

Nota Técnica

Inativação de cistos de *Giardia duodenalis* por peroxidação e peroxidação assistida por radiação ultravioleta

Inactivation of Giardia duodenalis cysts by peroxidation and peroxidation assisted by ultraviolet radiation

Jose Roberto Guimarães¹, Luciana Urbano dos Santos², Regina Maura Bueno Franco³, Regiane Aparecida Guadagnini⁴

RESUMO

No presente trabalho foi avaliado um processo oxidativo avançado (POA), peróxido de hidrogênio assistido por radiação ultravioleta (H₂O₂/UV), e um processo oxidativo, peroxidação (H₂O₂), na inativação de cistos de *Giardia duodenalis*. Foram utilizadas concentrações de peróxido de hidrogênio de 15 mg.L⁻¹ e 6x10³ mg.L⁻¹ e dose de UV de 44, 2.736 e 5.472 mW s.cm⁻². A eficiência dos processos foi aferida com base na observação de danos à parede dos cistos por meio da reação de imunofluorescência direta (RID) e da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Quando utilizada a menor dose de radiação e concentração de oxidante, o POA se mostrou mais eficiente que a peroxidação tanto em causar dano na parede de *G. duodenalis* quanto em reduzir o número de cistos. Com a aplicação do POA e da peroxidação houve uma redução média de 45,2 e 22,6% do número de cistos de *G. duodenalis*, sendo que, em média, 42 e 29,4% dos cistos restantes apresentaram danos, respectivamente.

Palavras-chave: processo oxidativo avançado; *Giardia duodenalis*; microscopia eletrônica de varredura.

ABSTRACT

Performance of an advanced oxidative process (AOP) with the application of hydrogen peroxide and UV radiation (H₂O₂/UV) has proven effective to inactivate *Giardia duodenalis* cysts. Hydrogen peroxide concentrations of 15 mg.L⁻¹ and 6x10³ mg.L⁻¹ and 44 UV doses of 2,736 and 5,472 mW s.cm⁻² were used in this study. The process effectiveness was assessed observing the occurrence of damage to the cyst's wall using direct immunofluorescence reaction (IFA) and scanning electron microscopy (SEM). When using the lower UV radiation dose and the lower oxidant concentration the AOP has shown higher effectiveness both in causing damage to the *Giardia duodenalis* wall and in reducing the number of cysts inoculated at the beginning. The average reduction AOP and peroxidation processes reduced 45.2 and 22.6% in the number of *G. duodenalis* cysts and 42 and 29.4% of the remaining cysts presented damage, respectively.

Keywords: advanced oxidation process; *Giardia duodenalis*; scanning electronic microscopy.

INTRODUÇÃO

Giardia duodenalis é um protozoário que infecta o ser humano, sendo responsável por cerca de 35% dos mais de 199 surtos por veiculação hídrica causados por protozoários no mundo no período de 2004 a 2010 (BALDURSSON & KARANIS, 2011). O hospedeiro infectado com *Giardia* spp. elimina na ordem de 10⁷ cistos por grama de fezes, sendo

que a ingestão de um pequeno número dessas formas infectantes (10 a 1.000 cistos) é suficiente para causar a infecção (CACCIÒ & RYAN, 2008). Cistos de *Giardia* spp. persistem no ambiente, mantendo-se infectantes por até 2 meses em água doce a 20°C, e há elevada resistência aos desinfetantes mais usualmente utilizados no tratamento da água para consumo humano, como, por exemplo, o cloro (RYU *et al.*, 2008).

Trabalho realizado no Laboratório de Processos Oxidativos (LABPOX-DSA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) - Campinas (SP), Brasil.

¹Doutor em Química pela UNICAMP. Professor da Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo (FEC) - Campinas (SP), Brasil.

²Doutora em Parasitologia pela UNICAMP. Professora do Centro Universitário Padre Anchieta. Pesquisadora Colaboradora da FEC - Campinas (SP), Brasil.

³Doutora em Parasitologia pela UNICAMP. Professora do Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Animal - Campinas (SP), Brasil.

⁴Doutora em Engenharia Civil (Área de Concentração em Saneamento e Ambiente) pela UNICAMP - Campinas (SP), Brasil.

Endereço para correspondência: Jose Roberto Guimarães - Rua Saturnino de Brito, 224 - 13083-889 - Cidade Universitária Zeferino Vaz - Campinas (SP), Brasil - E-mail: jorober@fec.unicamp.br

Fonte de financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq).

Recebido: 01/08/2012 - **Aceito:** 06/11/2015 - **Reg. ABES:** 98360

Os processos oxidativos avançados (POAs) são utilizados para obtenção do radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), um agente de alto potencial oxidante ($E=2,80\text{ V}$) (CORDEIRO *et al.*, 2004). Vários processos são utilizados para a geração desse radical: ozonização em meio básico (O_3/OH^-), fotocatalise heterogênea (TiO_2/UV), reagente de Fenton ($\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}^+$), foto-Fenton ($\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}^+/\text{UV}$), peroxidação assistida com luz ultravioleta ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$), dentre outros (MATTOS *et al.*, 2003). Dentre os POAs, a $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ oferece como vantagem a acessibilidade comercial do peróxido de hidrogênio, sua estabilidade térmica e armazenagem no próprio local de uso (DOMÈNECH *et al.*, 2001) e a radiação UV ser eficiente em inativar micro-organismos como bactérias e vírus (GUIMARÃES & BARRETTO, 2003).

Uma molécula de H_2O_2 produz, teoricamente, dois radicais hidroxila quando submetida a uma fonte de energia suficiente para romper a ligação entre os dois átomos de oxigênio (Equação 1). O rendimento quântico (f) é de 0,98 a 254 nm.



Embora com eficiência comprovada para mineralização de compostos recalcitrantes e inativação de bactérias e vírus, estudos desse POA sobre patógenos mais resistentes, como protozoários e helmintos, são incipientes (RODRIGUES-SILVA *et al.*, 2013). Poucos estudos sobre esses organismos indicam que a aplicação do POA ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$) foi capaz de reduzir protozoários e helmintos presentes em amostras de esgoto (GUADAGNINI *et al.*, 2013; GUIMARÃES *et al.*, 2014).

Para avaliar a inativação dos cistos de *Giardia* spp., embora trabalhoso e demorado na geração dos resultados, o melhor modelo ainda é a experimentação animal (*in vivo*), uma vez que os corantes vitais e o método de excitação *in vitro* super ou subestimam a eficiência dos processos avaliados (SAKAMOTO *et al.*, 2001). A avaliação da infectividade de protozoários de veiculação hídrica com métodos que associam o cultivo celular e os corantes vitais com a reação em cadeia de polimerase (*polymerase chain reaction* — PCR) tem sido realizada e se mostra promissora (ALUM *et al.*, 2012; LIANG & KEELEY, 2012).

A alteração estrutural de cistos de *Giardia* spp. possui associação com resultados de experimentos de infecciosidade animal, sendo, assim, uma medida válida para a inferência da inativação desse organismo ao se observar danos à forma e/ou à fluorescência do cisto (WIDMER *et al.*, 2002).

A identificação por meio de coloração com reação de imunofluorescência direta (RID), utilizando anticorpos monoclonais conjugados com o corante fluorogênico FITC (que confere fluorescência aos organismos), se mostra 12 vezes mais eficiente que as técnicas tradicionais de coloração de protozoários e pode ser uma medida indireta da integridade da parede do cisto de *Giardia* spp., área que, ao ser danificada, impede a reação antígeno anticorpo, levando a falhas na visualização desse organismo.

O objetivo do presente estudo foi avaliar os danos causados às paredes de cistos de *G. duodenalis* quando submetidos aos processos de peroxidação (H_2O_2) e peroxidação assistida por radiação ultravioleta ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$).

METODOLOGIA

Em todos os experimentos foi utilizada solução aquosa, elaborada com água ultrapura (Milli-Q®) e adição de sais (APHA, 2005). Os cistos de *G. duodenalis* utilizados nos ensaios foram purificados de fezes humanas (SMITH & SMITH, 1989), e, para a identificação da espécie, foi utilizado Kit DNA ZR Fungal/Bacterial DNA®, com amplificação por PCR usando gene da proteína β *giardin* (MAHBUBANI *et al.*, 1992).

Os cistos foram inoculados na ordem de 2×10^3 em um litro da solução salina e submetidos aos processos oxidativo (H_2O_2) e oxidativo avançado ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$), de acordo com as condições experimentais expostas na Tabela 1.

Foi utilizado um sistema experimental, conforme descrito em Rodrigues-Silva *et al.* (2013), que foi descontaminado após cada ensaio, recirculando soluções de eluição (Tween 80, 0,1%), hipoclorito de sódio a 1% e água ultrapura. Após os processos peroxidação e POA, os organismos presentes na solução eram concentrados por filtração em membrana de fibras mistas de ésteres de celulose (D=47 mm; porosidade nominal=3 μm), segundo Franco *et al.* (2001).

Visualização dos cistos de *G. duodenalis* por reação de imunofluorescência direta e microscopia eletrônica de varredura

Para a confecção da lâmina de RID, foi aplicado o protocolo de homogeneização de Redlinger *et al.* (2002) e visualizadas alíquotas de 15 μL ($n=3$). A RID é baseada na reação entre anticorpos monoclonais anti-*Giardia* (conjugados com o fluorocromo FITC) e epítomos da parede dos cistos (Figura 1). Quando observado em microscópio de epifluorescência, o fluorocromo gera a cor verde-maçã brilhante (USEPA, 2012).

Para facilitar a avaliação de um possível dano causado à parede dos cistos, foi proposta uma escala de classificação (Tabela 2) segundo a observação realizada por RID (Figura 2).

As lâminas para a observação por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram preparadas segundo o protocolo de Bozzola e Russell (1999).

Tabela 1 - Condições experimentais dos processos de peroxidação (H_2O_2) e peroxidação assistida por radiação ultravioleta ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$).

Processo	Nº de ensaios	CH_2O_2 (mg L ⁻¹)	Tempo de ensaio (s)	Dose de UV (mW s cm ⁻²)
Peroxidação	3	$6 \times 10^*$	3.600	-
	3	6×10^3	1.800	-
	6	15**	5,5	-
$\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$	3	6×10^3	3.600	5.472***
	3	6×10^3	1.800	2.736***
	6	15	5,5	44****

Com base em: *BARBEE *et al.* (1999); WEIR *et al.* (2002); QUILEZ *et al.* (2005); **DOMÈNECH *et al.* (2001); ***CLANCY *et al.* (2000); ****SHIN *et al.* (2009). UV: ultravioleta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Processo oxidativo avançado

A observação dos cistos de *G. duodenalis* remanescentes após o POA mostra que tal processo teve ação sobre a parede do cisto, nas três condições estudadas.

Observa-se que quando foram aplicadas a maior dose de UV e a maior concentração de peróxido de hidrogênio, obteve-se maior porcentagem de cistos danificados (46%) e maior porcentagem de dano C e D, com 35% dos cistos danificados.

Quando utilizadas a menor concentração do oxidante e a menor dose de UV, foi observada uma porcentagem de 45,3% de danos nos cistos remanescentes, semelhante à obtida com a alta concentração de peróxido de hidrogênio e dose de UV (Tabela 3).

Pôde-se verificar, ainda, uma redução do número inicial de cistos inoculados na amostra (Tabela 4).

Quando observado o número de cistos, verificou-se maior taxa de redução quando utilizada a dose de UV de 2.736 mW s cm⁻². De uma maneira geral, a geração de radicais hidroxila foi mais eficiente nas condições experimentais de baixa concentração de oxidante e dose de UV, pois, nessa condição, ocorreu maior alteração na forma dos cistos e taxa de redução semelhante às demais condições.

A hipótese de que altas doses (de oxidante e UV) promoveriam maior ação sobre o protozoário não se confirmou. Sabe-se que a aplicação de peróxido de hidrogênio em alta concentração resulta em uma interferência negativa no processo, pois o oxidante “sequestra” os radicais hidroxila, gerando

outro radical, o hidroperoxila (HO₂·), que possui um menor potencial de oxidação (DOMÈNECHE *et al.*, 2001). A produção de espécies reativas de oxigênio é maior em valores de pH próximos ao neutro (HARGREAVES *et al.*, 2007). Isso pode também explicar a baixa eficiência do processo, já que o pH do meio reacional nesses ensaios foi próximo a 4.

As imagens de MEV mostram que cistos não submetidos aos processos estavam íntegros (Figura 3A). Após a aplicação do POA, independentemente da dose utilizada, alterações na forma e na superfície foram observadas (Figura 3B), corroborando os resultados obtidos pela RID.

Processo químico: peroxidação

Utilizando a menor concentração de peróxido de hidrogênio com menor tempo de contato, obteve-se o maior número de cistos com alteração de fluorescência, quando comparada com as maiores concentrações e os maiores tempos de contato. A alta concentração promoveu um aumento para 25% de cistos com alteração de fluorescência, quando o tempo de contato foi de 60 minutos. Já a aplicação de 15 mg.L⁻¹ de peróxido de

Tabela 2 - Classificação dos cistos, pela coloração de reação de imunofluorescência direta, quanto ao dano* ou não à parede do organismo após os processos.

Classe	Característica
A	Sem alteração de forma e fluorescência padrão (Figura 2A)
B	Sem alteração de forma e com alteração de fluorescência (Figura 2B)
C	Com alteração de forma e fluorescência padrão (Figura 3A)
D	Com alteração na forma e com alteração de fluorescência (Figura 3B)

*dano: medida usada para inferir a inativação dos cistos de *G. duodenalis*.

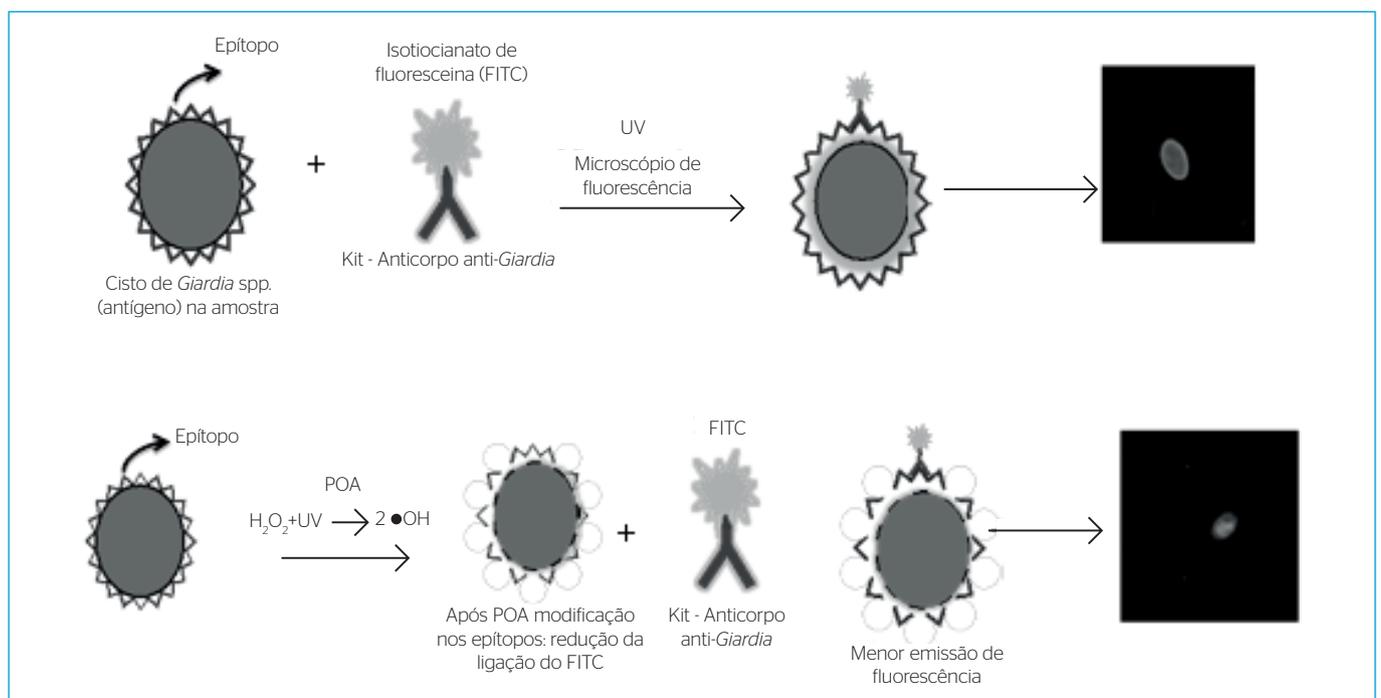


Figura 1 - Esquema da reação de imunofluorescência direta mostrando a ligação dos epítomos da parede de cistos (antígeno) com o anticorpo conjugado com FITC e a geração de fluorescência utilizada para observação.

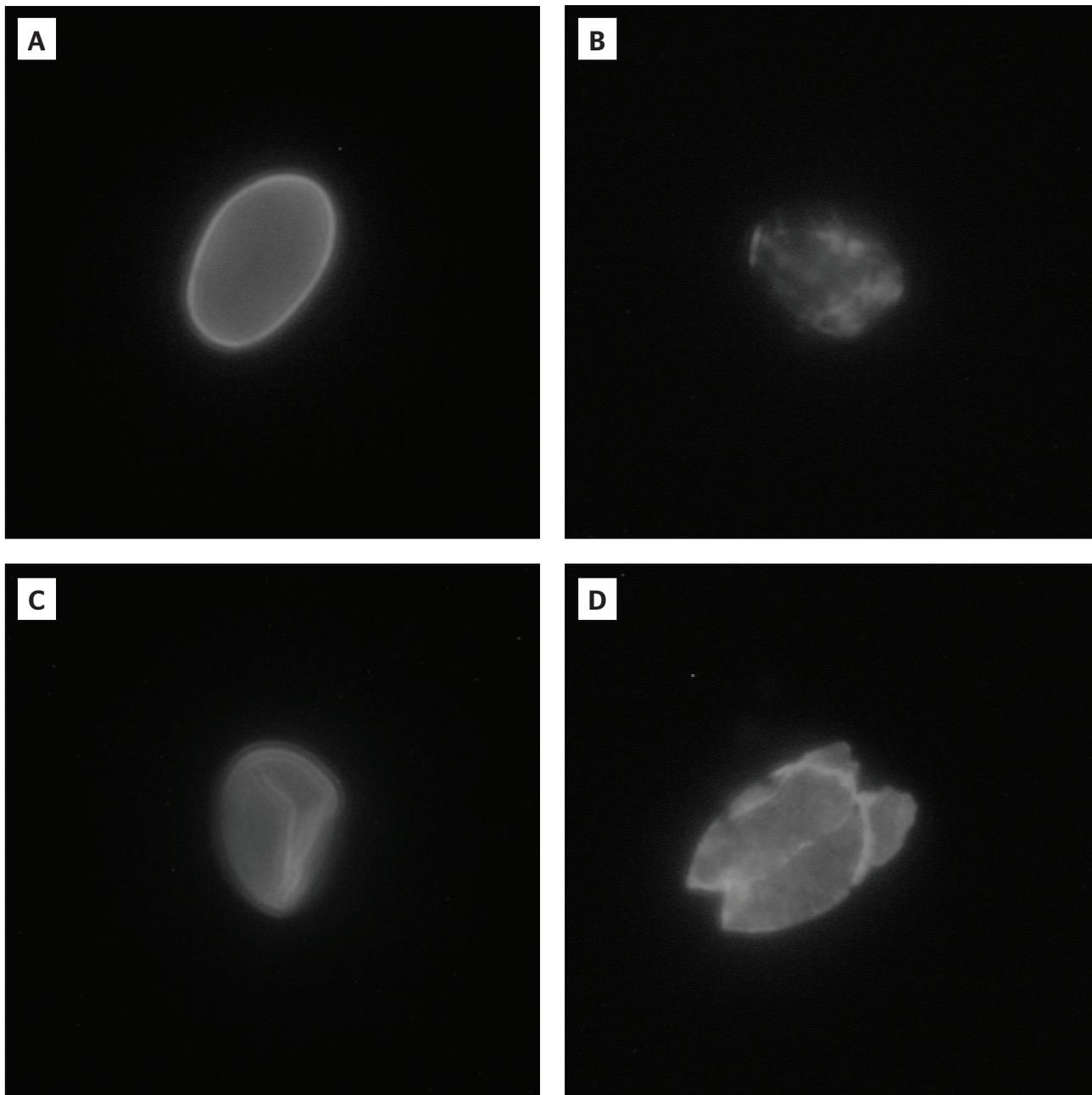


Figura 2 - Cisto de *G. duodenalis* observado com reação de imunofluorescência direta (600x), classificações A (A), B (B), C (C) e D (D).

Tabela 3 - Danos (%) observados nos cistos de *G. duodenalis* após aplicação do processo oxidativo avançado.

Dano	Dose de UV 5.472 mW s cm ⁻² 6x10 ³ mg L ⁻¹ H ₂ O ₂	Dose de UV 2.736 mW s cm ⁻² 6x10 ³ mg L ⁻¹ H ₂ O ₂	Dose de UV 44 mW s cm ⁻² 15 mg L ⁻¹ H ₂ O ₂
A	54	65	54,7
B	11	23	41,5
C	32	8	3,8
D	3	4	0

UV: ultravioleta.

Tabela 4 - Redução média (%) dos cistos de *G. duodenalis* após aplicação do processo oxidativo avançado.

	Dose de UV 5.472 mW s cm ⁻² 6x10 ³ mg L ⁻¹ H ₂ O ₂	Dose de UV 2.736 mW s cm ⁻² 6x10 ³ mg L ⁻¹ H ₂ O ₂	Dose de UV 44 mW s cm ⁻² 15 mg L ⁻¹ H ₂ O ₂
Redução do número de cistos	32,4	62,6	40,6

UV: ultravioleta.

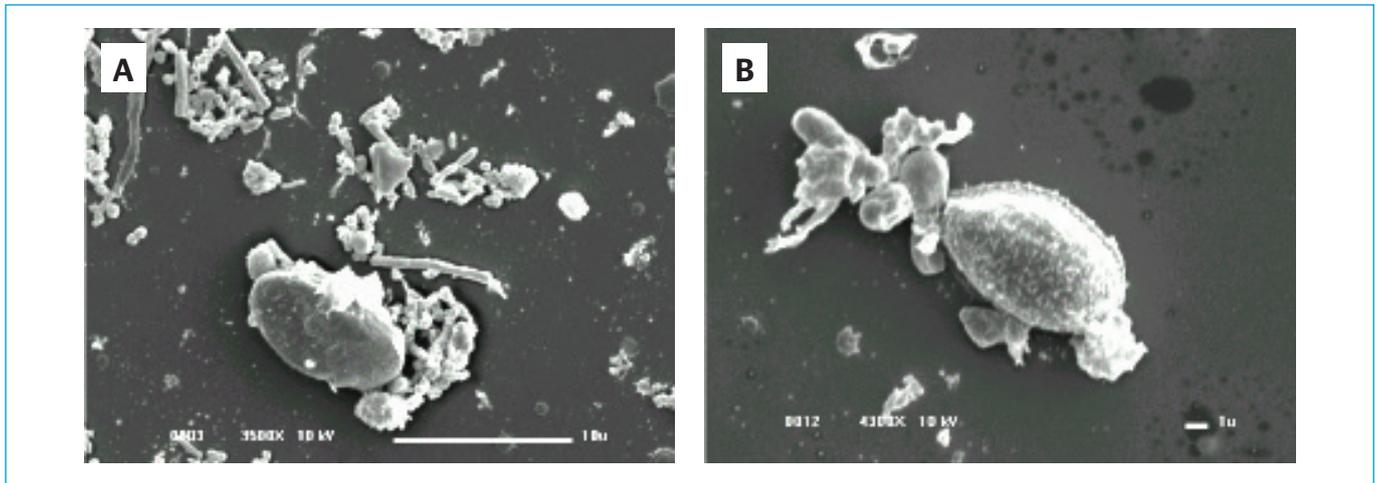


Figura 3 - Cisto de *G. duodenalis* em amostra bruta 3.500x (A) e após processo oxidativo avançado 4.300x (B).

hidrogênio (contato de 5,5 s) alterou cerca de 52% da fluorescência dos cistos de *G. duodenalis*, porém com pouca ação em alterar a forma dos cistos (classificações C e D) (Tabela 5). A redução do número de cistos foi observada em apenas duas das três condições experimentais avaliadas: com a alta e a baixa concentração do oxidante (Tabela 6).

A observação com MEV mostrou retrações de membrana e alterações na superfície nos organismos somente após o POA (Figura 3B). A peroxidação causou, em média, alteração de fluorescência ou forma em apenas 29,4% dos cistos submetidos a esse processo.

A parede dos cistos de *G. duodenalis* possui 43% de carboidratos, sendo formada basicamente de um complexo de carboidratos e peptídeos (ERLANDSEN *et al.*, 1996). Segundo Ferreira e Matsubara (1997), o radical hidroxila pode reagir e inativar as proteínas que compõem as membranas celulares, oxidando seus grupos sulfidrilas (-SH) e as pontes de dissulfeto (-SS), provocando descharacterização e alteração das propriedades dessas membranas.

A destruição de um micro-organismo ocorre em função da oxidação da parede celular e, conseqüentemente, de seu rompimento. Essa ação leva ao extravasamento celular, a difusão do oxidante por toda a célula, atingindo e danificando enzimas que comprometem a síntese proteica (GUIMARÃES *et al.*, 2004).

A peroxidação lipídica provoca alterações na estrutura da membrana, como redução da permeabilidade, ou mesmo outras mudanças que produzam deterioração na organização interna da membrana (LABAS *et al.*, 2008). Isso explica as alterações de forma e/ou características de fluorescência que puderam ser observadas por MEV e RID, respectivamente, na parede cística de *G. duodenalis*, após os processos estudados.

Mesmo com a redução no número de organismos pelos processos, a taxa média de recuperação de tais estruturas, após POA e peroxidação, foi de cerca de 55 e 77%, respectivamente, permitindo um número consistente de organismos para observação de dano.

Comparando os resultados, o POA foi o processo que causou maior redução no número e dano à parede de cistos *G. duodenalis*, independentemente da concentração de peróxido de hidrogênio e da dose de UV utilizada.

Tabela 5 - Danos observados nos cistos de *G. duodenalis* após aplicação da peroxidação (%).

Dano	6x10 ³ mg L ⁻¹ H ₂ O ₂ 60 minutos	6x10 ³ mg L ⁻¹ H ₂ O ₂ 30 minutos	15 mg L ⁻¹ H ₂ O ₂ 5,5 segundos
A	75	89	47,7
B	25	7	51,8
C	0	2	0,5
D	0	2	0

Tabela 6 - Redução média (%) dos cistos de *G. duodenalis* após aplicação da peroxidação.

	6x10 ³ mg L ⁻¹ H ₂ O ₂ 60 minutos	6x10 ³ mg L ⁻¹ H ₂ O ₂ 30 minutos	15 mg L ⁻¹ H ₂ O ₂ 5,5 segundos
Redução do número de cistos	37,2	0	30,8

CONCLUSÕES

A peroxidação assistida por radiação UV foi o melhor processo para reduzir o número de organismos e alterar a sua fluorescência, independentemente da dose de UV e da concentração do oxidante utilizado.

Quando utilizada a menor dose de radiação UV e concentração do oxidante, foi observada uma maior porcentagem de organismos com alteração de fluorescência, indicando a possibilidade de sua aplicação prática.

Estes resultados sugerem o POA como possível agente de inativação de protozoários.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (nº 2008/52796-5) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) (nº 471487/2007-4), pelo suporte financeiro concedido a este trabalho.

REFERÊNCIAS

- ALUM, A.; BASEL, S.; ASAAD, H.; RUBINO, J.R.; IJAZ, M.K. (2012) ECC-RT-PCR: a new method to determine the viability and infectivity of *Giardia* cysts. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 16, p. e350-e353.
- APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. (2005) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20 ed. Washington, DC: APHA.
- BALDURSSON S. & KARANIS, P. (2011) Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks e an update 2004 e 2010. *Water Res*, v. 45, n. 20, p. 6603-6614.
- BARBEE, S.L.; WEBER, D.J.; SOBSEY, M.D.; RUTALA, W.A. (1999) Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity by disinfection and sterilization processes. *Gastrointestinal endoscopy*, v. 49, n. 5.
- BOZZOLA, J.J. & RUSSELL, L.D. (1999) *Electron microscopy: principles and techniques for biologists*. 4 ed. Sudbury: Jones and Bartlett Publishers, p. 49-71.
- CACCIÒ, S.M. & RYAN, U. (2008) Molecular epidemiology of giardiasis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 160, p. 75-80.
- CLANCY, J.L.; BUKHARI, Z.; STERLING, C.R.; MARSHALL, M.M.; KORICH, D.G.; SCHAEFER III, F.W.; et al (2000) Cell culture method not yet viable. *Journal American Water Works Association*, v. 92, n. 4, p. 4-6.
- CORDEIRO, A.C. de S.; LEITE, S.G.F.; DEZOTTI, M. (2004) Inativação por oxidação fotocatalítica de *Escherichia coli* e *Pseudomonas* sp. *Química Nova*, v. 27, n. 5, p. 689-694.
- DOMÈNECH, X.; JARDIM, W.F.; LITTER, M.I. (2001) Procesos avanzados de oxidación para la eliminación de contaminantes. In: *Eliminación de Contaminantes por Fotocatálisis Heterogénea*, cap. 1, Rede CYTED, La Plata.
- ERLANDSEN, S.L.; MACECHKO, P.T.; KEULEN, H.V.; JARROLL, E.L. (1996) Formation of the *Giardia* cyst wall: studies on extracellular assembly using immunogold labeling and high resolution field emission SEM. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 43, n. 5, p. 416-429.
- FERREIRA, A.L.A. & MATSUBARA, L.S. (1997) Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 43, n. 1, p. 61-68.
- FRANCO, R.M.B.; ROCHA-EBERHARDT, R.; CAUNTSIO NETO, R. (2001) Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw water from the Atibaia river, Campinas, Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 43, n. 2, p. 109-111.
- GUADAGNINI, R.A.; SANTOS, L.U.; FRANCO, R.M.B.; GUIMARÃES, J.R. (2013) Inactivation of bacteria and helminth in wastewater treatment plant effluent using oxidation processes. *Water Science & Technology*, v. 68, n. 8, p. 1825-1829.
- GUIMARÃES, J.R. & BARRETTO, A.S. (2003) Photocatalytic inactivation of *Clostridium perfringens* and coliphages in water. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 20, n. 4, p. 403-411.
- GUIMARÃES, J.R.; IBÁÑEZ, J.; LITTER, M.I.; PIZARRO, R. (2004) *Eliminación de contaminantes por fotocatálisis heterogénea*. 1 ed. Madrid: Editorial Ciemat, p. 375-388.
- GUIMARÃES, J.R.; SANTOS, L.U.; FRANCO, R.M.B.; GUADAGNINI, R.A. (2014) *Giardia duodenalis*: number and fluorescence reduction caused by the advanced oxidation process (H₂O₂/UV) 2014; *International Scholarly Research Notices*, v. p. 7.
- HARGREAVES, A.; TAIWO, F.A.; DUGGAN, O.; KIRK, S.H.; AHMAD, S.I. (2007) Near-ultraviolet photolysis of b-phenylpyruvic acid generates free radicals and results in DNA damage. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 89, p. 110-116.
- LABAS, M.D.; ZALAZAR, C.S.; BRANDI, R.J.; CASSANO, A.E. (2008) Reaction kinetics of bacteria disinfection employing hydrogen peroxide. *Biochemical Engineering Journal*, v. 38, p. 78-87.
- LIANG, Z. & KEELEY, A. (2012) Comparison of propidium monoazide-quantitative PCR and reverse transcription quantitative PCR for viability detection of fresh *Cryptosporidium* oocysts following disinfection and after long-term storage in water samples. *Water Research*, v. 46, p. 5941-5953.
- MAHBUBANI, M.H.; BEJ, A.K.; PERLIN, M.H.; SCHAEFER III, F.W.; JAKUBOWSKI, W.; ATLAS, R.M. (1992) Differentiation of *Giardia duodenalis* from other *Giardia* spp. by using Polymerase Chain Reaction and gene probes. *Journal Clinical Microbiology*, v. 30, p. 74-78.
- MATTOS, I.L.; SHIRAIISHI, K.A.; BRAZ, A.D.; FERNANDES, J.R. (2003) Peróxido de Hidrogênio: Importância e Determinação. *Química Nova*, v. 26, n. 3, p. 373-380.
- QUILEZ, J.; SANCHEZ-ACEDO, C.; AVEDAÑO, C.; DEL CACHO, E.; LOPEZ-BERNAD, F. (2005) Efficacy of Two Peroxygen-Based Disinfectants for Inactivation of *Cryptosporidium parvum* Oocysts. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 5, p. 2479-2483.
- REDLINGER, T.; CORELA-BARUD, V.; GRAHAM, J.; GALINDO, A.; AVITIA, R.E.; CARDENAS, V. (2002) Hyper endemic *Cryptosporidium* and *Giardia* in households lacking municipal sewer and water on the United States - México border. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 66, n. 6, p. 794-798.
- RODRIGUES-SILVA, C.; MANIERO, M.G.; RATH, S.; GUIMARÃES, J.R. (2013) Degradation of flumequine by photocatalysis and evaluation of antimicrobial activity. *Chemical Engineering Journal*, v. 224, p. 46-52.
- RYU, H.; GERRITY, D.; CRITTENDEN, J.C.; ABBASZADEGAN, M. (2008) Photocatalytic inactivation of *Cryptosporidium parvum* with TiO₂ and low-pressure ultraviolet irradiation. *Water Research*, v. 42, p. 1523-1530.
- SAKAMOTO, G.; SCHWARTZEL, D.; TOMOWICH, D. (2001) UV disinfection for reuse applications in North America. *Water Science and Technology*, v. 43, n. 10, p. 173-178.
- SHIN, G.A.; LINDEN, K.G.; FAUBERT, G. (2009) Inactivation of *Giardia lamblia* cysts by polychromatic UV. *Letters in Applied Microbiology*, v. 48, p. 790-792.
- SMITH, A.L. & SMITH, H.V. (1989) A compararison of fluorescein diacetate and propidium iodide staining and in vitro excystation for determining *Giardia intestinalis* cyst viability. *Parasitology*, v. 99, p. 329-331.
- USEPA - US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. (2012) EPA- 816-R-12-001. Method 16231: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA. Office of Water. Washington: US Environmental Protection Agency.
- WEIR, S.C.; POKORNY, N.J.; CARRENO, R.A.; TREVORS, J.T.; LEE, H. (2002) Efficacy of Common Laboratory Disinfectants on the Infectivity of *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Cell Culture. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, n. 5, p. 2576-2579.
- WIDMER, G.; CLANCY, T.; WARD, H.D.; MILLER, D.; BATZER, G.M.; PEARSON, C.B.; et al. (2002) Structural and biochemical alterations in *Giardia lamblia* cysts exposed to ozone. *Journal of Parasitology*, v. 88, n. 6, p. 1100-1106.