade da água, provocando odores e sabores desagradáveis.

Material utilizado em bacteriologia

- a) autoclave;
- b) estufa bacteriológica;
- c) estufa de esterilização e secagem;
- d) balança;
- e) destilador;
- f) banho-maria;
- g) contador de colônias;
- h) alça de platina com cabo;
- i) tubo de Durhan;
- j) tubo de ensaio;
- k) algodão em rama;
- l) meios de cultura;
- m) frascos de coleta;
- n) pipetas graduadas;
- o) pipetador;
- p) papel-alumínio;
- q) lamparina a álcool ou bico de Bunsen;
- r) placas de Petri;
- s) pinça de aço inox;
- t) membranas filtrantes;
- u) porta-filtro de vidro ou aço inox;
- v) lâmpada ultravioleta.

Preparo do material de vidro

Tubos de ensaio

- a) colocar o tubo de Durhan na posição invertida dentro do tubo de ensaio;
- b) tampar o tubo de ensaio com um chumaço de algodão em rama.

Frascos de coleta

- a) colocar duas gotas (0,1 mL) de Tiosulfato de Sódio a 10% dentro do frasco;
- b) colocar uma tira de papel-alumínio entre a boca e a tampa do frasco;
- c) envolver a boca e tampa do frasco em papel-alumínio.

Pipetas

- a) colocar um pequeno chumaço de algodão no bocal da pipeta;
- b) envolvê-la em papel-alumínio ou papel-madeira(Kraft).

Placas de petri de vidro

- a) envolvê-las em papel-alumínio ou papel-madeira.

Nota: Frascos de coleta, pipetas e placas de Petri devem ser esterilizados e antes de serem preparados devem estar limpos e secos (ver esterilização pg. 38).

Meios de cultura

- a) caldo lactosado;
- b) caldo lactosado verde brilhante Bile a 2%;

- c) caldo EC;
- d) *Plate Count Agar*.

Preparação dos meios de cultura

Caldo lactosado de concentração dupla

- a) pesar 26 gramas do meio de cultura e dissolver em 1.000 mL de água destilada;
- b) distribuir em tubos de ensaio (10 mL em cada tubo), tampar os tubos;
- c) esterilizar a 121°C (1 Kg/cm² de pressão) em autoclave durante 15 minutos;
- d) deixar esfriar;
- e) guardar no refrigerador (válido por uma semana).

Caldo lactosado de concentração simples

- a) pesar 13 gramas do meio de cultura desidratado e dissolver em 1.000 mL de água destilada;
- b) distribuir em tubos de ensaio (10 mL em cada tubo), tampar os tubos;
- c) esterilizar a 121°C (1 Kg/cm² de pressão) em autoclave durante 15 minutos;
- d) deixar esfriar;
- e) guardar no refrigerador (válido por uma semana).

Caldo lactosado verde brilhante bile a 2%

- a) pesar 40 gramas do meio de cultura desidratado e dissolver em 1.000 mL de água destilada;

- b) distribuir em tubos de ensaio (10 mL em cada tubo), tampar os tubos;
- c) esterilizar a 121°C (1 Kg/cm² de pressão) em autoclave durante 15 minutos;
- d) deixar esfriar;
- e) guardar no refrigerador (válido por uma semana).

Meio EC

- a) pesar 37,0 gramas do meio desidratado e dissolver em 1000 mL de água destilada;
- b) distribuir em tubos de ensaio contendo o tubo Durhan invertido, 10 mL em cada tubo, tampar os tubos;
- c) esterilizar a 121°C (1Kg/cm² de pressão) em autoclave durante 15 minutos;
- d) guardar no refrigerador (válido por 96 horas).

Plate Count Agar

- a) pesar 20,5 gramas do meio de cultura desidratado e dissolver em 1000 mL de água destilada fria;
- b) deixar em repouso durante 5 minutos;
- c) aquecer, agitando frequentemente com bastão de vidro, até completa dissolução do meio (durante o aquecimento não deixar entrar em ebulição);
- d) se necessário, ajustar o pH para 7,0 com Hidróxido de Sódio solução normal (NaOH 1N);
- e) distribuir em tubos de ensaio com tampa roscável (12 mL em cada tubo);
- f) esterilizar a 121°C (1 Kg/cm² de pressão) em autoclave durante 15 minutos.

- Notas:** 1. Esse meio, depois de frio, se solidifica. Fundir em banho-maria antes de usá-lo.
2. Devido à variedade de meios de culturas existentes no mercado, seguir sempre as instruções do fabricante, que vêm estampadas no rótulo do frasco.

Água de diluição

Solução 1

- pesar 34 gramas de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) e dissolver em 500 mL de água destilada, ajustar o pH para 7,2 com solução hidróxidos de sódio, solução 1N e diluir a 1 litro com água destilada. Normalmente são necessários 175 mL de NaOH 1N para elevar o pH.

Solução 2

- pesar 81,1 gramas de cloreto de magnésio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e dissolver em 1 litro de água destilada.

Solução 3

- adicionar 1,25 mL da **solução 1** e 5 mL da **solução 2** a 1 litro de água destilada. Distribuir em tubos de ensaio em quantidade que, após autoclavação, assegurem um volume de $9 \pm 0,2$ mL.
- esterilizar em autoclave a 121°C ($1\text{Kg}/\text{cm}^2$ de pressão) durante 15 minutos.

Modo de usar a água de diluição quando for determinar o NMP de coliformes

- a) tomar 1 tubo de ensaio contendo $9 \pm 0,2$ mL de água de diluição esterilizada;
- b) adicionar 1 mL da amostra de água a ser examinada;
- c) misturar bem. Está pronta a diluição 1:10;

- d) tirar da diluição acima, com pipeta esterilizada, 1 mL e inocular no tubo contendo caldo lactosado de concentração simples. (diluição 1:100).

Coleta de amostras de água para exames bacteriológicos

A coleta de amostra é um dos passos mais importante para a avaliação da qualidade da água. Portanto, é essencial que a amostragem seja realizada com precaução e técnica para evitar todas as fontes de possível contaminação.

As amostras devem ser coletadas em frascos de vidro branco, boca larga, com tampa de vidro esmerilhada, bem ajustada, capacidade de 125 mL, previamente esterilizados ou saco plástico estéril, descartável, contendo pastilha de tiosulfato de sódio.

Os frascos para a coleta de águas cloradas devem receber, antes de serem esterilizados, 0,1 mL (2 gotas) de tiosulfato de sódio a 10%.

Procedimentos para coleta em residências

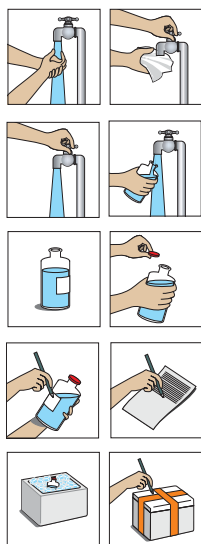
- a) lavar as mãos com água e sabão;
- b) limpar a torneira do usuário com um pedaço de algodão embebido em álcool, 70% e/ou hipoclorito de sódio 100mg/L;
- c) abrir a torneira e deixar escorrer a água durante 1 ou 2 minutos;
- d) coletar a amostra de água;
- e) encher com pelo menos 3/4 de seu volume;

- f) tampar o frasco, identificá-lo, anotando endereço, hora, e nome do coletor, etc;
- g) marcar o frasco com o número da amostra, correspondente ao ponto de coleta;
- h) preencher a ficha de identificação da amostra de água;
- i) colocar o frasco da amostra na caixa de isopor com gelo;
- j) lacrar, identificar e enviar a caixa para o laboratório.

O tempo de coleta e a realização do exame não devem exceder 24 horas.

Nota: Além de residências as amostras podem ser coletadas em hospitais, escolas, torneiras públicas e pontos considerados vulneráveis. No caso de utilização do hipoclorito de sódio para desinfecção da torneira, deve-se removê-lo completamente antes da coleta.

Fases do procedimento



Fonte: OMS, 1998 (adaptado)

Outros locais de coleta

Nas estações de tratamento, as amostras podem ser coletadas na captação, chegada da água bruta antes do canal da Parshall, nos decantadores, na saída dos filtros e nos reservatórios de água tratada.

Procedimentos para o exame

Coliformes totais

Método dos tubos múltiplos (TM)

Material necessário

- a) tubo de ensaio;
- b) estante para tubo de ensaio;
- c) tubo de Durhan;
- d) pipeta graduada de 10 mL;
- e) pipeta graduada de 1 mL;
- f) bico de Bunsen ou lamparina a álcool;
- g) caldo Lactosado de concentração dupla;
- h) caldo Lactosado de concentração simples;
- i) caldo Lactosado Verde Brilhante Bile a 2%;
- j) água de diluição;
- k) alça de platina com cabo de Kolle;
- l) estufa bacteriológica.

Execução do teste

Teste presuntivo

- a) tomar uma bateria contendo 15 tubos de ensaio distribuídos de 5 em 5;
- b) nos primeiros 5 tubos, (os que contêm caldo lactosado de concentração dupla) inocular, com pipeta esterili-

zada, 10 mL da amostra de água a ser examinada, em cada tubo. (Diluição 1:1);

- c) nos 10 tubos restantes (os que contêm caldo lactosado de concentração simples), inocular nos 5 primeiros 1 mL da amostra (Diluição 1:10) e nos 5 últimos tubos, inocular 0,1 mL da amostra, em cada tubo. (Diluição 1:100). Ver página 15;
- d) misturar;
- e) incubar a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 24/48 horas;
- f) se no final de 24/48 horas, houver a formação de gás dentro do tubo de Durham, significa que o teste presuntivo foi Positivo. Neste caso, fazer o teste confirmativo. Se não houver a formação de gás durante o período de incubação, o exame termina nessa fase e o resultado do teste é considerado negativo.

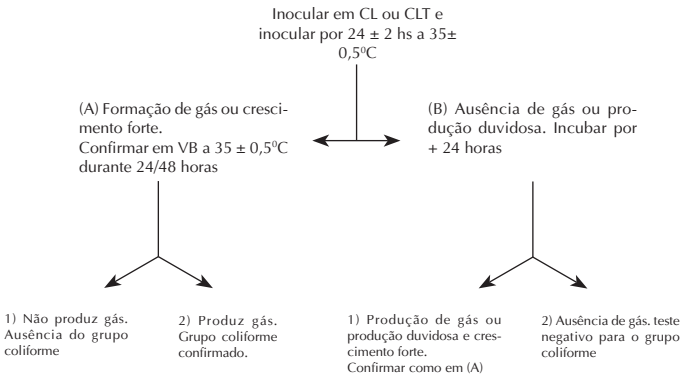
Observação: No lugar do caldo lactosado pode ser usado o caldo Lauril Triptose.

Teste confirmativo

- a) tomar o número de tubos do teste presuntivo que deram Positivos (formação de gás) nas 3 diluições 1:1; 1:10 e 1:100;
- b) tomar igual número de tubos contendo o meio de cultura verde brilhante Bile a 2%;
- c) com a alça de platina, previamente flambada e fria, retirar de cada tubo positivo uma porção de amostra e inocular no tubo correspondente contendo o meio verde brilhante. Esse procedimento chama-se repicagem;
- d) identificar os tubos;

- e) incubar durante 24/48 horas a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$;
- f) se no final do período de 24/48 horas houver a formação de gás dentro do tubo de Durham o teste é considerado positivo. Caso não haja formação de gás, o teste é considerado negativo.

Fases de teste



Nota: CL = caldo lactosado
CLT = caldo lauril triptose
VB = verde brilhante bile a 2%

Expressão dos resultados

- a) os resultados são expressos em NMP (Número Mais Provável) /100 mL de amostra.
- b) para se determinar o NMP, verifica-se a combinação formada pelo número de tubos positivos que apresentaram as diluições 1:1; 1:10 e 1:100 no Teste Confirmativo.

Exemplo:

- a) nos 5 tubos da diluição 1:1, obtiveram-se 3 tubos positivos;
- b) nos 5 tubos da diluição 1:10, obtiveram-se 2 tubos positivos;
- c) nos 5 tubos da diluição 1:100, obteve-se 1 tubo positivo;
- d) formou-se, portanto, a combinação 3-2-1;
- e) determina-se o NMP consultando a Tabela 1.

Se não quiser trabalhar com 15 tubos para determinar o NMP. fazer apenas 5 tubos na diluição 1:1 (10 mL do meio de cultura + 10 mL da amostra) e calcular o NMP. consultando a tabela 2.

Tabela 1 – NMP. com limite de confiança de 95% para várias combinações de resultados positivos quando 5 tubos são usados para cada diluição (10 mL, 1,0 mL e 0,1 mL)

Combinação de positivos	NMP/100 mL	Limites	
		Inferior	Superior
0-0-0	< 2	-	-
0-0-1	2	1.0	10
0-1-0	2	1.0	10
0-2-0	4	1.0	13
1-0-0	2	1.0	11
1-0-1	4	1.0	15
1-1-0	4	1.0	15
1-1-1	6	2.0	18
1-2-0	6	2.0	18
2-0-0	4	1.0	17
2-0-1	7	2.0	20
2-1-0	7	2.0	21
2-1-1	9	3.0	24
2-2-0	9	3.0	25
2-3-0	12	5.0	29
3-0-0	8	3.0	24
3-0-1	11	4.0	29
3-1-0	11	4.0	29
3-1-1	14	6.0	35
3-2-0	14	6.0	35
3-2-1	17	7.0	40
4-0-0	13	5.0	38
4-0-1	17	7.0	45
4-1-0	17	7.0	46
4-1-1	21	9.0	55
4-1-2	22	12	63
4-2-0	26	9.0	56
4-2-1	26	12	65
4-3-0	27	12	67
4-3-1	33	15	77
4-4-0	34	16	80
5-0-0	23	9	86
5-0-1	30	10	110
5-0-2	40	20	140
5-1-0	30	10	120
5-1-1	50	20	150
5-1-2	60	30	180
5-2-0	50	20	170
5-2-1	70	30	210
5-2-2	90	40	250
5-3-0	80	30	250
5-3-1	110	40	300
5-3-2	140	60	360
5-3-3	170	80	410
5-4-0	130	50	390
5-4-1	170	70	480
5-4-2	220	100	560
5-4-3	280	120	690
5-4-4	350	160	820

Combinação de positivos	NMP/100 mL	Limites	
		Inferior	Superior
5-5-0	240	100	940
5-5-1	300	100	1300
5-5-2	500	200	2000
5-5-3	900	300	2900
5-5-4	1600	600	5300
5-5-5	1600	-	-

Fonte: APHA, 1985

Tabela 2 – NMP. com limite de confiança de 95% para os resultados positivos quando 5 porções de 10 mL são examinadas

Combinação de positivos	NMP/100 mL	Limites	
		Inferior	Superior
0	< 2,2	0	6,0
1	2,2	0,1	12,6
2	5,1	0,5	19,2
3	9,2	1,6	29,4
4	16,0	3,3	52,9
5	>16,0	8,0	Infinito

Fonte: APHA, 1985

Coliformes termotolerantes

Método dos tubos múltiplos (TM)

Material necessário

- tubos de ensaio com Meio EC;
- bico de Bunsen ou lamparina a álcool;
- alça de platina;
- banho-maria.

Execução do ensaio

- a) tomar todos os tubos do Teste Presuntivo que deram Positivos (Formação de gás) e todos os tubos negativos em que houve crescimento após 48 horas, nas 3 diluições (1:1; 1:10 e 1:100);
- b) transferir, com alça de platina flambada e fria, uma porção para os tubos de ensaio contendo o meio EC;
- c) misturar e deixar todos os tubos em banho de água durante 30 minutos;
- d) incubar em banho-maria a $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ durante 24 ± 2 horas;
- e) se no final de 24 horas ou menos houver a formação de gás, está indicada a presença de coliformes termotolerantes;
- f) calcular o NMP consultando a tabela 1.

Nota: Esse ensaio deve ser realizado simultaneamente ao Teste Confirmativo para Coliformes Totais.

Observação: Fazer esse exame toda vez que forem realizados testes confirmativos para coliformes totais.

Contagem de bactérias heterotróficas

Material necessário

- a) placa de Petri;
- b) pipeta graduada;
- c) bico de Bunsen ou lamparina a álcool;
- d) plate *Count Agar*;
- e) estufa bacteriológica;
- f) contador de colônias.

Execução do ensaio

- a) transferir, com pipeta estéril, 1 mL da amostra para uma placa de Petri previamente esterilizada;
- b) entreabrir a placa e adicionar o meio de cultura, previamente fundido e estabilizado em banho-maria a 44-46°C, contido no tubo de ensaio;
- c) homogeneizar o conteúdo da placa em movimentos circulares moderados em forma de (∞), em torno de 10 vezes consecutivas;
- d) quando o meio de cultura se solidificar, incubar a placa em posição invertida a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 48 ± 3 horas;
- e) no final do período de incubação, fazer a contagem das colônias com o auxílio de um contador de colônias.

Expressão dos resultados

Os resultados são expressos como número de colônias de bactérias/mL ou Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL.

Notas:

- a) antes de iniciar os exames, desinfetar a bancada do laboratório usando uma solução de álcool etílico a 70% ou outro desinfetante que não deixe resíduo;
- b) todas as amostras a serem examinadas devem ser homogeneizadas pelo menos 25 vezes;
- c) não esquecer de flambar a boca dos tubos de ensaio contendo meios de cultura, antes de usá-los;
- d) o tiosulfato de sódio a 10% colocado nos frascos de coleta é para neutralizar a ação do cloro;
- e) as placas de Petri devem ser colocadas na posição invertida para evitar a condensação de água na superfície do ágar;
- f) fazer a contagem padrão de bactérias heterotróficas, sempre em duplicata.

Coliformes totais

Método da membrana filtrante (MF)

Material necessário

- a) equipamento de filtração com porta-filtro;
- b) placa de Petri esterilizada de \varnothing 47 mm;
- c) filtros de membrana de \varnothing 47 mm e porosidade de 0,45 μ m, com cartão absorvente;
- d) meio de cultura (m Endo Broth MF);
- e) água de diluição estéril;
- f) pinça de aço inox;

- g) copo de aço inox;
- h) bico de Bunsen ou lamparina a álcool;
- i) bomba de vácuo (seringa);
- j) estufa bacteriológica.

Execução do ensaio

- a) com a pinça, colocar cuidadosamente na placa de Petri um cartão absorvente;
- b) com pipeta esterilizada colocar 1,8 mL do meio de cultura no cartão absorvente e tampar a placa;
- c) colocar a membrana filtrante no porta-filtro, com a pinça previamente flambada e fria;
- d) agitar o frasco contendo a amostra, pelo menos 25 vezes;
- e) destampar e flambar a boca do frasco;
- f) verter, cuidadosamente, 100 mL de amostra no porta-filtro, evitando que a água respingue sobre as bordas superiores;
- g) ligar a bomba de vácuo (seringa) e fazer a sucção;
- h) depois de filtrada a amostra, lavar 3 vezes as paredes do funil com água de diluição estéril com porções de 20 mL aplicando vácuo;
- i) após a lavagem e filtração, aliviar o vácuo e remover o funil do suporte;
- j) com a pinça flambada e fria, remover o filtro do suporte e colocá-lo na placa de Petri, antes preparada, com o lado quadriculado para cima;

- k) tampar a placa de Petri e incubá-la invertida a 35°C durante 24 ± 2 horas;
- l) após o período de incubação, examinar o filtro fazendo a contagem das colônias.

Leitura dos resultados

As colônias indicativas de coliformes totais típicas têm uma cor rosa a vermelho escuro, com brilho metálico.

O brilho pode aparecer no centro ou na periferia da colônia. As não coliformes aparecem com coloração vermelho-clara ou escura sem o brilho metálico característico.

Observação: Às vezes, quando o disco está muito úmido e a fonte de luz é muito intensa, as colônias de não coliformes podem aparecer com um brilho falso, causando erros. Isso poderá ser contornado usando-se fonte de luz mais difusa ou secando o filtro antes de ser examinado.

Preparo do meio de cultura

Material necessário

- a) meio de cultura desidratado (m Endo Broth MF);
- b) água destilada;
- c) álcool etílico a 95%;
- d) frasco *Erlenmeyer* de 125 mL;
- e) vidro de relógio;
- f) bico de Bunsen ou lamparina a álcool.

Técnica

- a) pesar 4,8 gramas do meio desidratado;
- b) transferir para o *Erlenmeyer*;
- c) adicionar aos poucos 100 mL de água destilada contendo 2 ml de álcool etílico a 95%;
- d) aquecer em banho-maria ou no bico de Bunsen até o início da fervura (não deixar ferver);
- e) deixar esfriar;
- f) distribuir 1,8 mL em cada placa.

Observações: 1. Preparar somente a quantidade necessária para uso. Esse meio pode ser adquirido em ampolas de 2 mL, porém o custo é muito elevado. É mais econômico prepará-lo no laboratório.
2. Em substituição ao meio m Endo Broth MF poderá ser utilizado o meio sólido (LES Endo agar).

Coliformes termotolerantes

Método da membrana filtrante (MF)

Material necessário

- a) equipamento de filtração com porta-filtro;
- b) placa esterilizada de Ø 47 mm;
- c) filtros de membrana de Ø 47 mm e porosidade de 0,45µm, com cartão absorvente;
- d) meio de cultura (m FC Broth Base);
- e) água de diluição estéril;
- f) pinça de aço inox;
- g) copo de aço inox;

- h) bico de Bunsen ou lamparina a álcool;
- i) bomba de vácuo (seringa);
- j) estufa bacteriológica ou banho-maria.

Preparo do meio de cultura

Material necessário

- a) meio de cultura desidratado (m FC Broth Base);
- b) água destilada;
- c) ácido rosólico a 1% em NaOH 0,2 N;
- d) frasco *Erlenmeyer* de 125 mL;
- e) vidro de relógio;
- f) bico de Bunsen ou lamparina a álcool.

Técnica

- a) pesar 3,7 gramas do meio desidratado;
- b) transferir para o *Erlenmeyer*;
- c) dissolver o meio pesado, em 100 mL de água destilada;
- d) adicionar 1 mL da solução de ácido rosólico a 1%;
- e) aquecer até a ebulição;
- f) deixar esfriar;
- g) distribuir 2,0 ml em cada placa.

Observações: 1. Preparar somente a quantidade necessária para uso;
2. Esse meio pode ser adquirido em ampolas de 2 mL, porém o custo é muito elevado. É mais econômico prepará-lo no laboratório.

3. Para preparar o ácido rosólico a 1% dissolver 1 grama do ácido em 100 mL de NaOH 0,2 N.
4. Para preparar o NaOH 0,2 N diluir 20 mL da solução 1N para 100 mL de água destilada.
5. O ácido rosólico dura 2 semanas ou menos, quando guardado na geladeira (2 a 10°C). Descarte-o quando a coloração mudar de vermelho-escuro para marrom.
6. Esse meio pode ser solidificado adicionando 1,2 a 1,5% de agar antes da ebulição.

Execução do ensaio

- a) com a pinça, colocar cuidadosamente na placa de Petri um cartão absorvente;
- b) com pipeta esterilizada colocar 2,0 mL do meio de cultura no cartão absorvente e tampar a placa;
- c) colocar a membrana filtrante no porta-filtro, com a pinça previamente flambada e fria;
- d) agitar o frasco contendo a amostra, pelo menos 25 vezes;
- e) destampar e flambar a boca do frasco;
- f) verter, cuidadosamente, 100 mL de amostra no porta-filtro, evitando que a água respingue sobre as bordas superiores;
- g) ligar a bomba de vácuo (seringa) e fazer a sucção;
- h) depois de filtrada a amostra, lavar 3 vezes as paredes do funil com água de diluição estéril com porções de 20 mL aplicando vácuo;
- i) após a lavagem e filtração, aliviar o vácuo e remover o funil do suporte;

- j) com a pinça flambada e fria, remover o filtro do suporte e colocá-lo dentro da placa de Petri, com o lado quadriculado para cima;
- k) tampar a placa de Petri e incubá-la invertida a $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ durante 24 ± 2 horas;
- l) encerrado o período de incubação, examinar o filtro fazendo a contagem das colônias;
- m) as colônias indicativas de coliformes termotolerantes aparecem de cor azul. As não coliformes aparecem com coloração clara ou rósea.

Esterilização do conjunto de filtração no campo

- a) umedecer cuidadosamente o anel de asbesto situado na base do suporte, com meia tampa de álcool metílico (tampa do frasco de álcool);
- b) atear fogo;
- c) colocar a cuba de aço por cima do funil quase o tampando;
- d) após aquecer a cuba até o suportável pela mão, tampar o suporte;
- e) esperar 15 minutos, aproximadamente e então remover a cuba e lavar o funil com água de diluição estéril a fim de remover qualquer resíduo tóxico.

Observações: 1. A combustão incompleta do metanol provoca a formação de aldeído fórmico que é o agente esterilizante.

2. O suporte do filtro deve estar estéril no início de cada série de filtração e essa série não deve ultrapassar mais de 30 amostras. A cada série de filtração efetuar o exame de 100 mL da água de diluição para controle da esterilidade do porta-filtro.

3. Os meios de cultura preparados para uso com membrana filtrante valem por 96 horas quando guardados em refrigerador com temperatura entre 2 a 10°C;
4. O conjunto de filtração também pode ser esterilizado em autoclave.

Coliformes totais e *Escherichia coli*

Teste de presença/ausência

Método do substrato cromogênico

A opção da metodologia para a realização dos exames bacteriológicos da água recai naquele procedimento que melhor se adequar às condições do laboratório, devendo-se, no entanto, adotar como padrão as metodologias, frequências e interpretação de resultados estabelecidas e recomendadas pela legislação em vigor.

Os métodos de Tubos Múltiplos (TM) e Membrana Filtrante (MF) ainda são largamente utilizados, entretanto a opção pelo método de Substrato Cromogênico-Fluorogênico Definido é comumente adotado pela facilidade de manuseio, bem como por ter relativo custo/benefício já comprovado.

O método é baseado nas atividades enzimáticas específicas dos coliformes (β galactosidade) e *E. coli* (β glucoronidase). Os meios de cultura contêm nutrientes indicadores (substrato cromogênico) que, hidrolisados pelas enzimas específicas dos coliformes e/ou *E. coli*, provocam uma mudança de cor no meio. Após o período de incubação, se a cor amarela é observada, coliformes totais estão presentes. Se a fluorescência azul é observada sob luz ultravioleta (UV) 365 nm, *E. coli* está presente.

Além da maior precisão, esse método tem como vantagem o tempo de resposta, já que a determinação simultânea de coliformes (totais) e *E. coli* é efetuada após incubação das amostras a 35°C por 24 horas, não havendo necessidade de ensaios confirmativos.

Material necessário

- a) recipiente de coleta de vidro ou de plástico;
- b) substrato cromogênico (ONPG)/fluorogênico (MUG);
- c) estufa bacteriológica;
- d) lâmpada ultravioleta de 365 nm.

Execução do ensaio

- a) coletar a amostra (100mL) em um frasco estéril ou saco de coleta contendo tiosulfato de sódio a 10% para água tratada;
- b) no próprio frasco ou saco adicionar o conteúdo de 1 (um) frasconete contendo o substrato cromogênico;
- c) fechar o frasco ou o saco e agitar levemente, não precisa dissolver totalmente, essa dissolução ocorrerá de forma natural;
- d) incubar a $35,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.

Interpretação e expressão dos resultados

Decorridas 24 horas de incubação, retirar da estufa o material e observar visualmente o frasco ou saco. Se apresentar coloração amarelada, o resultado é presença de Coliformes Totais na amostra.

Com o auxílio de uma lâmpada ultravioleta 365 nm, observar se existe fluorescência azul nas amostras que desenvolveram coloração amarelada aproximando a lâmpada ao frasco. Se a amostra apresentar coloração amarelada e fluorescência com a luz UV-365 nm significa que há presença de *Escherichia coli* na amostra examinada.

Caso a amostra permaneça transparente, o resultado é negativo, tanto para Coliformes Totais como para *E. coli*.

Expressar o resultado como: Presença ou Ausência de Coliformes Totais ou *Escherichia coli*.

Nota: A fluorescência azul ocorre somente na presença da luz ultravioleta, ao tirar o frasco da frente da luz ele volta a ficar amarelo.

Esterilização

Os seguintes materiais devem ser esterilizados: frascos de coleta de amostra, pipetas, placas de Petri de vidro, frascos e tubos com água de diluição e meios de cultura.

Procedimentos para a esterilização

- a) preparar todo o material;
- b) verificar se o nível da água dentro da autoclave está acima das resistências. Completar se necessário;
- c) colocar todo o material dentro do depósito metálico e tampar a autoclave;
- d) apertar as travas da tampa duas a duas para não permitir saída de vapor pela borda do aparelho. Ligar o aparelho na tomada;
- e) ligar a chave seletora de temperatura na posição “Máximo”;

- f) abrir imediatamente a válvula de escape de vapor;
- g) quando começar a sair vapor por essa válvula, esperar três minutos e fechá-la;
- h) nesse instante, o ponteiro do manômetro começará a subir;
- i) quando o ponteiro atingir a marca de 1Kg/cm^2 de pressão, a temperatura deverá estar em 121°C . Deixar nesta posição durante 20 minutos;
- j) se a pressão continuar subindo, coloque a chave seletora de temperatura da autoclave, na posição “média” e fique observando;
- k) depois de 20 minutos, o material já estará esterilizado;

Observação: Normalmente as autoclaves possuem uma chave seletora de temperatura que indica três posições “Mínima, Média e Máxima”, justamente para manter a pressão e temperatura dentro da faixa utilizada. Serve, também, para ligar e desligar o aparelho. Atualmente existem autoclaves microprocessadas que realizam as etapas, ou seja, o ciclo de esterilização e descontaminação automaticamente, após programação do usuário.

- l) desligar o aparelho e esperar que o ponteiro do manômetro atinja a posição “0”. Esse procedimento poderá ser acelerado abrindo-se lentamente a válvula de escape de vapor;

Atenção: Não abrir essa válvula de uma vez!

- m) quando o ponteiro do manômetro atingir a posição “0” e não estiver mais saindo vapor pela válvula, abrir a tampa do aparelho e retirar o material.

Nota: Existem vários modelos de autoclaves no mercado. É importante seguir sempre as instruções do fabricante.



Análises físico-químicas da água

Titulométricas
Colorimétricas



Análises Titulométricas

Alcalinidade total

A alcalinidade total de uma água é dada pelo somatório das diferentes formas de alcalinidade existentes, ou seja, é a concentração de hidróxidos, carbonatos e bicarbonatos, expressa em termos de carbonato de cálcio. Pode-se dizer que a alcalinidade mede a capacidade da água em neutralizar os ácidos.

A medida da alcalinidade é de fundamental importância durante o processo de tratamento de água, pois é em função do seu teor que se estabelece a dosagem dos produtos químicos utilizados.

Normalmente, as águas superficiais possuem alcalinidade natural em concentração suficiente para reagir com o sulfato de alumínio nos processos de tratamento. Quando a alcalinidade é muito baixa ou inexistente há a necessidade de se provocar uma alcalinidade artificial com aplicação de substâncias alcalinas, tal como cal hidratada ou barrilha (carbonato de sódio) para que o objetivo seja alcançado.

Quando a alcalinidade é muito elevada, procede-se ao contrário, acidificando-se a água até que se obtenha um teor de alcalinidade suficiente para reagir com o sulfato de alumínio ou outro produto utilizado no tratamento da água.

Método de determinação

Titulação com Ácido Sulfúrico

Material necessário

- a) pipeta volumétrica de 50 mL;
- b) frasco *Erlenmeyer* de 250 mL;
- c) bureta de 50 mL;
- d) fenolftaleína;
- e) indicador metilorange;
- f) mistura Indicadora de verde de bromocresol/vermelho de metila;
- g) solução de ácido sulfúrico 0,02 N;
- h) solução de tiosulfato de sódio 0,1 N.

Técnica

- a) tomar 50 mL da amostra e colocar no *Erlenmeyer*;
- b) adicionar 3 gotas da solução indicadora de verde de bromocresol/vermelho de metila;
- c) titular com a solução de ácido sulfúrico 0,02 N até a mudança da cor azul-esverdeada para róseo;
- d) anotar o volume total de H_2SO_4 gasto (V) em mL.

Cálculo:

$$\text{Alcalinidade total em mg/L de CaCO}_3 = V \times 20$$

- Notas:**
1. Usar 0,05 mL (1 gota) da solução de tiosulfato de sódio 0,1 N, caso a amostra apresente cloro residual livre.
 2. Utilizar essa técnica na ausência de alcalinidade à fenolftaleína.
 3. Caso haja alcalinidade à fenolftaleína, adicionar, antes da mistura indicadora de verde de bromocresol/vermelho

de metila 3 gotas de fenolftaleína e titule com H_2SO_4 0,02N até desaparecer a cor rósea formada. Em seguida, continuar no passo b) da técnica.

4. A alcalinidade à fenolftaleína só poderá ocorrer se o pH da amostra for maior que 8,2.

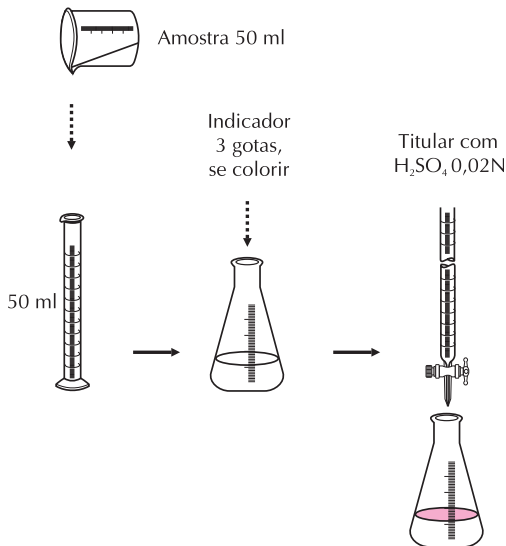
5. Na impossibilidade de conseguir a mistura indicadora de verde de bromocresol/vermelho de metila, usar o indicador de metilorange. Nesse caso o ponto de viragem no passo 3 da técnica será de amarelo para alaranjado.

6. O ponto de viragem quando se usa o indicador verde de bromocresol/vermelho de metila é mais nítido do que quando se usa metilorange.

7. A fórmula acima é para ser utilizada quando se usa uma amostra de 50 mL. Quando for usado 100 mL de amostra, o volume (V) passará a ser multiplicado por 10.

8. Fc – Fator de correção da solução titulante.

Fluxograma da análise



Gás carbônico livre

O gás carbônico livre existente em águas superficiais normalmente está em concentração menor do que 10 mg/L, enquanto que em águas subterrâneas pode existir em maior concentração.

O gás carbônico contido na água pode contribuir significativamente para a corrosão das estruturas metálicas e de materiais à base de cimento (tubos de fibro-cimento) de um sistema de abastecimento de água e por essa razão o seu teor deve ser conhecido e controlado.

Método de determinação

Titulação com Hidróxido de Sódio

Material necessário

- a) bureta de 50 mL;
- b) frasco *Erlenmeyer* de 250 mL;
- c) pipeta volumétrica de 100 mL;
- d) rolha de borracha;
- e) hidróxido de sódio 0,02N;
- f) fenolftaleína.

Técnica

- a) tomar 100 mL de amostra (sem agitar) em um *Erlenmeyer*;
- b) adicionar 10 gotas de fenolftaleína, se colorir, não contém CO₂, se não colorir, prosseguir;

- c) titular com a solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,02 N gota a gota até o aparecimento de leve coloração rósea persistente por pelo menos 30 segundos;
- d) anotar o volume (mL) de NaOH gasto (V).

Cálculo

$$V \times 10 \times Fc = \text{mg/L de CO}_2 \text{ livre}$$

Onde:

Fc = fator de correção.

Para calcular o CO₂ total aplicar a seguinte fórmula: mg/l

$$\text{CO}_2 \text{ total} = A + 0,44(2B + C)$$

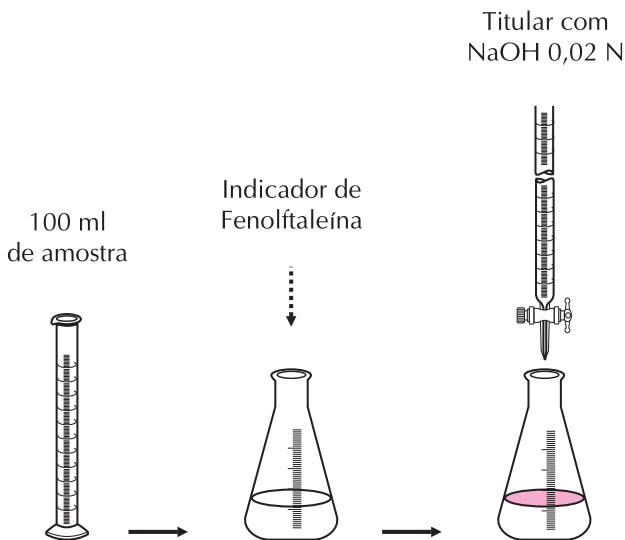
Onde:

A = mg/L CO₂ livre

B = Alcalinidade devido a bicarbonato

C = Alcalinidade devido a carbonato

Fluxograma da análise de CO₂



Cloretos

Geralmente, os cloretos estão presentes em águas brutas e tratadas em concentrações que podem variar de pequenos traços até centenas de mg/L. Estão presentes na forma de cloretos de sódio, cálcio e magnésio. A água do mar possui concentração elevada de cloretos que está em torno de 26.000 mg/L. Concentrações altas de cloretos podem restringir o uso da água em razão do sabor que eles conferem e pelo efeito laxativo que eles podem provocar. A Portaria nº 2.914/2011 do Ministério da Saúde estabelece o teor de 250 mg/L como o valor máximo permitido para água potável. Os métodos convencionais de tratamento de água não removem cloretos. A sua remoção pode ser feita por dessalização (osmose reversa) ou eletrodialise (troca iônica).

Método de determinação

Titulação com Nitrato de Prata

Material necessário

- a) bureta de 50 mL;
- b) becker de 250 mL;
- c) frasco *Erlenmeyer* de 250 mL;
- d) medidor de pH;
- e) proveta de 100 mL;
- f) solução-padrão de nitrato de prata 0,0141N;
- g) solução indicadora de cromato de potássio K_2CrO_4 ;
- h) hidróxido de sódio 1N;
- i) ácido sulfúrico 1N;
- j) cloreto de sódio 0,0141 N.

Técnica

- a) colocar 100 mL de amostra no *Erlenmeyer*;
- b) ajustar o pH entre 7 e 10, se necessário, com NaOH ou H_2SO_4 ;
- c) adicionar 1 mL da solução indicadora de K_2CrO_4 ;
- d) titular com a solução-padrão de nitrato de prata 0,0141 N até a viragem para amarelo avermelhado que é o ponto final da titulação;
- e) fazer um branco da mesma maneira que a amostra.

Cálculo:

$$\text{mg/L Cl} = \frac{(A - B) \times N \times 35.45}{\text{mL da amostra}}$$

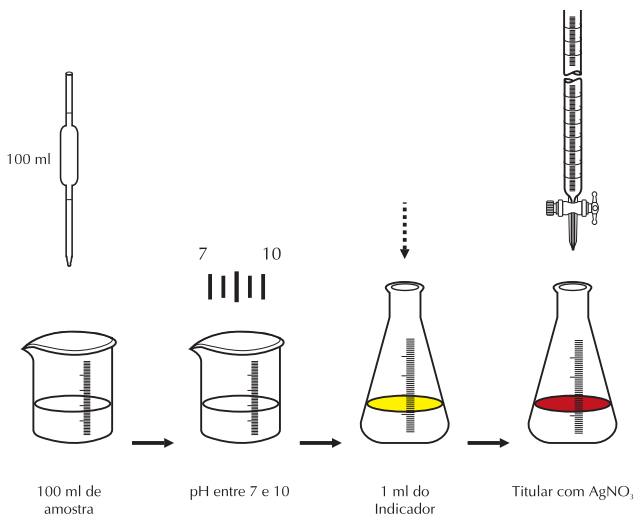
Onde:

A = mL do titulante gasto na amostra.

B = mL do titulante gasto no branco.

N = normalidade do titulante.

Fluxograma da análise de cloretos



Dureza total

A dureza total é calculada como sendo a soma das concentrações de íons cálcio e magnésio na água, expressos como carbonato de cálcio.

A dureza de uma água pode ser temporária ou permanente.

A dureza temporária, também chamada de dureza de carbonatos, é causada pela presença de bicarbonatos de cálcio e magnésio. Esse tipo de dureza resiste à ação dos sabões e provoca incrustações. É denominada de temporária porque os bicarbonatos, pela ação do calor, se decompõem em gás carbônico, água e carbonatos insolúveis que se precipitam.

A dureza permanente, também chamada de dureza de não carbonatos, é devida à presença de sulfatos, cloretos e nitratos de cálcio e magnésio, resiste também à ação dos sabões, mas não produz incrustações por serem seus sais muito solúveis na água. Não se decompõe pela ação do calor.

A Portaria MS nº 2.914/2011 estabelece para dureza total o teor de 500 mg/L em termos de CaCO_3 como o valor máximo permitido para água potável.

Método de determinação

Titulação com EDTA

Material necessário

- a) bureta de 50 mL;
- b) pipeta volumétrica de 25 mL;
- c) balão volumétrico de 50 mL;
- d) becker de 100 mL;

- e) frasco *Erlenmeyer* de 250 mL;
- f) solução-padrão de EDTA 0,01 M;
- g) solução tampão;
- h) indicador eriochrome black T;
- i) inibidor I - cianeto de sódio P.A em pó;
- j) inibidor II - sulfeto de sódio.

Técnica

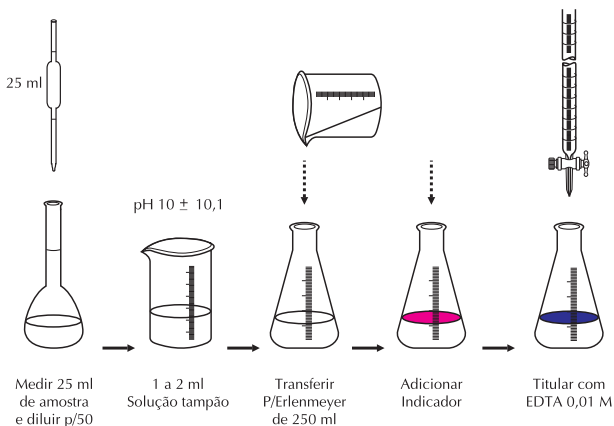
- a) tomar 25 mL da amostra e diluir para 50 mL com água destilada em balão volumétrico;
- b) transferir para um becker de 100 mL e adicionar 1 a 2 mL da solução tampão para elevar o pH a $10 \pm 0,1$;
- c) transferir para um frasco *Erlenmeyer* de 250 mL e adicionar aproximadamente 0,05 gramas do Indicador negro de eriocromo T;
- d) titular com EDTA 0,01M agitando continuamente até o desaparecimento da cor púrpura avermelhada e o aparecimento da cor azul (final da titulação);
- e) anotar o volume de EDTA gasto (mL);
- f) fazer um branco com água destilada;
- g) subtrair o volume de EDTA gasto na titulação do branco do volume de EDTA gasto na titulação da amostra. A diferença é o volume que será aplicado no cálculo.

Cálculo

$$\text{Dureza Total em mg/l CaCO}_3 = \frac{\text{ml de EDTA} \times 1000 \times F_c}{\text{ml de amostra}}$$

- Notas:**
1. A ausência de um ponto de viragem definido, geralmente, indica a necessidade de adição de um inibidor ou que o indicador está deteriorado.
 2. Não leve mais do que 5 minutos para a titulação, medido após a adição da solução tampão.
 3. Caso a dureza da água seja muito baixa, use amostra maior, 50 a 250 mL adicionando proporcionalmente maior quantidade de solução tampão, do inibidor e indicador.
 4. Se precisar usar o inibidor adicionar 20 gotas do inibidor II.
 5. F_c = Fator de correção do EDTA quando houver e for diferente de 1.

Fluxograma da análise



pH

O termo pH representa a concentração de íons hidrogênio em uma solução. Na água, esse fator é de excepcional importância, principalmente nos processos de tratamento. Na rotina dos laboratórios das estações de tratamento ele é medido e ajustado sempre que necessário para melhorar o processo de coagulação/floculação da água e também o controle da desinfecção. O valor do pH varia de 0 a 14. Abaixo de 7 a água é considerada ácida e acima de 7, alcalina. Água com pH 7 é neutra.

A Portaria nº 2.914/2011 do Ministério da Saúde recomenda que o pH da água seja mantido na faixa de 6,0 a 9,5 no sistema de distribuição.

Existem no mercado vários aparelhos para determinação do pH. São denominados de potenciômetros ou colorímetros. Neste manual, descreve-se o funcionamento básico de um potenciômetro, embora as instruções dos fabricantes devam ser seguidas.

Material necessário

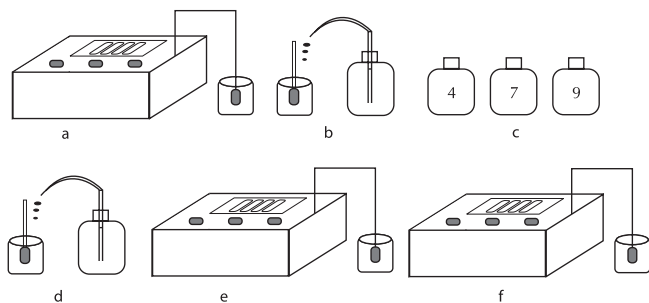
- a) potenciômetro;
- b) cubetas;
- c) frasco lavador;
- d) papel absorvente;
- e) soluções tampão de pH conhecido;

Técnica

- a) ligar o aparelho e esperar a sua estabilização;
- b) lavar os eletrodos com água destilada e enxugá-los com papel absorvente;

- c) calibrar o aparelho com as soluções padrão (pH 4 – 7 ou 10);
- d) lavar novamente os eletrodos com água destilada e enxugá-los;
- e) introduzir os eletrodos na amostra a ser examinada e fazer a leitura;
- f) lavar novamente e deixá-los imersos em água destilada;
- g) desligar o aparelho.

Fluxograma do teste



Análises colorimétricas

Cloro residual livre

O cloro é um produto químico utilizado na desinfecção da água. Sua medida é importante e serve para controlar a dosagem que está sendo aplicada e também para acompanhar sua evolução durante o tratamento.

A Portaria nº 2.914/2011 do Ministério da Saúde determina a obrigatoriedade de se manter, no mínimo, 0,2 mg/L de cloro residual livre ou 2 mg/L de cloro residual combinado em toda a extensão do sistema de distribuição (reservatório e rede). Também recomenda que o teor máximo de cloro residual livre em qualquer ponto do sistema de abastecimento seja de 2 mg/L. Os principais produtos utilizados são: hipoclorito de cálcio, cal clorada, hipoclorito de sódio e cloro gasoso.

Método de determinação

Comparação visual

Material necessário

- a) comparador colorimétrico;
- b) cubetas de vidro ou de acrílico;
- c) DPD para cloro livre em cápsula.

Técnica

- a) encher a cubeta com água da amostra até a marca de 5,0 mL;
- b) colocá-la na abertura do lado esquerdo do aparelho;
- c) encher outra cubeta até a marca de 5,0 mL com a amostra a ser testada;
- d) adicionar uma cápsula do reagente DPD na segunda amostra e misturar;
- e) colocar a cubeta com a amostra no compartimento do lado direito do aparelho;
- f) antes de 1 minuto fazer a leitura do teor de cloro.

Nota: Quando fizer a leitura posicionar o comparador (equipamento) contra uma fonte de luz como, por exemplo, uma janela, o céu ou uma lâmpada. Rotacione o disco até que se obtenha a mesma tonalidade nos dois tubos.

Resultado

O resultado é expresso em mg/L de Cloro Residual Livre.

Observação: Existem no mercado vários tipos de comparadores colorimétricos para medir o cloro residual, tanto com o uso de ortotolidina quanto o DPD. Em caso de dúvida consultar, sempre, as instruções do fabricante. O uso da ortotolidina está sendo evitado por tratar-se de substância cancerígena e não é mais recomendado pelo *Standard Methods*.

Cor

A cor da água é proveniente da matéria orgânica como, por exemplo, substâncias húmicas, taninos e também por metais como ferro e manganês e resíduos industriais fortemente coloridos. A cor, em sistemas públicos de abastecimento de água,

é esteticamente indesejável. A sua medida é de fundamental importância, visto que, água de cor elevada provoca a sua rejeição por parte do consumidor e o leva a procurar outras fontes de suprimento muitas vezes inseguras.

A Portaria MS nº 2.914/2011 estabelece para cor aparente o Valor Máximo Permitido de 15 (quinze) uH como padrão organoléptico para consumo humano.

Método de determinação

Método de Comparação visual

Material necessário

- a) tubos de Nessler forma alta de 50 mL;
- b) suporte de madeira;
- c) solução-padrão de Cloroplatinato de Potássio (500 Unidades de Cor).

Técnica

- a) preparar padrões de cor na faixa de 5 a 50 unidades de cor, medindo 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 6,0 e 7,0 mL da solução-padrão (500 unidades de cor) e colocar em tubos de Nessler de 50 mL;
- b) diluir com água destilada até a marca de 50 mL;
- c) medir 50 mL da amostra em outro tubo de Nessler e comparar com os padrões.

Resultado

O resultado é expresso em unidades de cor ou unidade Hazen (uH).

- Notas:**
1. A comparação deverá ser feita olhando os tubos verticalmente contra um fundo branco.
 2. Proteger os padrões contra evaporação e poeira.
 3. Quando a cor da amostra for maior do que 70 unidades, fazer diluição até que se obtenha resultado dentro da faixa coberta pelos padrões. Neste caso, o resultado deve ser multiplicado pelo fator de diluição.
 4. uH é a unidade de escala de Hazen (platina-cobalto, mgPt-Co/L).

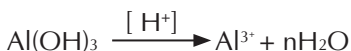
Alumínio

O teste de alumínio é indicado para estações de tratamento onde o sulfato de alumínio é usado como coagulante.

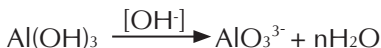
A dosagem incorreta desse coagulante é denotada pela quantidade significativa de alumínio que persiste na água tratada.

O hidróxido de alumínio – $\text{Al}(\text{OH})_3$ - formado na reação é anfótero. Sua ionização se processa em pH ácido ou básico, segundo as equações:

Em pH ácido:



Em pH básico:



Nas duas formas ele pode se solubilizar e atravessar os decantadores e filtros. A solubilização acontece com a correção do pH.

Quando o pH ótimo de floculação não está correto, o teor de alumínio da água tratada aumenta.

A Portaria nº 2.914/2011 do Ministério da Saúde estabelece que o padrão organoléptico para consumo humano é de 0,2 mg/L.

Método de determinação

A determinação do alumínio pode ser feita através dos métodos de Absorção Atômica, Eriocromo Cianina – R utilizando um fotômetro de filtro ou espectrofotômetro e também pelo método de Comparação Visual, utilizando-se tubos de Nessler.

Neste manual, descreve-se o método de Comparação Visual, considerando que a maioria dos laboratórios dos serviços de abastecimento de água nem sempre possui equipamentos como Espectrofotômetro de Absorção Atômica ou outro.

Método de Comparação Visual

Material necessário

- a) tubo de Nessler forma alta, de 50 mL;
- b) pipeta graduada de 1 mL;
- c) pipeta graduada de 5 mL;
- d) pipeta graduada de 10 mL;
- e) suporte para tubos de Nessler.

Reagentes

- a) ácido sulfúrico 0,02N;
- b) reagente tampão de acetato de sódio;
- c) eriocromo cianina-R - (corante);
- d) solução de trabalho do corante.

Técnica

- a) medir 25 mL de amostra ou uma porção diluída para 25 mL em um frasco *Erlenmeyer* de 125 mL;
- b) adicionar 3 gotas de metilorange e titular com ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,02N até ligeira coloração rosa pálido;
- c) anotar o volume gasto de ácido e descartar a amostra;
- d) medir novamente 25 mL de amostra ou uma alíquota diluída a 25 mL e transferir para um tubo de Nessler de 50 mL;
- e) adicionar à amostra o mesmo volume de ácido sulfúrico gasto no passo 2, acrescentando 1 mL em excesso;
- f) adicionar 1,0 mL de ácido ascórbico e misturar;
- g) adicionar 10,0 mL do reagente tampão e misturar;
- h) adicionar 5,0 mL da solução de trabalho do corante e misturar;
- i) imediatamente, diluir até a marca de 50 mL, com água destilada;
- j) misturar e deixar em repouso por 5 a 10 minutos e comparar a cor desenvolvida pela amostra com os padrões preparados da mesma maneira e na mesma hora.

Resultado

O resultado é expresso em mg/L de alumínio.

Observação: Nesse método não é necessário preparar o branco da amostra e ele também não é recomendado para amostras que contêm cor e turbidez porque pode levar a erros consideráveis.

Preparo dos Padrões

Material necessário

- tubo de Nessler forma alta, de 50 mL;
- pipeta graduada de 1 mL;
- pipeta graduada de 5 mL;
- pipeta graduada de 10 mL;
- suporte para tubos de Nessler.

Reagentes

- ácido sulfúrico 0,02N;
- reagente tampão de acetato de sódio;
- eriocromo cianina-R - (corante);
- solução de trabalho do corante;
- solução-padrão de alumínio (1 mL = 5 µg Al).

Técnica

Preparar os padrões na faixa de 0 a 0,5 mg/L, pipetando: 0,0 – 0,5 – 1,0 – 1,5 – 2,0 e 2,5 mL da solução-padrão (1 mL = 5 µg) e diluindo para 25 mL com água destilada em tubos de Nessler (ver quadro a seguir).

Tratar esses padrões do seguinte modo:

- adicionar 1,0 mL de ácido sulfúrico 0,02N e misturar;
- adicionar 1,0 ml de ácido ascórbico e misturar;
- adicionar 10 mL do reagente tampão e misturar;
- adicionar 5 mL da solução de trabalho do corante e misturar;

- e) levar o volume para 50 mL com água destilada e misturar;
- f) deixar em repouso por 5 a 10 minutos.

mL da solução-padrão	µg Al/mL	Volume de amostra	mg/L Al
0,0	0,0	25	0,0
0,5	2,5	25	0,1
1,0	5,0	25	0,2
1,5	7,5	25	0,3
2,0	10,0	25	0,4
2,5	12,5	25	0,5

- Notas:**
1. Para o padrão 0,0 mg/L, tomar 25 mL de água destilada e proceder igual aos outros.
 2. Preparar os padrões toda vez que for examinar a amostra.
 3. Caso o laboratório possua espectrofotômetro, fazer a leitura dos padrões a 535 nm e traçar a curva de calibração em papel semilogarítmico (% de transmitância x concentração). Nesse caso, não é necessária a preparação de todos os padrões quando examinar a amostra. Fazer apenas um ou dois para checar a curva de calibração do aparelho.

Turbidez

A turbidez da água é devido à presença de materiais sólidos em suspensão, que reduzem a sua transparência. Pode ser provocada também pela presença de algas, plâncton, matéria orgânica e muitas outras substâncias como o zinco, ferro, manganês e areia, resultantes do processo natural de erosão ou de despejos domésticos e industriais.

A turbidez tem sua importância no processo de tratamento da água. Água com turbidez elevada, e dependendo de sua natureza, forma flocos pesados que decantam mais rapidamente do que água com baixa turbidez. Também tem suas

desvantagens como no caso da desinfecção que pode ser dificultada pela proteção que pode dar aos micro-organismos no contato direto com os desinfetantes. É um indicador sanitário e padrão organoléptico da água de consumo humano.

No Brasil, a recentemente revisada norma de potabilidade da água, Portaria MS nº 2.914/2011, incorpora as preocupações internacionais relacionadas à transmissão de protozoários via abastecimento de água. O padrão de turbidez da água resultante de filtração rápida (tratamento completo ou filtração direta) foi reduzido para 0,5 UT e para água resultante de filtração lenta reduzido para 1,0 UT. Entretanto, o atendimento ao valor máximo permitido de 0,5 e 1,0 UT deverá ser cumprido em metas progressivas ao longo de quatro anos: em 25% das amostras analisadas mensalmente no primeiro ano, até em 95% no quarto ano (sempre com VMP de 1 UT no restante das amostras mensais).

A Portaria nº 2.914/2011 do Ministério da Saúde estabelece ainda o Valor Máximo Permitido de 1,0 UT para água subterrânea pós-filtração ou pré-desinfecção. E em qualquer ponto da rede de distribuição 5,0 UT como padrão organoléptico de potabilidade.

Existem equipamentos específicos para determinação da turbidez na água. Neste manual, apresenta-se a técnica de determinação da turbidez utilizando a metodologia nefelométrica.

Método Nefelométrico

Material necessário

- a) turbidímetro com nefelômetro;
- b) células de amostras de vidro incolor (quartzo),

- c) balão volumétrico de 100 mL;
- d) pipeta volumétrica de 5 mL;
- e) conjunto de filtração;
- f) filtros de membrana de 0,2 μm .

Reagentes

Água isenta de turbidez:

- a) passar água destilada através de um filtro de membrana de 0,02 μm de porosidade. Enxaguar o frasco de coleta pelo menos duas vezes com água filtrada e desprezar os primeiros 200 mL.

Suspensão estoque de turbidez – padrão primário:

Solução I

- Dissolver 1,0 g de sulfato de hidrazina (NH_2). H_2SO_4 em água destilada e diluir a 100 mL em balão volumétrico.

Advertência: sulfato de hidrazina é carcinogênico. Evitar inalação, ingestão e contato com a pele.

Solução II

- dissolver 10,0g de hexametilenotetramina (CH_2)₆N₄ em água destilada e diluir a 100 mL em balão volumétrico;
- misturar 5,0 mL da solução I e 5,0 mL da solução II. Deixar em repouso por 24 horas a $25 \pm 3^\circ\text{C}$. A turbidez dessa suspensão é de 4000 UT.
- transferir a solução-estoque para um frasco de cor âmbar ou outro frasco protegido da luz ultravioleta, para armazenagem. Fazer diluição dessa suspensão-estoque. A suspensão-estoque é estável por um ano quando corretamente armazenada.

Suspensão-padrão de turbidez:

- a) diluir 1,0 mL da solução-estoque para 100 mL com água isenta de turbidez. A turbidez desta suspensão é de 40 UT. Preparar diariamente.

Padrões de turbidez diluídos:

- a) diluir porções da suspensão-padrão de turbidez com água livre de turbidez de acordo com a faixa de interesse. Preparar diariamente.

Procedimento:

- a) calibrar o turbidímetro de acordo com as instruções do fabricante;
- b) medida de turbidez menor que 40 UT: agitar a amostra suavemente e esperar até que as bolhas de ar desapareçam e colocá-la na célula de amostra do turbidímetro; fazer a leitura da turbidez diretamente na escala do instrumento ou na curva de calibração apropriada.
- c) medida de turbidez acima de 40 UT: diluir a amostra com um ou mais volumes de água isenta de turbidez até que a turbidez da amostra diluída fique entre 30 e 40 UT. Fazer a leitura e multiplicar o resultado pelo fator de diluição.

Cálculo:

$$uT = \frac{A \times (B + C)}{C}$$

Onde:

UT = UTN = Unidade de Turbidez Nefelométrica.

A = Turbidez da amostra diluída.

B = Volume da diluição (mL).

C = Volume da amostra tomado para a diluição.

Exemplo: Uma porção de 10 mL da amostra foi diluída para 50 mL com água isenta de turbidez. Feita a leitura dessa amostra diluída obteve-se 20.

$$UT = \frac{20 \times (40 + 10)}{10} \therefore UT = 100$$

Temperatura

A temperatura está relacionada com o aumento do consumo de água, com a fluoretação, com a solubilidade e ionização das substâncias coagulantes, com a mudança do pH, com a desinfecção, etc.

Procedimento para determinação na água

Material necessário

- termômetro;
- becker de 250 mL.

Técnica

- coletar um pouco de água em um becker de 250 mL;
- mergulhar o termômetro na água;
- esperar até que o material dilatante (mercúrio) se estabilize;

- d) fazer a leitura com o bulbo do termômetro ainda dentro da água.

Fluoretos

A aplicação de flúor na água para consumo humano tem a finalidade de prevenir a cárie dental. Hoje, esse procedimento é considerado um processo normal de tratamento de água e o teor ótimo de flúor é parte essencial de sua qualidade. Em razão disso e outros fatores, é que o seu controle se faz necessário na estação de tratamento de água (ETA).

Existem vários métodos para determinação de flúor na água. Os três mais conhecidos são: o método *Spadns*, o *Scott-Sanchis* e o método do eletrodo específico para íons fluoretos.

Neste manual, descreve-se apenas o método *Scott-Sanchis*, que embora não seja o que dá maior grau de exatidão, atende às expectativas e é o de custo mais barato. É um método de comparação visual de cor feito em tubos de Nessler.

Procedimentos para análise de fluoretos

Método *Scott-Sanchis*

Material necessário

- a) tubo de Nessler de 100 mL;
- b) suporte para tubo de Nessler;
- c) termômetro;
- d) pipeta volumétrica de 5 mL;
- e) pipeta graduada de 10 mL.

Reagentes

- a) solução-padrão de fluoretos (1mL = 10 μgF^-);

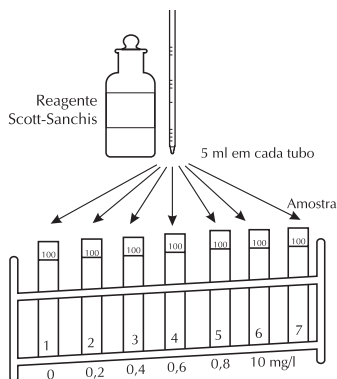
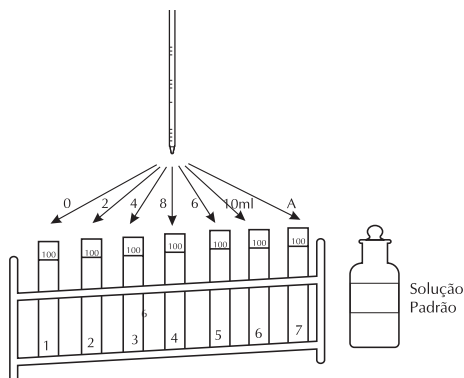
- b) reagente *Scott-Sanchis*;
- c) arsenito de sódio (0,5%).

Preparo dos padrões e da amostra:

- a) tomar 7 tubos de Nessler de 100 mL;
- b) encher o 1º tubo com água destilada (branco);
- c) pipetar no 2º tubo 2 mL da solução-padrão;
- d) pipetar no 3º tubo 4 mL da solução-padrão;
- e) pipetar no 4º tubo 6 mL da solução-padrão;
- f) pipetar no 5º tubo 8 mL da solução-padrão;
- g) pipetar no 6º tubo 10 mL da solução-padrão;
- h) encher o 7º tubo com 100 mL de amostra ou uma alíquota diluída a 100 mL. Caso haja cloro na amostra, removê-lo pela adição de 0,1 mL (2 gotas) da solução de arsenito de sódio para cada mg/L de cloro;
- i) diluir os padrões de 2 a 6 a 100 mL com água destilada;
- j) ajustar a temperatura dos padrões e da amostra;
- k) adicionar a cada tubo, inclusive no branco (1º tubo) 5 mL do reagente *Scott-Sanchis*;
- l) misturar e deixar em repouso por uma hora;
- m) decorrido uma hora da adição do reagente *Scott-Sanchis*, comparar a amostra com os padrões e expressar o resultado em mg F⁻/L.

Exemplo: Se a coloração desenvolvida pela amostra for semelhante ao padrão do tubo nº 5 essa amostra terá 0,8 mg/L de íon fluoreto. Caso a amostra desenvolva uma coloração que se situe entre dois padrões poderá ser feita a interpolação dos resultados. Ex.: leitura entre 0,6 e 0,8 expressar como 0,7 mg/L.

Fluxograma do teste



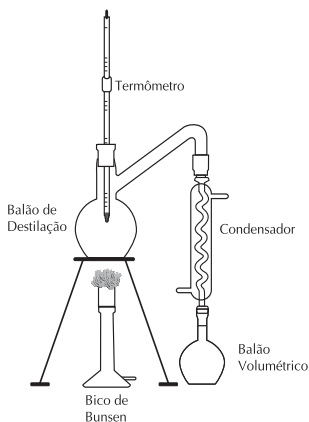
- Notas:**
1. A concentração dos padrões preparados (tubos de 2 a 6) correspondem a 0,2 – 0,4 – 0,6 – 0,8 – 1,0 mg/L de íon fluoreto, respectivamente.
 2. Poderão ser analisadas várias amostras simultaneamente com os padrões.
 3. Caso haja interferentes nas amostras em concentrações que possam alterar os resultados, essas amostras deverão ser destiladas.

Tabela de interferentes

Substâncias interferentes	Método <i>Scott-anclis</i>	Tipo de erro
Alcalinidade (CaCO_3)	400 mg/L	-
Alumínio (Al^{3+})	0,25 mg/L	--
Cloreto (Cl^-)	2000 mg/L	-
Ferro (Fe^{3+})	2,0 mg/L	+
Hexametáfosfato (NaPO_3) ₆	1,0 mg/L	+
Fosfato (PO_4^{-3})	5,0 mg/L	+
Sulfato (SO_4^{-2})	300 mg/L	+

Fonte: Adaptado de Mayer, 1971

Equipamentos para destilação:



Fazer primeiro uma destilação preliminar para remover qualquer contaminação de fluoreto e ajustar a reação ácido/água para as destilações subsequentes, do seguinte modo:

- a) colocar 400 mL de água destilada no balão de destilação;
- b) adicionar lentamente e com agitação 200 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4);
- c) adicionar algumas pérolas de vidro;
- d) conectar o balão ao condensador e começar a destilação;
- e) quando a temperatura atingir 180°C , parar a destilação e eliminar o destilado. O conjunto está pronto para a destilação da amostra.

Destilação da amostra

Adicionar à mistura de ácido que sobrou da destilação preliminar 300 ml de amostra, misturar cuidadosamente e destilar como anteriormente, até que a temperatura atinja 180°C . Nesse momento o destilado será igual a 300 ml.

- Notas:**
1. Não deixar que a temperatura ultrapasse 180°C , assim se evita que haja arraste de sulfato para o destilado.
 2. Quando amostras de alto conteúdo de cloretos são analisadas, adicionar ao balão de destilação 5 mg de sulfato de prata para cada mg de cloreto presente na amostra.
 3. Usar a solução de ácido sulfúrico várias vezes até que os contaminantes das amostras de água acumulados no frasco de destilação comecem a interferir no destilado. Quando isso acontecer, o melhor é desprezar o ácido e começar tudo novamente.

Importante: A dosagem de flúor na água para consumo humano é estabelecida em função da média das temperaturas máximas diárias da localidade observadas durante um determinado período.

Coleta e preservação de amostras para análise físico-químicas

Parâmetros	Recipientes	Volume mínimo (mL)	Preservação	Tempo máximo
Alcalinidade	Vidro ou polietileno	200	Refrigerar	24h/14d
CO ₂	"	100	Análise imediata	-
Dureza	"	100	HNO ₃ pH < 2	6 meses
Cloretos	"	100	Não requer	7 dias
Alumínio	"	-	HNO ₃ pH < 2	6 meses
Fluoretos	Polietileno	300	Não requer	28 dias
Temperatura	-	-	Análise imediata	-
Turbidez	Vidro ou Polietileno	200	Proteger da luz	24h
Cloro Residual	Vidro ou polietileno	500	Análise imediata	30min/2h
pH	"	200	Análise imediata	-
Cor	"	500	Refrigerar	24h

Fonte: Adaptado de APHA, 1985

Notas: 1. Os volumes aqui descritos são estimados. Na prática, deve-se coletar o volume necessário para realização das análises, até porque existem repetições de análises muitas vezes necessárias.

2. Quando preservar com ácido nítrico, usar 2 mL do ácido para cada litro de amostra.

3. Normalmente, nas Estações de Tratamento de Água - ETAs, as análises devem ser efetuadas imediatamente após a coleta. Não é de boa prática deixar as amostras por muito tempo para serem analisadas.

Ensaio de coagulação (*Jar-test*)

O ensaio de coagulação é um procedimento de rotina em estações de tratamento de água para determinar a dosagem dos produtos químicos utilizados no tratamento.

Podemos dizer que é uma simulação do que ocorre na ETA.

Para realizar esse ensaio é necessário que se conheça previamente as seguintes características da água bruta: cor, turbidez, alcalinidade, pH e temperatura; além de parâmetros hidráulicos da estação de tratamento, tais como: vazão, tempo de detenção no floculador, velocidade de sedimentação no decantador, etc.

O ensaio de coagulação não é uma operação muito simples, pois devem ser consideradas algumas variáveis do processo, como a cor e turbidez da água bruta; se a alcalinidade natural da água é suficiente, se o pH está dentro da faixa ótima de floculação, o tipo de coagulante empregado, etc.

Nesse exemplo prático, consideram-se apenas os parâmetros: cor, turbidez, pH e alcalinidade total, já que o objetivo principal do teste é a remoção da cor e turbidez da água, aplicando-se uma menor quantidade de coagulante.

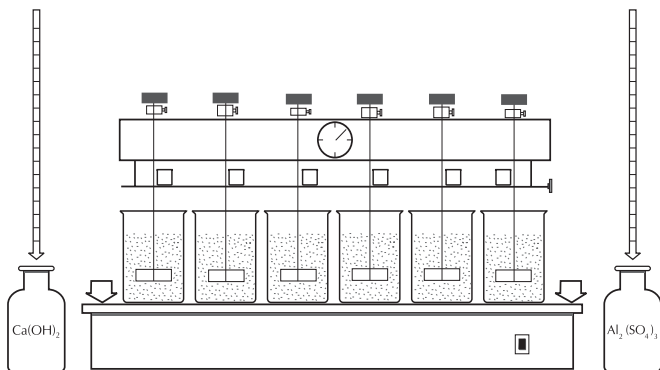
O produto químico utilizado é o sulfato de alumínio, sendo o mais comum.

Etapas do teste de coagulação que devem ser observadas

- fazer análise da amostra bruta – cor, pH, turbidez e alcalinidade total, temperatura;
- descobrir o pH ótimo de floculação;
- verificar a menor dosagem do coagulante no pH ótimo;
- observar a velocidade de sedimentação dos flocos;
- analisar o sobrenadante, verificando, principalmente, a remoção de cor e turbidez.

Material necessário

- aparelho de *Jar-test* conforme o da figura;
- becker forma baixa de 1000 mL;
- solução de sulfato de alumínio a 1%;
- solução de cal a 0,5%;
- pipetas graduadas de 5 e 10 mL.



Fonte: Adaptado de Cetesb, 1973

Procedimento 1 (Considerando que a água bruta tenha alcalinidade natural suficiente e tenha, também, um pH ótimo de floculação).

- a) colocar 6 beakers de 1 litro na plataforma do aparelho de *Jar-Test*;
- b) enchê-los com água bruta até a marca de 1000 mL;
- c) ligar o aparelho na velocidade máxima 100 r.p.m;
- d) adicionar simultaneamente nos beakers a quantidade de coagulante (sulfato de alumínio) que foi calculada para cada becker;
- e) deixar agitar nessa velocidade por 2 a 3 minutos (tempo de detenção na câmara de mistura rápida);
- f) reduzir a velocidade de agitação para 50 r.p.m durante 10 a 30 minutos (tempo de detenção nos floculadores);
- g) deixar as amostras decantar por algum tempo (esse tempo seria o correspondente à velocidade de sedimentação no decantador – 10 a 30 minutos);
- h) coletar o sobrenadante de todos os beakers e analisar os parâmetros necessários para verificar qual deles apresentou melhor resultado;
- i) normalmente o melhor resultado é aquele que apresentou maior redução de cor e turbidez e essa dosagem deverá ser a escolhida.

Procedimento 2 (Quando a água não tem alcalinidade natural suficiente e desconhece-se o pH ótimo de floculação.)

- a) colocar 6 beakers de 1 litro na plataforma do aparelho de *Jar-Test*;
- b) enchê-los com água bruta até a marca de 1000 mL;

- c) ligar o aparelho na velocidade máxima 100 r.p.m;
- d) estabelecer diferentes pH nos beckers usando álcali (cal hidratada);
- e) aplicar uma quantidade fixa de sulfato de alumínio em todos os beckers e proceder de acordo com os passos e) a i) do procedimento 1;
- f) medir o pH do frasco que apresentou melhor resultado;
- g) executar novo ensaio, fixando em todos os beckers o pH ótimo encontrado no item anterior;
- h) adicionar sulfato de alumínio em cada becker, variando a concentração em valores próximos (menor e maior) da dosagem utilizada na letra e);
- i) proceder de acordo com os passos de e) a i) do procedimento 1.

Notas: 1. Dependendo das alterações que a água bruta possa sofrer, consequência de enchentes, estiagens, alterações climáticas, etc., é recomendado sempre fazer novos testes para ajustar as dosagens dos coagulantes.

2. Quando a água bruta não tiver alcalinidade natural suficiente para reagir com o sulfato de alumínio, usar cal hidratada ou outro álcali para promover uma alcalinidade artificial.

3. Quando a água bruta não tiver um pH ótimo de floculação, criar essa condição, utilizando ácidos ou bases (álcalis).

4. O álcali mais usado é a cal hidratada.

5. Normalmente se usa sulfato de alumínio a 1% e cal a 0,5% para fazer os ensaios, pois facilita a medição de volumes utilizados no processo.

6. Para dosagens de sulfato de alumínio de 10 – 15 – 20 – 25 – 30 e 35 mg/L de uma solução a 1% são necessários os seguintes volumes: 1,0 mL, 1,5 mL, 2,0 mL, 2,5 mL, 3,0 mL e 3,5 mL, respectivamente. Para dosagem de cal, usa-se metade desses volumes em mL.

7. As velocidades de agitação, os tempos de agitação e o tempo de decantação dependem das dimensões das unidades de tratamento e da vazão de operação.
8. Consultar a tabela abaixo para estabelecer a quantidade de cal necessária em função do consumo de sulfato de alumínio.

Consumo de Sulfato de Alumínio mg/L $Al_2(SO_4)_3$	Alcalinidade teoricamente necessária mg/L ($CaCO_3$)	Alcalinidade natural desejada ($CaCO_3$)	Quantidade teórica de cal mg/L *	Quantidade de cal desejável mg/L *
10	5	7	3	4
15	7	10	4	6
20	9	14	5	8
25	12	17	7	10
30	14	20	8	12
40	18	27	10	15
50	25	34	13	19

Fonte: Técnicas de Abastecimento e Tratamento de Água - vol. II/Cetesb – SP

* se não houver alcalinidade natural.

Teoricamente, cada mg/L de sulfato de alumínio requer:

0,45 mg/L de alcalinidade natural;

0,25 mg/L de cal (CaO);

0,33 mg/L de cal como $Ca(OH)_2$;

0,48 mg/L de carbonato de sódio – Na_2CO_3 (barrilha).

Correção do pH da água tratada

A correção do pH da água tratada é um procedimento utilizado nas ETAs com a finalidade de prevenir o processo de corrosão das estruturas metálicas do sistema de distribuição que é provocado pela acidez da água, consequência da presença de gás carbônico dissolvido.

As águas superficiais possuem gás carbônico dissolvido. Esse gás carbônico pode ser proveniente da atmosfera, da respiração dos seres aquáticos e até da reação do sulfato de alumínio quando esse reage com a alcalinidade natural da água.

A correção do pH significa elevar o pH da água tratada até o pH de saturação que é o ponto onde não acontece mais o processo de corrosão. Esse pH não é igual para todas as águas e sua determinação pode ser feita no laboratório.

Método de determinação

Ensaio do mármore

Material necessário

- a) balão volumétrico de 1000 mL;
- b) medidor de pH;
- c) balança.

Reagente

Carbonato de cálcio

Técnica

- a) colocar 750 mL de água filtrada em um balão volumétrico de 1000 mL;
- b) determinar o pH e a alcalinidade (I) dessa água;
- c) adicionar 10 gramas de carbonato de cálcio ao balão;
- d) agitar por 1/2 hora e deixar decantar e filtrar;
- e) determinar o pH;

- f) agitar novamente o balão por mais 1/2 hora;
- g) deixar decantar e filtrar;
- h) determinar novamente o pH.

Repetir os procedimentos "e", "f" e "g" até pH constante. O pH de saturação será o pH constante encontrado. Determinar na última operação a alcalinidade (II).

Conclusão

Se a alcalinidade II > alcalinidade I => água corrosiva.

Se a alcalinidade II = alcalinidade I => água não corrosiva.

Se a alcalinidade II < alcalinidade I => água incrustante.

Determinação do teor de cloro ativo em uma solução de cloro (hipoclorito de sódio e hipoclorito de cálcio)

Material necessário

- a) frasco *Erlenmeyer* de 250 ou 500 mL;
- b) bureta de 50 mL;
- c) pipeta volumétrica de 1; 5 e 10 mL;
- d) balança de precisão.

Reagentes

- tiosulfato de sódio 0,1N ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$);
- iodeto de potássio (KI);
- ácido acético P.A;
- indicador de amido.

Técnica

- medir 1,0 mL da solução;
- dissolver em 50 mL de água destilada;
- adicionar 5,0 mL de ácido acético concentrado (glacial);
- adicionar 1,0 g de iodeto de potássio;
- titular com a solução de tiosulfato de sódio 0,1 N;
- anotar os mL de tiosulfato gastos.

Cálculo

$$\% \text{ de cloro} = \frac{(A-B) \times N \times 35,45}{P \times 10}$$

onde:

A = mL de tiosulfato gasto na titulação da amostra

B = mL de tiosulfato gasto no branco

N = Normalidade do tiosulfato

P = Peso ou volume do produto

Observação: Dependendo da concentração da solução a ser analisada usar um peso ou volume que não gaste mais do que a capacidade da bureta utilizada, de tiosulfato de sódio 0,1 N. Fazer um branco com água destilada.



**Preparação dos reagentes
utilizados nas análises
constantes nesse manual**



Reagentes para alcalinidade

Solução de ácido sulfúrico 0,02 N

Para preparar essa solução, faz-se primeiro uma solução 0,1N do seguinte modo:

- a) transferir, com pipeta, lentamente, 2,8 mL de ácido sulfúrico concentrado (96% $d=1,84$) para um balão volumétrico de 1000 mL contendo cerca de 500 mL de água destilada;
- b) completar o volume, até a marca, com água destilada e agitar;
- b) desta solução, medir, com pipeta volumétrica, 200 mL e transferir para um balão volumétrico de 1000 mL e completar o volume com água destilada. Essa solução é aproximadamente 0,02 N.

Solução de carbonato de sódio 0,02 N

Para preparar a solução de carbonato de sódio 0,02 N secar 1,5 a 2,0 gramas de Na_2CO_3 grau padrão primário, a 250°C por quatro horas. Esfriar em dessecador. Em seguida, pesar 1,060 gramas e dissolver em 250 mL de água destilada e completar o volume para 1000 mL com água destilada em balão volumétrico.

Padronização da solução

Colocar 50 mL de uma solução de carbonato de sódio 0,02 N em um frasco *Erlenmeyer* de 250 mL e adicionar 4 gotas do indicador metilorange. Titular com H_2SO_4 0,02N até a viragem do indicador para leve coloração avermelhada. Anotar o volume do ácido gasto.

Para calcular a normalidade correta, use a seguinte fórmula:

$$N = \frac{N' \times V'}{V}$$

onde:

N = normalidade do H₂SO₄ desejada

V = volume do ácido gasto na titulação

N' = normalidade do carbonato de sódio

V' = volume do carbonato de sódio usado

1 ml de H₂SO₄ 0,02 N = 1,0 mg de CaCO₃

Solução de tiosulfato de sódio 0,1 N

Pesar exatamente 25,0 gramas de Na₂S₂O₃.5H₂O e dissolver em um pouco de água destilada e completar o volume para 1000 mL em balão volumétrico.

Indicador metilorange

Pesar 0,100 gramas de metilorange e dissolver em 200 mL de água destilada.

Fenolftaleína

- dissolver 1 grama de fenolftaleína em um pouco de água destilada e diluir a 200 mL.
- adicionar gotas de NaOH 0,02 N até o aparecimento de leve coloração cor-de-rosa.

Mistura indicadora de verde de bromocresol/ vermelho de metila

Pesar 20 mg de vermelho de metila e 100 mg de verde de bromocresol e dissolver em 100 mL de água destilada ou álcool etílico a 95%.

Reagentes para CO₂

Hidróxido de sódio 0,02 N

Para preparar essa solução, faz-se primeiro uma solução 0,1N do seguinte modo:

- a) pesar rapidamente 4,2 gramas de hidróxido de sódio em lentilhas e transferir para um becker de 500 mL e dissolver em água destilada isenta de gás carbônico;
- b) transferir essa solução para um balão volumétrico de 1 litro e completar o volume até a marca. Essa solução é aproximadamente 0,1 Normal.

Padronizar com uma solução de Ácido Sulfúrico 0,1 normal do seguinte modo:

- a) tomar 100 mL de água destilada em um frasco *Erlenmeyer* de 250 mL;
- b) medir, com pipeta volumétrica ou bureta 10 mL da Solução de NaOH 0,1 Normal e transferir para o *Erlenmeyer* acima;
- c) juntar 3 a 4 gotas do Indicador de metilorange;
- d) titular com a solução de ácido sulfúrico 0,1 Normal;
- e) anotar os mL de H₂SO₄ gastos que devem ser 10 ou próximo de 10.

Se o volume de H_2SO_4 0,1 N gasto na titulação for maior ou menor que 10 mL, calcular o Fator de correção (Fc) da solução de NaOH utilizando a seguinte fórmula:

$$F_c (\text{NaOH}) = \frac{\text{ml } \text{H}_2\text{SO}_4 \times F_c (\text{H}_2\text{SO}_4)}{\text{mL de NaOH}}$$

Anotar o Fc no rótulo do frasco.

Preparação da solução de hidróxido de sódio N/50:

- transferir 200 mL da solução-estoque de NaOH 0,1 N para um balão volumétrico de 1 litro e completar com água destilada. Essa nova solução é aproximadamente N/50 (0,02 N).

Padronização da solução de NaOH 0,02 N:

- tomar 100 mL de água destilada em um frasco *Erlenmeyer* de 250 mL;
- medir, com pipeta volumétrica ou bureta 10 mL da solução de NaOH 0,02 N, e transferir para o *Erlenmeyer* acima;
- juntar 3 a 4 gotas do Indicador de metilorange;
- titular com a solução de ácido sulfúrico 0,02 N até a viragem do indicador;
- anotar o volume de H_2SO_4 gastos que devem ser em torno de 10 mL.

Cálculo do fator de correção do NaOH

$$F_c (\text{NaOH}) 0,02\text{N} = \frac{\text{mL de } \text{H}_2\text{SO}_4 \text{ de } 0,02 \text{ N} \times F_c (\text{H}_2\text{SO}_4)}{\text{mL de NaOH}}$$

- Notas:** 1. A viragem do indicador não é muito fácil de visualizar. Fazer um branco com 100 mL de água destilada para a comparação de cor no momento da viragem do indicador.
2. Ao adicionar o indicador, a solução fica amarelada e no final da titulação a solução fica levemente avermelhada.
3. Água isenta de CO_2 pode ser obtida pela fervura da água destilada durante 15 minutos e resfriada rapidamente até a temperatura ambiente.

Fenolftaleína

- dissolver 1 grama de fenolftaleína em um pouco de água destilada e diluir a 200 mL;
- adicionar gotas de NaOH 0,02N até o aparecimento de leve coloração cor-de-rosa.

Reagentes para análise de cloretos

Solução-Padrão de Nitrato de Prata 0,0141 N

- pesar 2,395 gramas de AgNO_3 e dissolver em um pouco de água destilada. Completar para 1 litro em balão volumétrico;
- padronizar contra uma solução de cloreto de sódio 0,0141N; 1,00 mL = 500 $\mu\text{g Cl}^-$;
- guardar a solução em frasco escuro.

Cloreto de sódio 0,0141 N

- dissolver 824,1 mg de cloreto de sódio seco a 140°C em água livre de cloretos e diluir para 1000 mL. 1,00 mL = 500 $\mu\text{g Cl}^-$.

Padronização da solução de nitrato de prata 0,0141 N

- usar 100 mL de amostra (NaCl 0,0141 N) ou uma porção diluída a 100 mL;
- ajustar o pH entre 7 e 10 com NaOH ou H₂SO₄ 1 N;
- adicionar 1 mL de K₂CrO₄ (cromato de potássio);
- titular com a solução de nitrato de prata 0,0141 N até o aparecimento da cor amarelo avermelhado;
- anotar o volume de nitrato de prata gasto na titulação;
- calcular o fator de correção do AgNO₃ 0,0141 N usando a seguinte fórmula:

$$F_c = \frac{100}{V_p}$$

onde:

F_c = Fator de correção

V_p = Volume de AgNO₃ gasto na titulação

Solução indicadora de cromato de potássio (K₂CrO₄)

- pesar 50 gramas de K₂CrO₄ e dissolver em um pouco de água destilada;
- adicionar solução de AgNO₃ 0,0141 N até formar um precipitado vermelho;
- deixar em repouso por 12 horas;
- filtrar e completar o volume para 1000 mL com água destilada.

Hidróxido de sódio (NaOH) 1N

- a) pesar 40 gramas de hidróxido de sódio e dissolver em um pouco de água destilada e diluir a 1 litro;
- b) guardar em frasco de polietileno ou vidro-pirex.

Ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1N

- a) em um becker de 1000 mL colocar cerca de 500 ml de água destilada;
- b) em seguida medir 28 mL de ácido sulfúrico concentrado e adicionar lentamente no becker acima, com agitação constante;
- c) deixar esfriar;
- d) transferir para um balão volumétrico de 1000 mL e completar o volume com água destilada, homogeneizando a seguir;
- e) armazenar em frasco de polietileno ou vidro pirex.

Notas: 1. Agitar com bastão de vidro.

2. Nunca adicionar água no ácido, e sim ácido na água.

Reagentes para análise de dureza

Solução-padrão de EDTA 0,01 M

- a) pesar 3,723 gramas de EDTA (sal di-sódio do ácido etilenodiamino tetraacético), dissolver em água destilada e diluir a 1000 mL;
- b) padronizar contra uma solução-padrão de carbonato de cálcio;
- c) guardar essa solução em frasco de polietileno.

Solução-padrão de cálcio

- pesar 1,0 grama de carbonato de cálcio anidro (CaCO_3) padrão primário e colocar em um frasco *Erlenmeyer* de 250 mL;
- adicionar aos poucos, com auxílio de um funil, HCl 1:1 até dissolver todo CaCO_3 ;
- adicionar 200 mL de água destilada e ferver por alguns minutos para eliminar o CO_2 ;
- esfriar e adicionar algumas gotas de vermelho de metila e ajustar para a cor laranja intermediária por adição de NH_4OH 3N ou HCl 1:1;
- transferir toda a mistura para um balão volumétrico de 1000 mL e completar o volume com água destilada (1 mL desta solução = 1,0 mg de CaCO_3).

Padronização da solução de EDTA 0,01 M

- medir 25 mL da solução-padrão de cálcio e diluir para 50 mL com água destilada em frasco *Erlenmeyer* de 125 mL;
- adicionar 1 a 2 mL da solução tampão para obter o pH em torno de $10 \pm 0,1$;
- adicionar 0,05 gramas do indicador eriochrome black T;
- titular com EDTA 0,01 M gota a gota até desaparecer a última coloração violácea e aparecer a cor azul indicadora do ponto final da titulação.

Cálculo:

$$F_c = \frac{25}{V_p}$$

onde:

Fc = Fator de Correção

Vp = Volume de EDTA gasto na titulação

Solução tampão para dureza

- a) pesar 16,9 gramas de cloreto de amônia (NH_4Cl) e dissolver em 143 mL de hidróxido de amônia concentrado (NH_4OH);
- b) adicionar 1,25 gramas do sal de magnésio do EDTA e diluir a 250 mL com água destilada.

Observação: Caso não disponha do sal de magnésio do EDTA, dissolver 1,179 gramas do sal sódico do EDTA e 780 mg do $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ou 644 mg do $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em 50 mL de água destilada e juntar à solução do item 1, completando o volume para 250 mL com água destilada.

Indicador negro Eriocromo T

- a) pesar 0,5 gramas de negro eriocromo T em um vidro de relógio;
- b) pesar 100 gramas de cloreto de sódio P. A. em um Becker;
- c) transferir os dois reagentes para um almofariz e triturar a mistura até se transformar em pó;
- d) armazenar em frasco de boca larga, bem fechado.

Inibidor I – cianeto de sódio P.A.

Usar 250 mg na solução a ser titulada.

Inibidor II – sulfeto de sódio

- a) pesar 5 gramas de sulfeto de sódio ($\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$) ou 3,7 gramas de $\text{Na}_2\text{S}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$;
- b) dissolver em 100 mL de água destilada;
- c) guardar em frasco de vidro bem fechado a fim de evitar sua deterioração por contato com o ar.

Solução padrão de cor

- a) pesar 1,246 gramas de cloroplatinato de potássio (K_2PtCl_6) e 1,0 grama de cloreto cobaltoso cristalizado ($\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$);
- b) dissolver em água destilada;
- c) acrescentar 100 mL de ácido clorídrico concentrado e diluir para 1000 mL com água destilada. (Essa solução equivale a 500 Unidades de Cor).

Reagentes para análise de alumínio

Ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,02N

- a) preparar igual ao utilizado para alcalinidade total.

Ácido ascórbico

- a) pesar 0,1g de ácido ascórbico e dissolver em um pouco de água destilada e completar o volume para 100 mL. Essa solução deverá ser preparada diariamente.

Reagente tampão

- a) pesar 136 g de acetato de sódio ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) e dissolver em água destilada. Adicionar 40 mL de solução de ácido acético 1N e diluir para 1000 mL com água destilada.

Solução de ácido acético 1N

- a) medir 58 mL de ácido acético concentrado e diluir para 1000 mL com água destilada.

Solução de eriocromo cianina-R (estoque)

- a) pesar e dissolver 150 mg do corante em cerca de 50 mL de água destilada. Ajustar o pH para 2,9 com ácido acético 1:1 (são requeridos aproximadamente 2 ml de ácido). Diluir para 100 mL com água destilada.

Solução de trabalho (eriocromo cianina-R)

- a) medir 10 mL da solução-estoque e diluir para 100 mL com água destilada. Essa solução é estável por 6 meses.

Solução indicadora de metilorange.

- a) pesar e dissolver 100 mg de metilorange em 200 mL de água destilada.

Solução Estoque de Alumínio (1mL = 500 µg Al)

- a) pesar 8,791 g de sulfato duplo de alumínio e potássio ($\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) e dissolver em um pouco de água destilada. Completar o volume para 1000 mL em balão volumétrico.

Solução-Padrão de Alumínio (1mL = 5 µg)

- a) diluir 10 mL da solução-estoque de alumínio para 1000 mL com água destilada, em balão volumétrico.

Preparar diariamente.

- Observação:**
- 1) Todos os reagentes devem ser preparados com água destilada isenta de alumínio.
 - 2) Todos os procedimentos que determinam diluir ou completar para x mL, fazer em balão volumétrico.

Solução de EDTA 0,01M

- a) pesar e dissolver 3,7 gramas de EDTA em 1000 mL de água destilada.

Reagentes para análise de fluoretos

Solução-padrão de fluoretos

- a) preparar uma solução-estoque, dissolvendo 221,0 mg de fluoreto de sódio anidro (NaF) em água destilada e diluir a 1000 mL (1 mL desta solução equivale a 100 μgF^-);
- b) diluir 100 mL da solução-estoque acima, para 1000 mL com água destilada (1 mL = 10 μgF^-).

Reagente zircônio-alizarina

- a) pesar e dissolver 300 mg de oxiclreto de zircônio ($\text{ZrOCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$), em 50 mL de água destilada e transferir para um frasco volumétrico de 1000 mL com tampa;
- b) pesar e dissolver 70 mg de monossulfato de alizarina em 50 mL de água destilada;
- c) colocar a solução 2 na solução 1, lentamente e com agitação;
- d) a solução resultante deverá ficar em repouso por alguns minutos.

Mistura ácida

- a) medir 101 mL de ácido clorídrico concentrado (HCl) e diluir para aproximadamente 400 mL com água destilada;

- b) adicionar cuidadosamente 33,3 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) em aproximadamente 400 mL de água destilada;
- c) após esfriar, misturar as duas soluções ácidas.

Reagentes *Scott-Sanchis*

- a) adicionar a mistura ácida à solução reagente *Zirconil-alizarina*;
- b) completar o volume para 1000 mL com água destilada e misturar;
- c) guardar em frasco âmbar e em lugar protegido da incidência de luz direta. Esse reagente é estável por 6 meses.

Arsenito de sódio

- a) pesar 5 g de arsenito de sódio (NaAsO_3) e dissolver em um pouco de água, diluir para 1 litro com água destilada (usar 1 gota para cada 0,1 mg de cloro existente na amostra).

Observação: essa solução é tóxica – evitar ingestão e contato com a pele.

Reagentes para análise do teor de cloro ativo

Tiosulfato de sódio 0,1 N – Dissolver 25 gramas de tiosulfato de sódio $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ em 1 litro de água destilada fervida recentemente. Armazenar durante duas semanas e padronizar com dicromato de potássio $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 0,1 N.

Notas: 1. Usar água destilada fervida na preparação do tiosulfato.
2. Adicionar alguns mililitros de clorofórmio (± 5 mL) para minimizar a decomposição bacteriana da solução de tiosulfato.

Dicromato de potássio 0,1 N – Pesar 4,904 gramas de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$), dissolver em um pouco de água destilada e em seguida diluir para 1 litro. Armazenar em frasco de vidro com tampa de vidro.

Solução indicadora de amido – Pesar 5,0 gramas de amido. Adicionar um pouco de água destilada até formar uma pasta. Em seguida dissolver essa pasta em um litro de água destilada fervente. Deixar em repouso durante uma noite. Usar o líquido sobrenadante preservando-o pela adição de 1,25 gramas de ácido salicílico.

Padronização da solução de tiosulfato de sódio 0,1N.

Material necessário

- bureta de 50 mL;
- frasco *Erlenmeyer* de 250 mL;
- pipeta graduada de 1 mL;
- pipeta volumétrica de 10 mL.

Procedimento:

- colocar 80 mL de água destilada no *Erlenmeyer*;
- adicionar, com agitação constante, 1 mL de H_2SO_4 concentrado e 10 mL de dicromato de potássio 0,1 N;
- adicionar 1,0 grama de Iodeto de potássio;
- deixar a mistura reagir durante 6 minutos no escuro;

- e) titular com a solução de tiosulfato de sódio até o aparecimento da coloração amarela clara;
- f) adicione 1,0 mL da solução de amido e continue a titulação até o desaparecimento da cor azul formada.

Cálculo

$$\text{Normalidade} = \frac{1}{\text{ml de tiosulfato consumido}}$$

Regras gerais para corrigir as soluções tituladas

A correção das soluções tituladas é um procedimento muito utilizado em laboratório. Serve para aferir o grau de exatidão das soluções padronizadas. Periodicamente, o técnico deve verificar a exatidão dessas soluções para que os resultados das análises sejam os mais corretos possíveis.

Regra 1

Quando o volume consumido de solução a titular for igual ao volume da solução-padrão tomado para a titulação, significa que aquela está exata.

Exemplo: 10 mL de HCl 0,1N foram consumidos para titular 10 mL de Na₂CO₃ 0,1N.

Regra 2

Quando o volume consumido da solução a titular for menor que o volume do padrão tomado, significa que a solução a titular encontra-se mais concentrada. Nesse caso, faz-se a correção do seguinte modo:

Exemplo: Foram gastos na titulação de 10 mL de Na_2CO_3 0,1N; 8,3 mL de HCl 0,1 N. Aplicando-se a seguinte equação, temos: $8,3 : 10 :: x : 1000$.

Efetuada-se os cálculos, tem-se:

$$10x = 8,3 \times 1000$$

$$x = 8300/10 \text{ .. } x = 830 \text{ mL}$$

Logo, mede-se 830 mL da solução a titular e completa-se a 1000 mL com água destilada. Fazer nova titulação para verificar o rigor da dosagem, que não deve ficar abaixo de 9,9 e acima de 10,1 mL.

Regra 3

No caso em que o volume da solução a titular for maior do que o da solução-padrão, significa que a solução a titular encontra-se mais diluída. Nesse caso, calcula-se o fator de correção da seguinte forma:

Exemplo: 10,5 mL de uma solução de HCl 0,1N foram consumidos para titular 10 mL de uma solução-padrão de Carbonato de Sódio.

Aplicando-se a seguinte equação, temos:

$$10,5 : 10 :: 1 : x$$

Efetuada-se os cálculos temos:

$$10 = 10,5x \quad x = 10/10,5$$

$$x = 0,9524$$

Logo o Fator de correção da solução é 0,9524.

Limpeza de material de vidro no laboratório

A precisão e exatidão das análises estão, além de outros fatores, também, ligadas ao uso do material de vidro no laboratório.

Faz-se, portanto, necessário que toda a vidraria esteja perfeitamente limpa, livre de impurezas, tais como sabões,

detergentes e outros produtos que podem ficar aderidos às paredes dos recipientes.

A vidraria em geral pode ser lavada simplesmente com água, água e sabão neutro ou por meio de soluções especiais, como a solução sulfo-crômica, por exemplo.

Procedimento de lavagem

Para vidraria nova:

- a) a maioria dos materiais de vidros novos é levemente alcalina, portanto esses materiais devem ser colocados de molho por algumas horas em solução de ácido clorídrico ou nítrico a 1% antes de serem lavadas.

Para vidraria usada:

- a) os materiais de vidro já utilizados com meio de cultura (placas de Petri, tubos de cultura), devem ser esterilizados antes de serem lavados. Depois devem ser colocados em um recipiente grande, com água contendo 1 a 2 % de sabão ou detergente, deixando ferver por 30 minutos. Em seguida devem ser enxaguados com água corrente, esfregados com detergentes neutros e enxaguados novamente;
- b) em determinadas situações em que os materiais de vidro não puderem ser limpos com os detergentes comuns ou outros produtos de limpeza, faz-se necessário o uso de uma mistura constituída de ácido sulfúrico e solução saturada de dicromato de sódio, preparada do seguinte modo: misturar 1 litro de ácido sulfúrico concentrado com 35 mL da solução saturada de dicromato de sódio. Essa solução não deve ser usada para lavagem de vidrarias utilizadas para análise de cromo.

- Notas:**
1. a solução acima é ácida e ataca a pele;
 2. não permitir contato da mão com a solução;
 3. a solução ataca os tecidos. Evitar contato com a roupa;
 4. não lavar com essa solução vidros colados como cubetas utilizadas em espectrofotômetros, cubetas de turbidez, etc.;
 5. depois de passar essa solução na vidraria, enxaguá-la com bastante água e em seguida com água destilada.

Relação de materiais de laboratório de análise de água

Equipamentos

- a) autoclave vertical, capacidade para 18, 24, 48 ou 72 litros, 110/220 volts;
- b) estufa para cultura bacteriológica, com termostato regulável na faixa de 30 a 65°C, tamanho 45x45x40 cm de largura, profundidade e altura, respectivamente, equipada com bandeja regulável para três posições;
- c) balança analítica, elétrica, capacidade para 160 g, sensibilidade de 1/100 mg, cinco casas decimais, 110/220 volts;
- d) balança de precisão, com dupla escala, pesagem máxima 200 gramas, sensibilidade de 0,1 g;
- e) destilador de água, capacidade para 2 litros/hora, 110/220 volts;
- f) banho-maria capacidade para 50 tubos de ensaio, com termostato regulável na faixa de 35 a 65°C, 110/220 volts;
- g) banho de vapor, para 6 provas simultâneas, construído em chapa metálica, com termostato regulável em até 6 posições, 110/220 volts;

- h) capela para exaustão forçada de gases, com motor elétrico de 1/3 de HP, 110/220 volts;
- i) chapa aquecedora com termostato regulável, tamanho x, 110/220 volts;
- j) estufa para esterilização e secagem, tamanho 50x40x50 cm de largura, profundidade e altura, respectivamente, com termostato regulável até 300°C, e bandeja regulável para 3 posições, 110/220 volts;
- k) aparelho de *Jar-Test* para 6 provas simultâneas, com regulador de velocidade de 0 a 100 rpm, com base de vidro ou acrílico iluminada, 110/220 volts;
- l) medidor de cloro residual, portátil, com disco de cor, escala de 0 a 3,5 mg/L, para uso com reagente DPD;
- m) termômetro bacteriológico, com escala de 0 a 60°C, com divisões de 1°C;
- n) termômetro químico com escala de 0 a 300°C, com divisão de 1°C;
- o) turbidímetro, completo;
- p) medidor de pH digital, de bancada, faixa de medição de 0 a 14, com eletrodo, 110/220 volts;
- q) medidor de pH, digital, portátil, faixa de medição de 0 a 14, com eletrodo, funcionamento à bateria de 9 volts;
- r) lanterna para identificação de *E. Coli*, com lâmpada fluorescente ultravioleta, 6 watts, 365 nm, recarregável, portátil, 110 volts;
- s) bico de Bunsen;
- t) deionizador capacidade para 50 litros/hora – 110/220 volts.

Vidraria

- a) tubo para cultura, sem borda, tamanho 150 x 16 mm;
- b) tubo para cultura, sem borda, tamanho 180 x 18 mm;
- c) tubo para cultura, sem borda, tamanho 125 x 15 mm;
- d) tubo de Nessler, forma alta, capacidade de 50 e 100 mL;
- e) tubo de Durhan, tamanho 40 x 5 mm;
- f) balão volumétrico, fundo chato, com tampa de teflon ou vidro esmerilhado, classe "A" capacidade de 50, 100, 250, 500 e 1000 mL;
- g) becker forma baixa, graduado, capacidade de 50, 100, 250, 500 e 1000 mL;
- h) bureta com torneira de vidro ou teflon, gravação permanente, classe "A" capacidade de 10, 25, e 50 mL;
- i) pipeta sorológica, codificada por cores, com bocal para algodão, gravação permanente, capacidade de 1, 2, 5 e 10 mL;
- j) pipeta de MOHR, codificada por cores, bocal e bico temperados, gravação permanente, capacidade de 1, 2, 5 e 10 mL;
- k) pipeta volumétrica, codificada por cores, bocal e bicos temperados, gravação permanente, classe A, capacidade de 10, 25, 50 e 100 mL;
- l) frasco de vidro para reagentes, boca larga, cor branca, com rolha de vidro esmerilhada intercambiável, capacidade de 125 mL;
- m) proveta graduada a conter, com base hexagonal de vidro, gravação permanente, classe "A", capacidade de 10, 25, 50, 100, 250, 500 e 1000 mL;
- n) frasco *Erlenmeyer*, boca larga reforçada, graduado, capacidade de 125, 250 e 500 mL;

- o) funil analítico, ângulo de 60° , liso, haste curta, com diâmetro de 50, 75 e 100 mm;
- p) funil analítico, ângulo de 60° , raiado, haste longa, com diâmetro de 50, 75 e 100 mm;
- q) funil analítico, ângulo de 60° , raiado, haste curta, com diâmetro de 50, 75 e 100 mm;
- r) Placa de Petri de vidro, transparente, tamanho 100 x 15 mm;
- s) conjunto de destilação para fluoretos, constituído de balão de fundo chato de 1000 mL com saída lateral para condensador Graham, com juntas esmerilhadas;
- t) bastão de vidro de 30 cm de comprimento x 5 mm de diâmetro.

Materiais diversos

- a) alça de platina calibrada com 3 mm de diâmetro;
- b) cabo de Kolle para alça de platina;
- c) algodão em rama para bacteriologia;
- d) lápis dermográfico;
- e) caldo lactosado, desidratado, embalagem de 100 ou 500 gramas;
- f) caldo lactosado, verde brilhante bile a 2%, desidratado, embalagem de 100 ou 500 gramas;
- g) meio *ENDO MF*, para coli total, embalagem de 100 ou 500 gramas;
- h) meio *EC MF*, para coli fecal, embalagem de 100 ou 500 gramas;
- i) púrpura de bromocresol, embalagem de 5 gramas;

- j) estante para tubo de ensaio, com capacidade para 15 tubos de 180 x 18 mm, de madeira ou plástico resistente;
- k) estante para tubo de ensaio com capacidade para 40 tubos de 180 x 18 mm, em arame resistente à autoclavação;
- l) caldo lauril triptose, desidratado, embalagem de 100 ou 500 gramas;
- m) meio EC, desidratado, embalagem de 100 ou 500 gramas;
- n) *Plate count agar*, desidratado, embalagem de 100 ou 500 gramas;
- o) substrato cromogênico para determinação enzimática qualitativa de coliformes totais e *E. Coli* em amostras de 100 ml de água, caixa com 20 ampolas;
- p) cesto de arame com capacidade para 50 tubos de ensaio de 180 x 18 mm, resistente à autoclavação;
- q) suporte para tubo de Nessler de 50 e 100 mL, em madeira ou alumínio, capacidade para 8 tubos;
- r) papel de alumínio, medindo 7,5 m de comprimento x 30 cm de largura;
- s) algodão hidrófilo, pacote de 500 gramas;
- t) Placa de Petri, de plástico, esterilizada, de 47 mm de diâmetro;
- u) filtros estéreis de 47 mm de diâmetro, 0,45µm de porosidade, com cartão absorvente, embalagem com 100 unidades;
- v) conjunto porta-filtro de membrana, construído em aço inoxidável, com dispositivo para esterilização no campo;
- w) pinça de aço inoxidável, de 10 cm de comprimento.

Biossegurança em laboratório

Neste manual, constam apenas os principais procedimentos relacionados à biossegurança em laboratório que deverão ser observados pelos técnicos que atuam na área.

Procedimentos de ordem pessoal:

- a) não pipetar nenhum tipo de líquido com a boca;
- b) usar óculos de proteção nos ambientes do laboratório onde o uso é obrigatório;
- c) não levar as mãos à boca ou aos olhos quando estiver manuseando produtos químicos;
- d) não guardar alimentos na geladeira do laboratório;
- e) não fazer refeições dentro do laboratório;
- f) não fumar no interior do laboratório;
- g) usar avental/jaleco de manga comprida com elástico no punho, sempre. E retirá-lo ao sair do laboratório;
- h) lavar cuidadosamente as mãos com bastante água e sabão, antes de fazer qualquer refeição;
- i) não manipular produtos tóxicos sem antes se certificar de sua toxicidade.

Procedimentos relacionados ao laboratório

- a) manter as bancadas do laboratório sempre limpas e livres de materiais estranhos ao trabalho;
- b) retirar da bancada os materiais, amostras e reagentes empregados no trabalho, logo após utilizá-los;
- c) limpar imediatamente qualquer derramamento de produtos e reagentes com os cuidados necessários;

- d) ao esvaziar um frasco de reagente, fazer a limpeza prévia com água, antes de colocá-lo para lavagem;
- e) rotular imediatamente qualquer reagente ou solução preparada e as amostras coletadas;
- f) não jogar produtos corrosivos concentrados na pia; descartá-los somente após serem diluídos;
- g) na preparação de soluções ácidas nunca adicionar água no ácido e sim ácido na água;
- h) não jogar na pia líquidos inflamáveis e/ou voláteis; estocá-los em recipientes adequados;
- i) dispor os cilindros com gases em ambiente externo ao laboratório, devidamente acondicionados;
- j) usar câmara de fluxo laminar (cabine de segurança biológica) para manipulação de meios de cultura e pesquisa microbiológica;
- k) usar câmara de exaustão (cabine de segurança química) com lavador de gases quando manusear líquidos inflamáveis e/ou voláteis.

Procedimentos para o uso de vidrarias

- a) não utilizar materiais de vidro trincados;
- b) usar luvas de amianto para manusear peças de vidro que estejam quentes;
- c) não deixar frascos quentes sem proteção sobre as bancadas do laboratório, colocá-los sobre placas de amianto;
- d) não aquecer recipiente de vidro em chama direta, usar tela de amianto;
- e) não pressurizar recipientes de vidro;

- f) não esquecer vidraria em aquecimento – usar despertador, sempre;
- g) não usar frascos para amostras que não estejam perfeitamente limpos e sem certificar-se de sua adequação aos serviços a serem executados;
- h) usar luvas de pelica e óculos de segurança, sempre que atravessar ou remover rolhas de borracha ou cortiça, de tubos de vidro ou termômetros;
- i) remover tampas de vidro emperradas;
- j) remover cacos de vidro – usar pá de lixo e escova;
- k) usar protetor facial e luvas de pelica quando agitar solventes voláteis em frascos fechados.

Procedimento para uso de equipamentos em geral

- a) antes de utilizar qualquer equipamento ler as instruções de operação fornecidas pelo fabricante;
- b) nunca ligar equipamentos elétricos sem antes verificar a voltagem;
- c) não instalar nem operar equipamentos elétricos sobre superfícies úmidas;
- d) não deixar equipamentos elétricos ligados no laboratório fora do expediente, exceto os de energia constante como geladeiras, estufas, etc.;
- e) combater fogo em equipamentos elétricos somente com extintor de CO₂;
- f) manter os equipamentos de segurança em locais de fácil acesso e ao alcance de todos os funcionários do laboratório, tais como:
 - extintor de incêndio;

- chuveiro de emergência;
- lavador de olhos;
- cobertor de segurança;
- máscara contra gases;
- máscaras e óculos de segurança, etc.

Apêndice A

Coleta e preservação de amostras para contagem de células de cianobactérias e cianotoxinas



Introdução

No final da elaboração deste manual, já revisado e adaptado para a atual legislação sobre qualidade de água para consumo humano, foram incluídos os procedimentos básicos de coleta de amostras de água para a identificação e contagem de cianobactérias em mananciais de abastecimento.

Tal iniciativa deve-se à crescente eutrofização dos ambientes aquáticos que tem sido produzida principalmente por atividades humanas, causando um enriquecimento artificial desses ecossistemas. As principais fontes desse enriquecimento têm sido identificadas como as descargas de esgotos domésticos e industriais dos centros urbanos e a poluição difusa originada nas regiões agricultáveis. Essa eutrofização artificial produz mudanças na qualidade da água, incluindo: a redução de oxigênio dissolvido, a perda das qualidades cênicas, ou seja, das características estéticas do ambiente e seu potencial para lazer, a morte extensiva de peixes e o aumento da incidência de florações de microalgas e cianobactérias, com consequências negativas sobre a eficiência e custo de tratamento da água, quando se trata de manancial de abastecimento público. Essas florações ou “blooms” se caracterizam pelo intenso crescimento desses micro-organismos na superfície da água, formando uma densa camada de células com vários centímetros de profundidade, com consequências relacionadas à saúde pública.

Coleta e preservação de amostras para contagem de células de cianobactérias

Material necessário

- a) frasco de polietileno ou vidro âmbar, com capacidade para 1000 mL;

- b) garrafa de Van Dorn ou similar;
- c) solução de lugol;
- d) solução de Formaldeído a 40%;
- e) equipamentos de proteção individual (luvas, botas e máscara).

Definição do ponto de coleta da amostra

- a) quando houver floração de Cianobactérias, a amostra deverá ser coletada no ponto de maior concentração da mesma;
- b) quando não houver floração de Cianobactérias, a amostra deverá ser coletada no ponto de captação da ETA, no manancial.

Identificação das amostras

- a) todas as amostras deverão ser identificadas por uma numeração no próprio frasco de coleta, referente às fichas de coleta;
- b) as fichas de coleta acompanharão as amostras e deverão conter os seguintes dados: nome e endereço do interessado, nome do manancial, tipo de manancial, data e hora da coleta, descrição do local de coleta – GPS, nome do coletor, ocorrência de fenômenos.

Procedimento de coleta - amostra de superfície

- a) fazer ambiente no frasco de coleta por pelo menos três vezes;
- b) encher o vasilhame com a amostra coletada, deixando um volume de ar na parte superior do frasco;
- c) coletar no mínimo 1000 mL da amostra para água bruta;
- d) coletar 4.000 mL da amostra para água tratada.

Observação: Coletar somente em frasco âmbar.

Preservação, acondicionamento e transporte da amostra

- a) ambientes oligotróficos: preservar as amostras em solução Lugol (adicionar 1mL/L);
- b) ambientes eutrofizados: preservar as amostras em solução Formaldeído à 40%: (adicionar 2mL/L);
- c) refrigerar a amostra a 4°C;
- d) acondicionar em caixas térmicas e encaminhar ao laboratório em no máximo 08 horas.

Coleta e preservação de amostras para determinação de cianotoxinas

Material utilizado

- a) frasco de polietileno ou vidro âmbar, com capacidade para 1000 mL;
- b) equipamentos de proteção individual (luvas, botas e máscara).

Definição do ponto de coleta da amostra

- a) quando houver floração de Cianobactérias, a amostra deverá ser coletada no ponto de maior concentração da mesma;
- b) quando houver floração de Cianobactérias e a contagem de células ultrapassar a 20.000 células/mL, deverão ser coletadas amostras no manancial e na saída da ETA, segundo determinação da Portaria MS nº 2.914/2011;
- c) quando não houver floração de Cianobactérias, a amostra deverá ser coletada no ponto de captação da ETA, no manancial.

Identificação das amostras

- a) todas as amostras deverão ser identificadas por uma numeração no próprio frasco de coleta, referente às fichas de coleta;
- b) as fichas de coleta acompanharão as amostras e deverão conter os seguintes dados: nome e endereço do interessado, nome do manancial, tipo de manancial, data e hora da coleta, descrição do local de coleta – GPS, nome do coletor e ocorrência de fenômenos.

Procedimentos de coleta – Fração Particulada

Material necessário

- a) fazer ambiente no frasco de coleta por pelo menos três vezes;

- b) encher o vasilhame com a amostra coletada, deixando um volume de ar na parte superior do frasco;
- c) coletar no mínimo 1000 mL da amostra de água bruta;
- d) coletar 4000 mL da amostra de água tratada;

Preservação, acondicionamento e transporte da amostra

- a) refrigerar a amostra a 4°C;
- b) acondicionar em caixas térmicas e encaminhar ao laboratório em no máximo 08 horas.

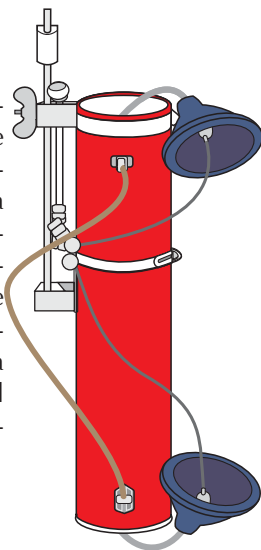
Observação: Caso a amostra não possa ser enviada ao Laboratório no mesmo dia da coleta, a mesma deverá ser congelada e enviada ao laboratório no prazo máximo de 15 dias.

Lavagem dos frascos

Sugere-se para lavar os frascos de coleta e acondicionamento de amostras para análise de cianotoxinas o seguinte procedimento: deixá-los previamente imersos em sabão neutro por 12 horas, depois lavar exaustivamente com água e colocar em solução de HCl a 5% durante 12 horas, lavar novamente e exaustivamente com água destilada e secar. Caso o frasco já tenha sido utilizado anteriormente para coleta de amostras contendo cianobactérias, deixá-lo em uma solução de água sanitária por 30 minutos antes de passar pelo sabão neutro.

Garrafa de van Dorn

A garrafa de van Dorn (fig.) consiste de um tubo de PVC com volume de 2; 5 e 7 litros ou mais. O funcionamento consiste em mergulhar a garrafa aberta em ambas as extremidades e após atingir o ponto desejado, deixa-se cair o mensageiro que fecha hermeticamente as duas extremidades. A amostra é retirada pela mangueira que fica na parte lateral da garrafa desconectando a parte superior.



Apêndice B
Determinação de *Giardia sp* e
***Cryptosporidium sp* em água pela técnica**
de filtração, separação imunomagnética e
microscopia de imunofluorescência



Introdução

A transmissão de protozoonoses via abastecimento de água, em particular giardiose e criptosporidiose, é um tema que tem despertado crescente preocupação no que tange à questão de saúde pública.

Protozoários são micro-organismos eucarióticos, unicelulares, sem paredes celulares que se alimentam de bactérias e outros organismos. A maior parte dos protozoários é de vida livre e são frequentemente encontrados em águas superficiais, no entanto várias espécies são parasitas. Os efeitos sobre a saúde em decorrência da exposição a protozoários presentes na água de consumo são variados. A manifestação mais comum são distúrbios gastrointestinais, normalmente, de curta duração. No entanto, em indivíduos sensíveis, tais como crianças, idosos e imunocomprometidos, os efeitos podem ser mais graves, crônicos ou até mesmo fatais.

Giardia e *Cryptosporidium* são micro-organismos de ampla distribuição, e relevante patogenicidade, que se multiplicam apenas no trato gastrointestinal de seres humanos e outros animais. Apesar de não poderem se reproduzir no ambiente, podem sobreviver por longos períodos de tempo em meio aquático. Cistos de *Giardia* e, principalmente, oocistos de *Cryptosporidium*, são reconhecidamente resistentes aos agentes desinfetantes utilizados no tratamento de água para consumo humano, particularmente quando o cloro é o agente utilizado.

Ante esse cenário, a Portaria MS nº 2.914/2011 impõe o monitoramento de *Giardia* e *Cryptosporidium* no ponto de captação de água quando a média geométrica anual de *E. coli* nesse ponto for maior ou igual a 1.000 org/100mL. Adicionalmente, quando a média aritmética da concentração de oocistos de *Cryptosporidium* spp. for maior ou igual a 3,0

oocistos/L no(s) pontos(s) de captação de água, a portaria recomenda que a turbidez do efluente filtrado (filtração rápida) seja menor ou igual a 0,3 UT, ou que, alternativamente, se empregue processo de desinfecção que comprovadamente alcance a mesma eficiência de remoção de oocistos de *Cryptosporidium* spp.

As metodologias utilizadas para detecção de (oo)cistos baseiam-se na concentração das amostras e na detecção. Em todos os métodos utilizados no monitoramento de oocistos, as etapas de concentração, purificação (que é incorporada para separar (oo)cistos dos resíduos remanescentes) e detecção são consideradas muito importantes. No entanto, destaca-se que essas metodologias foram delineadas e padronizadas em países como EUA, Austrália e Canadá, cujos programas e legislações de controle da poluição e da degradação dos mananciais são priorizados.

As diferentes metodologias empregadas para a pesquisa de protozoários patogênicos em água estão sujeitas a várias limitações, dentre elas, custos elevados, necessidade de importação de insumos e exigência de recursos humanos especializados. Também é grande a variabilidade dos resultados e baixa a taxa de recuperação dos métodos analíticos, mesmo quando empregado o método de referência – Método 1623/USEPA. Há ainda de se considerar que essas metodologias não permitem a identificação da espécie de protozoário (que pode ser útil indicador da fonte da contaminação) tampouco fornecem informações sobre a infectividade dos organismos.

A seguir é descrito uma metodologia de determinação de *Giardia* sp e *Cryptosporidium* sp em amostras de água.

Determinação de *Giardia* sp e *Cryptosporidium* sp em água pela técnica de filtração, separação imunomagnética e microscopia de imunofluorescência

Método 1623 da USEPA: Determinação de *Giardia* sp. e *Cryptosporidium* sp. em água pela técnica de filtração, separação imunomagnética e microscopia de imunofluorescência (USEPA, 2005).

1. Princípio do método

A técnica de detecção de *Cryptosporidium* e *Giardia* descrita nesse procedimento é baseada nas etapas: concentração da amostra por filtração e centrifugação, purificação por separação imunomagnética (IMS), coloração e leitura de lâminas (microscopia de imunofluorescência - FA). *Cryptosporidium* e *Giardia* são identificados por meio do corante DAPI (do inglês 4'-6-Diamidino-2-phenylindole) e microscopia de Contraste por Interferência Diferencial. Esse método identifica os gêneros, *Cryptosporidium* ou *Giardia*, mas não em nível de espécie. Sua aplicação exige o emprego de pessoal capacitado com treinamento e experiência na determinação de *Cryptosporidium* e *Giardia* por filtração, IMS, e FA.

2. Interferentes

Turbidez

Influência nas etapas de concentração e separação, em virtude da concentração de material particulado e da análise da amostra em microscópio, dificultando a identificação de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*.

<p>Organismos ou detritos com autofluorescência ou imunofluorescência</p>	<p>Interferência na identificação de (oo)cistos, originando falsos positivos</p>
<p>Contaminação</p>	<p>Solventes, reagentes, material de laboratório e quaisquer <i>hardwares</i> de processamento de amostras podem ser responsáveis por introduzir interferentes e originar erros de interpretação dos exames microscópicos de oocistos e cistos. Todos os materiais utilizados devem ter constatada a ausência de interferentes sob as condições de análise por meio da execução de branco (controle negativo). Material descartável deve ser usado sempre que possível.</p>
<p>Inexperiência do laboratorista</p>	<p>A identificação de (oo)cistos em microscópio exige capacidade do laboratorista para identificar ambos os gêneros em meio a amostra ambiental (composta por componentes diversos) e treinamento nas diversas etapas dos métodos e manuseio dos equipamentos.</p>

3. Segurança

O perigo de contaminação biológica associada e o risco de infecção por cistos e oocistos são elevados nesse método, uma vez que envolve a manipulação de amostras concentradas de organismos patogênicos vivos (ativos), portanto, devem ser manuseadas com luvas.

O laboratório deve estabelecer medidas de segurança e práticas de saúde apropriadas, observando os procedimentos de segurança típicos de laboratórios de microbiologia que lidam com organismos patogênicos, durante a preparação, uso e descarte da amostra concentradas, reagentes e materiais, na operação e esterilização de equipamentos.

O conhecimento sobre toxicidade ou carcinogenicidade dos compostos ou reagentes utilizados não são bem consolidados, assim, cada composto deve ser tratado como potencial perigo à saúde, devendo, a exposição, ser reduzida ao nível mais baixo possível.

O transporte de amostras, contendo agentes infecciosos, deve ser realizado de forma criteriosa, procedendo-se, preferencialmente, a inativação dos agentes. No entanto, devem ser observadas normas e legislações pertinentes ao transporte de agentes biológicos inativados ou não.

4. Equipamentos e materiais

Nota: Marcas ou fornecedores citados são apenas para referenciais. Desempenho equivalente pode ser conseguido utilizando marcas alternativas, entretanto, deve-se observar a adequabilidade dos insumos utilizados.

4.1 Galões ou recipientes plásticos (polietileno) para coleta de amostras com volume entre 10 e 50 litros. O material de coleta deve ser, preferencialmente, descartável (reciclável).

Nota: Opcionalmente, pode-se optar pela esterilização dos galões de coleta pela lavagem com 200 mL de solução de hipoclorito de cálcio 12,5% (agitar bastante para espalhar a solução), aguardar de 8 a 12h (*overnight*), descartar a solução de hipoclorito de cálcio e lavar, primeiramente, com 200 mL de solução de tiosulfato de sódio (52%) e em seguida enxaguar com água destilada (água reagente).

4.2 Agitador de tubos (tipo Vortex).

4.3 Agitador magnético.

4.4 Barras magnéticas.

4.5 Agitador rotatório com capacidade de 18 rpm/min.

4.6 Bomba de vácuo/pressão ou linha de pressão com capacidade mínima de 5 bar.

4.7 Centrífuga capaz de proporcionar força de 1500g equipada com rotores “swinging-bucket” que acomodem tubos cônicos de 250 mL e 50 mL.

4.8 Concentrador de partículas magnéticas para tubos de 10 mL (MPC®1 ou MPC®6).

4.9 Concentrador de partículas magnéticas para tubos de microcentrifuga (MPC®-M ou MPC®-S).

4.10 Homogeneizador (tipo Stomacher) com capacidade de 300-350 golpes/minuto.

4.11 Sacos plásticos compatíveis com o homogeneizador.

- 4.12 Micropipetadores com volume variável de 100-1000 μL e 10-100 ou 20-200 μL .
- 4.13 Microscópio óptico equipado com contraste interferencial diferencial (DIC) e epifluorescência com capacidade de fornecer aumentos de 200x, 400x e 1000x.
- 4.14 Porta filtro de espuma.
- 4.15 Béqueres de 1000 ou 2000 mL.
- 4.16 Filtros de espuma (Filta-Max).
- 4.17 Estação de lavagem e concentração (Filta-Max).
- 4.18 Membrana de policarbonato de 25 mm de diâmetro e retenção de 1 μm .
- 4.19 Lâminas para microscopia de fluorescência.
- 4.20 Lamínulas (mínimo 24x32 mm).
- 4.21 Pipetas Pasteur.
- 4.22 Pipetas sorológicas de 5 e 10 mL.
- 4.23 Ponteiras de polipropileno com capacidade para 200-300 μL e 1000 μL .
- 4.24 Proveta de 500 mL.
- 4.25 Tubos de polipropileno de 1,5 mL (tipo eppendorf).
- 4.26 Tubos cônicos de centrífuga com capacidade de 250 mL e 50 mL.

4.27 Tubos de Leighton (lado plano).

5. Reagentes

5.1 Hidróxido de sódio.

5.2 Ácido clorídrico.

5.3 Acetona.

5.4 Glicerol.

5.5 Etanol.

5.6 Metanol.

5.7 Água reagente (água ultrapura).

5.8 Tween® 20 (Sigma Chemical).

5.8.1 Tampão fosfato salino - PBS pH 7.4 (Sigma Chemical):
8 g NaCl; 0.2 g KCl; 1.15 g Na₂HPO₄ anidro; 0.2 g
KH₂PO₄; 1,0 L água reagente.

5.8.2 DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole (Sigma Chemical).

5.9 Soluções para eluição dos filtros.

5.9.1 Tampão fosfato salino/ Tween® 20 (PBST): Adicionar 0,10mL (100µL) de Tween® 20 a 1,0 L a solução Tampão fosfato salino (PBS).

5.9.2 Solução estoque: dissolver 2 mg DAPI em 1,0 mL de metanol absoluto.

Nota: Preparar volumes mínimos para o uso e colocar em frasco ou tubo estéril protegido da luz com tampa rosqueada. Armazenar entre 1°C e 10°C. Não permitir congelamento. Descartar a solução após 2 semanas ou quando o controle positivo der negativo.

5.9.3 DAPI (solução de uso - seguir instruções do fabricante do kit de anticorpos): adicionar 0,01 mL de DAPI (solução-estoque) a 50 mL de PBS.

Nota: Preparar volumes mínimos para o uso e colocar em frasco ou tubo estéril protegido da luz com tampa rosqueada. Armazenar entre 1°C e 10°C. Preparar a solução diariamente.

5.10 Soluções para montagem das lâminas.

5.10.1 Glicerol/PBS: Misturar 60 mL de Glicerol e 40 mL de PBS.

Nota: Preparar no momento do uso.

5.10.2 Meio de montagem DABCO/Glicerol: pesar 2,0g de DABCO (Sigma Chemical) e colocar em um balão volumétrico. Acrescentar 95 mL de solução de glicerol/PBS morna (aquecida) e misturar até a completa dissolução do reagente. Completar o volume para 100 mL e colocar em frasco estéril com tampa rosqueada de capacidade de 100 mL. Manter refrigerado de 2 a 8°C (validade: 3 meses).

6. Coleta de amostra

- 6.1 Encher completamente o vasilhame, assegurando a coleta de 10 L (A versão do método utilizando filtro de espuma Filta Max ® foi validada para um volume de 50 L, no entanto volumes de amostra alternativos podem ser usados).
- 6.2 As amostras deverão ser coletadas em volume único e mantidas refrigeradas entre 1°C e 10°C, sem congelamento, até o processamento.

7. Identificação da amostra

- 7.1 Identificar adequadamente a amostra.
 - 7.1.1 Registrar informações da procedência da amostra, data e hora da coleta.
 - 7.1.2 Registrar dados da análise: data do início da análise, volume analisado e volume do centrifugado.
 - 7.1.3 Registrar lotes dos reagentes e soluções utilizados

8. Filtração

- 8.1 Colocar o filtro de espuma no porta-filtro.
- 8.2 Conectar com auxílio de mangueiras de silicone o porta-filtro ao recipiente contendo a amostra e à bomba ou linha de pressão.
- 8.3 O efluente ao processo de filtração deve ser armazenado em recipiente graduado para medição do volume.

8.4 Após o término da filtração da amostra, desligar a pressão. Desconectar o porta-filtro da mangueira e tampar o porta-filtro com uma rolha de borracha nos pontos de entrada e saída.

8.5 Se a eluição não for ser feita imediatamente, armazenar o porta-filtro com a espuma sob refrigeração (1 a 10°C).

A eluição pode ser iniciada em 96 horas após a coleta da amostra ou sua filtração em campo.

9. Eluição

Nota: O processo de eluição, aqui descrito, utiliza estação de lavagem Filta-Max®. Devem ser consultadas as instruções do fabricante para domínio da montagem e operação do aparelho. Opcionalmente pode-se utilizar um Stomacher.

9.1 Procedimento de eluição na estação Filta-Max®.

9.1.1 Primeira lavagem.

9.1.1.1 Colocar a membrana filtrante plana na base do concentrador, com a parte rugosa para cima.

9.1.1.2 Usar as travas da estação de lavagem para parafusar o tubo concentrador (criando uma vedação na membrana).

9.1.1.3 Retirar o tubo concentrador da estação de lavagem.

9.1.1.4 Remover o filtro de espuma do porta-filtro.

9.1.1.5 Conectar o filtro de espuma à estação de lavagem.

9.1.1.6 Verter o excesso de líquido recuperado a partir do módulo de filtração para o tubo concentrador, em seguida, lavá-lo com PBST e verter o líquido no tubo concentrador.

9.1.1.7 Adicionar 600 mL de PBST para o tubo concentrador e conectá-lo na base abaixo do tubo de eluição.

Nota: Se mais do que 50 mL de líquido foi recuperado a partir do módulo de filtração, reduzir o volume de PBST em conformidade.

9.1.1.8 Lavar o filtro de espuma, movendo o êmbolo para cima e para baixo 20 vezes. Movimentos suaves do êmbolo são recomendados para evitar a produção excessiva de espuma.

9.1.1.9 Separe o concentrador e purgar o líquido restante no tubo de eluição, movendo o êmbolo para cima e para baixo 5 vezes, em seguida, para evitar que esorra, colocar o tampão fornecido na extremidade do tubo de aço.

9.1.1.10 Concentrar a solução eluída da primeira lavagem utilizando o aparelho Filta-Max®. Colocar o tubo concentrador sobre uma placa de agitação magnética e colocar a tampa, com barra agitadora magnética.

9.1.1.11 Conecte o aparelho de drenagem à válvula na base do concentrador. Ligue o agitador e abra a válvula.

9.1.1.12 Ligue a bomba a vácuo.

9.1.1.13 Permitir que o líquido escoe até a uma altura aproximadamente igual ao meio da barra agitadora, em seguida, fechar a válvula.

9.1.1.14 Remover o agitador magnético, e lavá-lo com PBST ou água reagente para recuperar todos os oocistos.

9.1.1.15 Transferir o concentrado para um tubo de 50 mL, em seguida, lavar os lados do tubo de concentração e transferir o produto do enxágue para o tubo de 50 mL.

9.1.2 Segunda lavagem

9.1.2.1 Adicionar um volume adicional de 600 mL de PBST para o módulo concentrador.

9.1.2.2 Repetir a lavagem dos filtros de espuma, movendo o êmbolo para cima e para baixo 10 vezes. Movimentos suaves do êmbolo são recomendados para evitar a produção excessiva de espuma.

9.1.2.3 Adicionar o concentrado da primeira lavagem, armazenado no tubo de 50 mL, para o eluato (mistura de eluente e soluto) da segunda lavagem e repetir o processo de concentração da amostra com aparato Filta-Max[®].

Nota: No caso de obstrução dos poros da membrana e interrupção do escoamento antes de finalizar a concentração, pode-se substituir a membrana filtrante. Desmonte o tubo concentrador e armazene o eluato remanescente em um recipiente. Retire a membrana com auxílio de uma pinça, colocando-a no saco fornecido. Coloque uma nova membrana e remonte o tubo concentrador. Retorne o eluato armazenado ao tubo concentrador, lave o recipiente com água reagente e adicione o líquido ao eluato, prossiga a concentração. A membrana pode ser substituída quantas vezes forem necessárias. Pode-se também realizar a concentração por centrifugação a 1500G por 15 minutos.

9.1.2.4 Remover o agitador magnético.

- 9.1.2.5 A amostra final pode ser vertida para dentro do mesmo tubo de 50 mL. Lavar os lados do tubo concentrador com PBST e verter a solução para o tubo de 50 mL.
- 9.1.2.6 Inserir o tubo concentrador vazio na estação de lavagem.
- 9.1.2.7 Retirar a membrana e transferi-la para o saco fornecido com o auxílio de uma pinça.
- 9.1.2.8 Lavar a membrana:
- 9.1.2.8.1 Manualmente - Adicionar 5 mL de PBST para o saco contendo a membrana. Esfregar a superfície da membrana através do saco até que a membrana pareça limpa. Usando uma pipeta, transferir o produto de eluição a um tubo de 50 mL. Repita a lavagem da membrana com mais 5 mL de PBST e transferir o produto de eluição para o tubo de 50 mL.
- 9.1.2.8.2 Lavagem com Stomacher - Adicionar 5 mL de PBST para o saco contendo a membrana. Coloque o saco contendo a membrana em um Stomacher e agitar durante 3 minutos. Usando uma pipeta transfira o eluato para um tubo de 50 mL. Repita a lavagem duas vezes utilizando o Stomacher e 5 mL de alíquotas de PBST.

10. Centrifugação

- 10.1 Centrifugar o tubo de 50 mL a 1500g durante 15 minutos.
- 10.2 Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, aspirar cuidadosamente o sobrenadante até 5 mL acima do sedimento.

10.3 Registrar o volume do sedimento.

Nota: O volume do sedimento não deve ser superior a 0,5 mL, quantidade máxima recomendada de material particulado para purificação pelo método.

11. Separação imunomagnética

11.1 Agitar vigorosamente o tubo em vórtex para ressuspensão do sedimento:

11.1.1 Se o volume de sedimento for inferior a 0,5 mL, agite o tubo vigorosamente em vórtex até o sedimento ser completamente ressuspendido. Girar o tubo de centrífuga suavemente para reduzir a espuma formada após homogeneização.

11.1.2 Se o volume de sedimento for superior a 0,5 mL, o concentrado deve ser separado em várias subamostras (uma subamostra não deve ter volume de sedimento superior a 0,5 mL).

11.1.2.1 Estimar o volume total requerido usando o volume do sedimento pela fórmula:

$$\text{Volume total requerido (mL)} = \frac{\text{Volume de sedimento (mL)}}{0,5 \text{ mL}} \times 5,0 \text{ mL}$$

Por exemplo, se o volume do precipitado for 1,2 mL, o volume total necessário é 12 mL. Adicionar água purificada ao tubo de centrífuga para completar o volume para 12 mL.

11.1.3 Se todo o volume obtido for submetido ao IMS, dividi-lo por 5 mL e calcular o número de subamostras a serem analisadas (arredondando para o número inteiro

superior mais próximo). No exemplo citado, $12/5 \text{ mL} = 2,4$, arredondando portanto 3 subamostras.

- 11.1.4 Se o volume a ser analisado for parcial, agitar vigorosamente o volume total em vórtex para ressuspender completamente o precipitado.
- 11.2 Preparar, para cada concentrado, 1,5mL de uma diluição 1X do tampão SL-A 10X. Para cada 1,0 mL requerido da solução diluída, misture 100 μL (0,1mL) e 900 μL (0,9mL) de água reagente.
- 11.3 Transferir, com o auxílio de uma pipeta de 10mL, 5mL da amostra concentrada (ou subamostra) para o tubo de Leighton (lado plano) contendo 1,0 mL de cada tampão, SL-A 10X e SL-B 10X (Dynabeads GC-Combo).
- 11.4 Enxaguar, duas vezes com água reagente, o tubo contendo o concentrado (ou subamostra), de modo que o volume final no tubo de Leighton seja de 12 mL.
- 11.5 Adicionar a cada tubo de Leighton (contendo amostra e tampões), 100 mL de Dynabeads®Crypto-Combo e 100mL de Dynabeads®Giardia-Combo, previamente homogeneizados no vórtex por 10 segundos. Colocar os tubos no agitador rotatório por no mínimo 1 hora, a 18rpm.
- 11.6 Transferir o tubo de Leighton para o concentrador magnético de partículas (MPC®1 ou MPC®6), homogeneizar, manual e suavemente, em um ângulo de aproximadamente 90° por 2 minutos.
- 11.7 Descartar o sobrenadante, sem retirar o tubo do concentrador magnético de partículas e sem agitar o material.

- 11.8 Se a amostra estiver turva, descartar o sobrenadante e ressuspender o sedimento em 10 mL de PBS e repetir o procedimento no concentrador magnético de partículas.
- 11.9 Remover o concentrador magnético de partículas e ressuspender a amostra em 500 μ L (0,50mL) de tampão SL-A 1X utilizando pipeta Pasteur e transferir para um tubo eppendorf. Adicionar mais 500 μ L de tampão SL-A 1X ao tubo de Leighton, lavar bem e transferir para o tubo eppendorf. Colocar o eppendorf no concentrador magnético, MPC®-M ou MPC®-S, e homogeneizar manualmente em um ângulo de 180°C durante 1 minuto.
- 11.10 Para transferir, quantitativamente, todo o volume aguardar, após a segunda transferência, cerca de um minuto e recolher qualquer volume residual que tenha escorrido para a parte inferior do tubo.
- 11.11 Descartar o sobrenadante, sem retirar concentrador magnético.
- 11.12 Dissociação do complexo beads/(oo)cisto.
- 11.13 Remover o concentrador magnético.
- 11.14 Adicionar 50 μ L da solução de HCl 0,1N então agite no vórtice a alta velocidade por cerca de 50 segundos.
- 11.15 Colocar o tubo no concentrador magnético (MPC®-M ou MPC®-S) sem a tira magnética no lugar e deixar repousar numa posição vertical, por pelo menos 10 minutos, a temperatura ambiente.
- 11.16 Agite no Vórtex durante aproximadamente 30 segundos.

- 11.17 Assegurar que toda a amostra está na base do tubo. Colocar o tubo de microcentrífuga (eppendorf) no concentrador magnético (MPC®-M ou MPC®-S).
- 11.18 Coloque a tira magnética no concentrador magnético (MPC®-M ou MPC®-S) e deixar em repouso durante um mínimo de 10 segundos.
- 11.19 Preparar uma lâmina e identificá-la, adicionar 5 μL de NaOH 1,0 N ao poço da lâmina.
- 11.20 O procedimento envolve duas dissociações ácidas, no entanto pode-se optar por montar duas lâminas, cada uma com o volume de cada dissociação, ou uma única lâmina. Caso opte-se por montar uma única lâmina, adiciona-se 10 μL de NaOH 1,0 N ao poço da lâmina. Deve ser medido o volume do concentrado adicionado à lâmina.
- 11.21 O volume obtido da dissociação pode ser armazenado em outro eppendorf contendo 10 μL de NaOH 1,0 N. Desse modo, pode-se realizar a leitura de uma menor alíquota do concentrado, deve-se portanto registrar o volume concentrado e o volume da alíquota.
- 11.22 Sem remover o eppendorf do concentrador magnético (MPC®-M ou MPC®-S) transferir toda a amostra para o poço da lâmina com o NaOH. Evitar tocar as partículas presas a parede do tubo. Assegurar que todo o fluido seja transferido.
- 11.23 Remover o eppendorf do concentrador magnético e repetir o procedimento de lavagem com ácido.

11.24 O volume da segunda dissociação ácida pode ser adicionado à lâmina contendo o volume da primeira dissociação ou pode ser montada uma segunda lâmina.

Nota 1: Os poços da lâmina podem ser pequenos para acomodar os volumes de ambas as dissociações.

Nota 2: As etapas de eluição, concentração e purificação (separação imonomagnética) devem ser concluídas no mesmo dia de trabalho.

12. Coloração

12.1 Deixar as lâminas secarem a temperatura ambiente pernoite (ou até que a lâmina seque completamente). Seguir as instruções do fabricante para efetuar a coloração imunofluorescente.

Nota: A coloração deve ser iniciada em até 72 horas após o preparo da lâmina.

12.2 Colocar a lâmina numa câmara úmida, no escuro e à temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos. (A câmara úmida consiste de um recipiente de plástico contendo toalhas de papel úmidas sobre as quais as lâminas são colocadas).

12.3 Lavar os poços, adicionando PBS em quantidade suficiente (aproximadamente 100 μ L). Aspirar cuidadosamente o líquido, sem tocar a área contendo o material.

12.4 Adicionar 50 μ L de DAPI e deixar em repouso durante 5 minutos na câmara úmida (A câmara úmida consiste de um recipiente de plástico contendo toalhas de papel úmidas no topo do qual as lâminas são colocadas).

12.5 Lavar os poços, adicionando PBS em quantidade suficiente (aproximadamente 100 μ L). Aspirar cuidadosamente o líquido, sem tocar a área contendo o material.

12.6 Colocar uma gota do meio de montagem DABCO/glicerol e cobrir com uma lamínula, evitando a formação de bolhas entre a lâmina e a lamínula.

12.7 Cuidadosamente, selar as bordas da lamínula com esmalte transparente.

12.8 Preparar lâminas de controles positivo e negativo, de acordo com as especificações do fabricante.

Nota: O exame microscópico deve ser iniciado tão logo a coloração tenha sido finalizada, mas se os corantes não perderem a fluorescência, pode ser realizado em até 168 horas (7 dias) com as lâminas armazenadas ao abrigo da luz.

13. Leitura microscópica

13.1 Examinar cada poço de maneira sistemática, estabelecendo um padrão de leitura, de cima para baixo ou de um lado para outro, garantindo que toda a área seja avaliada.

13.2 Examinar usando imunofluorescência (FA), DAPI e microscopia de Contraste por Interferência Diferencial (DIC).

14. Controles positivo e negativo

14.1 Iniciar o exame pelos controles positivo e negativo, identificando no controle positivo pelo menos três oocistos de *Cryptosporidium* e três cistos de *Giardia*. Examinar o controle negativo, confirmando a ausência de cistos e oocistos.

14.2 Registrar os resultados e iniciar a leitura das amostras somente se os controles positivo e negativo apresentarem resultados satisfatórios.

14.3 Oocistos de *Cryptosporidium*

14.3.1 Examinar em FITC em aumento de 200X. São oocistos característicos, formas fluorescentes ovóides ou esféricas de 4 a 6 μm de diâmetro.

14.3.2 Ao visualizar os oocistos, ampliar para 400X e mudar o microscópio para filtro bloqueador de UV para DAPI. Os oocistos característicos apresentam coloração interna azul brilhante ou presença de até 4 núcleos de coloração azul céu.

14.3.3 Em seguida, examinar em contraste interferencial diferencial e observar a presença de características morfológicas internas e externas típicas de oocistos de *Cryptosporidium*, em aumento de 1000x.

14.3.4 Um resultado positivo de oocisto *Cryptosporidium* exibe fluorescência, tamanho e formas típicas e positivo para Fluorescência-FITC, DAPI; Contraste interferencial diferencial-DIC

14.4 Cistos de *Giardia*

14.4.1 Examinar em FITC em aumento de 200X. São cistos característicos, formas fluorescentes ovóides ou esféricas de 8 a 18 μm de diâmetro e 5 a 15 μm de largura.

14.4.2 Ao visualizar os cistos, ampliar para 400X e mudar o microscópio para filtro bloqueador de UV para DAPI. Os cistos característicos apresentam coloração interna azul brilhante ou presença de dois a 4 núcleos de coloração azul céu.

14.4.3 Em seguida, examinar em contraste interferencial diferencial e observar as características morfológicas internas e externas típicas de cistos de Giardia.

14.4.4 Um resultado positivo para cisto de Giardia fluorescência típica, tamanho e forma típica e não exibe características atípicas em FA, DAPI ou DIC.

14.5 Cálculo dos resultados

Caso todo o volume concentrado (final dissociação ácida) seja levado ao microscópio

$$N^{\circ} \text{ de (oo) cistos. L}^{-1} = \frac{N^{\circ} \text{ de (oo) cistos identificados}}{\text{Volume da amostra coletada}}$$

Caso seja realizada a leitura em microscópio de uma alíquota do volume concentrado obtido ao final da dissociação ácida.

$$N^{\circ} \text{ de (oo) cistos. L}^{-1} = \frac{N^{\circ} \text{ de (oo) cistos identificados} \times \frac{\text{Volume do concentrado (uL)}}{\text{Alíquota do concentrado analisada (uL)}}}{\text{Volume da amostra coletada}}$$

Bibliografia



Bibliografia

BATALHA, B. H. L.; PARLATORE, A. C. **Controle da qualidade da água para o consumo humano: bases conceituais e operacionais**. 1. ed. São Paulo: Cetesb, 1977.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual técnico de análise de água para consumo humano**. Brasília: Funasa, 1999.

_____. Ministério da Saúde. Portaria n. 518, de 25 de março de 2004. Dispõe sobre normas e padrões de potabilidade de água para consumo humano. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 26 mar. 2004. Seção 1, p. 266.

COELHO, L. **Técnicas de laboratório clínico**. São Paulo: Atheneu, 1968.

GUIA de coleta e preservação de amostras de água. 1. ed. São Paulo: Cetesb, 1987.

LIMPEZA de vidraria. Disponível em: <http://www.profcupido.ig.com.br/conserv_e_limpeza_vidrarias.Htm>. Acesso em: 01 mar. 2004.

MAIER, F. J. **Fluoruración del agua potable**. 1. ed. México: Limusa-Wiley, 1971.

MANUAL de tratamiento de aguas. 4. ed. México: Limusa-Wiley, 1974.

OPERAÇÃO e manutenção de E.T.A. São Paulo: Cetesb, 1973. v. 2.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). **Guías para a calidad del agua potable**. 2. ed. Ginebra, 1995. v.1.

_____. **Guías para a calidad Del agua potable**. 1. ed. Ginebra, 1998. v.3.

_____. **Guías para a calidad Del agua potable**. 3. ed. Ginebra, 2004. v.1.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). **Fascículo água: a desinfecção da água**. Brasília: OPAS, 1999.

SANTOS FILHO, D. F. **Tecnologia de tratamento de água: água para indústria**. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora AN, 1976.

SILVA, M. O. S. A. **Análises físico-químicas para controle de estações de tratamento de esgotos**. 1. ed. São Paulo: Cetesb, 1977.

STANDARD methods for the examination of water and wastewater. 16th ed. Washington: APHA, 1985.

TÉCNICAS de abastecimento e tratamento de água. 2. ed. São Paulo: Cetesb, 1977. v.2.

TÉCNICAS de análises microbiológicas da água: membrana filtrante. 1. ed. São Paulo: Cetesb, 1997.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). Method 1623: Cryptosporidium and Giardia in water by filtration/IMS/FA. Washington, 2005. 68 p.

Elaboração



Elaboração

Marinaldo da Silva Valente/Suest/AM/**Funasa**

Colaboradores

Osman de Oliveira Lira/Suest/PE/**Funasa**

Nilce Bazzoli/Suest/MG/**Funasa**

Júlio César Reis da Silva/Suest/MA/**Funasa**

Raimundo Rodrigues dos Santos Filho/Suest/MA/**Funasa**

Miguel Crisóstomo Leite Brito/Densp/**Funasa**

Coordenação

Maria Fernanda Bittencourt/Densp/**Funasa**

Revisão técnica

Felizana M.M. da S. Palhano

Girlene Rodrigues Leite

Vilma Ramos Feitosa/Densp/**Funasa**

Marinaldo da Silva Valente/Suest-Am/**Funasa**

Revisão da 3ª Edição

Ana Maria Moreira Dias - Cocag/Desam/**Funasa**

Aristeu de Oliveira Junior - Cocag/Desam/**Funasa**

Antonio Carlo B. Brandão - Cocag/Desam/**Funasa**

Demétrius Brito Viana - Consultor OPAS/**Funasa**

Osman de Oliveira Lira - URCQA/Sesam/Suest-PE/**Funasa**

Revisão Ortográfica e Gramatical da 3ª Edição

Leila Santos – Coesc/Gab/Presi/**Funasa**/MS

Revisão da 4ª Edição e atualização

Ana Maria Moreira Dias - Cocag/Desam/**Funasa**

Aristeu de Oliveira Junior - Cocag/Desam/**Funasa**

Antonio Carlo B. Brandão - Cocag/Desam/**Funasa**
Demétrius Brito Viana - Consultor OPAS/**Funasa**
Osman de Oliveira Lira - URCQA/Sesam/Suest-PE/**Funasa**

Ilustração

Leonardo Ribeiro da Silva Terra /Coesc/Gab / Presi /**Funasa**

Projeto gráfico do miolo

Gláucia Elizabeth de Oliveira - Diedi/Coesc/Gab/**Funasa**

Capa e diagramação

Eduardo dos Santos - Diedi/Coesc/Gab/Funasa

Revisão Ortográfica e Gramatical da 1ª e 2ª Edição

Olinda Myrtes Bayma S. Melo – Coesc/Gab/Presi/**Funasa**/
MS

Revisão bibliográfica

Raquel Machado Santos - /Coesc/Gab/Presi/**Funasa**
Solange de Oliveira Jacinto - /Coesc/Gab/Presi/**Funasa**

“A publicação deste Manual foi financiada pelo Termo de
Cooperação nº 38, firmando entre a FUNASA e a OPAS/OMS”.

