

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PATRICIA PADILHA RIBEIRO



**PADRONIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE PROTOCOLO PARA
DETECÇÃO DE OVOS DE HELMINTOS EM AREIA DE PRAIAS
DO LITORAL PARANAENSE**

Orientador: Prof. Dr. Diego Averaldo Guiguet Leal

CURITIBA

2016

PATRICIA PADILHA RIBEIRO

**PADRONIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE PROTOCOLO PARA DETECÇÃO DE
OVOS DE HELMINTOS EM AREIA DE PRAIAS DO LITORAL
PARANAENSE**

Monografia apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Paraná, sob orientação do Prof. Dr. Diego Averaldo Guiguet Leal

CURITIBA

2016

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, pela força e pelo sonho que hoje se concretiza.

Aos meus pais que tanto amo Sirlene e Sebastião pela determinação e luta na minha formação, pelo incentivo nas horas difíceis e por não medirem esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida.

A minha irmã Priscila Ribeiro minha fiel amiga, que sempre me apoiou e serviu de exemplo para mim.

Aos presentes que ganhei durante a graduação e que pretendo levar para a vida: Amanda, Anankha, Fabiolla, Felipe, Juliane, Lucas, Maíra, Matheus, Pedro Henrique, Vinicius, Tainá e Thiago.

Agradeço especialmente a Gislaine Teixeira pelo suporte durante os experimentos.

A minha primeira orientadora Prof^a Dr^a Márcia Shimada, pelos ensinamentos tão importantes para a realização deste trabalho.

Ao Prof^o Dr^o Diego Averaldo Guiguet Leal por transmitir seu conhecimento com tanta dedicação durante a orientação, dando seu máximo e arranjando sempre uma solução para os problemas que surgiam.

A todos vocês, meu muito obrigado!

RESUMO

O solo é considerado uma importante fonte de disseminação de geohelmintoses. Cerca de dois bilhões de pessoas no mundo estão infectadas por algum parasito adquirido através do contato com o mesmo. As praias são importantes fontes de aquisição de parasitos intestinais, tanto através do contato com a água ou solo. O isolamento de ovos de helmintos a partir de diferentes tipos de solos representa um grande desafio, visto que não existe uma legislação padrão que indique a pesquisa destes parasitos em areia e também, inexistente um método devidamente padronizado para a recuperação de ovos presentes no ambiente. A variabilidade dos resultados encontrados na literatura pode ser atribuída não apenas devido às condições ambientais e epidemiológicas associadas a diferentes parasitoses, mas também à diversidade dos métodos empregados. Em adição, diversos protocolos para a recuperação de elementos parasitários, muitas vezes valem-se de adaptações de métodos utilizados na rotina clínica para a detecção de patógenos. Diante do exposto, este estudo teve como objetivo principal realizar a padronização de um método de detecção de ovos de helmintos mediante contaminação artificial de amostras de areia de diferentes praias do litoral paranaense, tendo como modelo ovos de *Ascaris suum* e, aplicar o método padronizado para a detecção de ovos eventualmente presentes no ambiente. Um número conhecido de ovos foi inoculado em amostras de areia esterilizadas. Foram testados oito tipos de tratamentos: homogeneização (com vórtex e agitador magnético), solução de dispersão (Glicina e Tween 80) e tempo de contato (5 min ou 1 hora). O tratamento que apresentou a maior eficiência de recuperação de ovos (41,63 %) foi a homogeneização feita com vórtex, aplicação de Glicina como solução de dispersão e tempo de contato de uma hora. Ao analisar as amostras de areia da praia de Matinhos, foram detectados ovos de *Trichuris* spp. Amostras fecais recolhidas da mesma praia, e analisadas por diferentes técnicas parasitológicas, revelaram grande concentração de ovos de ancilostomatídeos. O protocolo escolhido para padronização da metodologia de detecção de ovos de helmintos em areia mostrou boa aplicabilidade, considerando-se a eficiência de recuperação alcançada. Os resultados denotam a má qualidade higiênico-sanitária das praias analisadas, devido à contaminação por fezes humanas ou animais e, um provável risco de aquisição de helmintoses, inclusive por espécies zoonóticas, pela população autóctone ou de turistas que visitam estes locais. Além disso, reforçam a necessidade de estabelecer o monitoramento de parasitos nestas áreas recreacionais, com a finalidade de garantir a qualidade sanitária e minimizar os riscos em saúde pública.

Palavras chaves: Geohelmintos; Padronização de protocolo; *Ascaris suum*.

ABSTRACT

Soil is considered an important source of dissemination of Soil Transmitted helminthiasis (STHs). About two billion people in the world are infected with some parasite, acquired through contact with the soil. Beaches are important sources of infection by intestinal parasites, either by contact with water or soil. The isolation of helminthes eggs from different types of soils is considered a great challenge, since there is no standard legislation that indicates its search in sand. Moreover, there is no properly standardized method available for the recovery of eggs present in the environment. The variability of the results which may be found in the literature can be attributed not only due to the environmental and epidemiological conditions associated within different parasitosis, but also with the diversity of the methodologies employed to perform their detection. In addition, several protocols utilized to recovery parasitic elements, often rely on adaptations of methods used in clinical routine for the detection of pathogens. Therefore, this study aimed to perform a standardized methodology for detection of helminthes eggs through artificial contamination of sand samples of different beaches from Paraná coast, using *Ascaris suum* eggs as a model, and utilize the methodology proposed to search for helminthes eggs in environmental samples. A known number of eggs were inoculated into sterilized sand samples. For this, 8 treatments were evaluated: homogenization (using vórtex or magnetic stirrer), dispersion solution (Glycin or Tween 80) and contact time (5 min or 1 hour). The treatment which presented the higher recovery efficiency of eggs (41.63%) was the homogenization done with vórtex, followed by the utilization of Glycin as the dispersion solution and contact time of 1 hour. When analyzing the sand samples from Matinhos beach, it was found eggs of *Trichuris* spp. Fecal samples harvested from the same beach, analyzed through different parasitological techniques, revealed huge concentration of hookworms. The protocol elected after series of treatments trials, proved to have good applicability for the detection of helminthes eggs, in accordance with the attained recovery efficiency. The results denote poor hygiene sanitary quality of the beaches analyzed in this study, since fecal contamination either by humans or animals were verified and, a possible risk of acquisition of helminthiasis, including those with zoonotic potential, specially by autochthonous population or by tourists that visit these places. Indeed, the results reinforce the need of establishing the monitoring of parasites in theses recreational areas, to ensure sanitary quality and minimize the risks inherent in public health.

Keywords: Geohelminths; Standardization protocol; *Ascaris suum*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Pesquisa de geohelmintos em diferentes matrizes de solo.....	26
Tabela 2- Resultados da contagem de ovos presentes em 1µL para padronização do inóculo. .	39
Tabela 3- Eficiência de recuperação do tratamento 1 (Vórtex + Tween 80 + 5 min).	40
Tabela 4 - Eficiência de recuperação do tratamento 2 (Vórtex + Tween 80 + 1h).	411
Tabela 5 - Eficiência de recuperação do tratamento 3 (Vórtex + Glicina+ 5min)	41
Tabela 6 - Eficiência de recuperação do tratamento 4 (Vórtex + Glicina + 1h)	42
Tabela 7 - Eficiência de recuperação do tratamento 5 (Agitador Magnético + Glicina + 5 min).	43
Tabela 8 - Eficiência de recuperação do tratamento 6 (Agitador Magnético + Glicina + 1h) ...	43
Tabela 9 - Eficiência de recuperação do tratamento 7 (Agitador Magnético + Tween 80 + 5 min)	43
Tabela 10 - Eficiência de recuperação do tratamento 8 (Agitador Magnético + Tween 80+ 1h)	44
Tabela 11 - Contaminação ambiental por ovos de helmintos parasitos nas areias de diferentes praias analisadas no presente estudo.	45
Tabela 12 - Resultado das análises parasitológicas de amostras de fezes coletadas em matinhos, processadas por diferentes métodos.	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Proporção de crianças por país que necessitam de tratamento contra geohelmintoses, de acordo com a última revisão feita pela OMS (2015).....	11
Figura 2 - Mapa representativo dos pontos de coleta de areia de praias do litoral paranaense ...	29
Figura 3- Coleta de amostras de areia	30
Figura 4 - Retirada do útero de fêmea de <i>Ascaris suum</i> para obtenção do inóculo.....	31
Figura 5- Formação de grumos de ovos de <i>Ascaris suum</i> durante a produção do inóculo.	32
Figura 6- Amostras de fezes em Matinhos.....	35
Figura 7 - Etapa de homogeneização do solo utilizando o aparelho vórtex.....	40
Figura 8 - Homogeneização do solo como agitador magnético	42
Figura 9 - Recuperação de ovos de <i>Ascaris suum</i> em diferentes tratamentos.....	44
Figura 10 - Ovo de <i>Trichuris</i> spp., encontrado na areia da praia de matinhos, visualizado em aumento de 10x	45
Figura 11 - Ovo de ancilostomatídeo blastomerado, aumento 10x.....	47
Figura 12 - ovos de ancilostomatídeo larvados - aumento de 10 x.....	47
Figura 13 - Formação de bolhas nos tratamentos que utilizam o Tween 80 como solução de dispersão.....	50
Figura 14 - Língua negra (seta branca), presença de cães e placa indicando a qualidade de balneabilidade de uma das praias, como imprópria para banho.....	54

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2 JUSTIFICATIVA.....	4
3 OBJETIVOS	5
3.1 Objetivo Geral.....	5
3.2 Objetivos Específicos.....	5
4. REVISÃO DA LITERATURA.....	6
4.1 Contaminação ambiental de praias: considerações gerais.....	6
4.2 Geohelminthos	10
4.2.1 <i>Ascaris lumbricoides</i>	12
4.2.2 <i>Trichuris trichiura</i>	16
4.2.3 Ancilostomatídeos.....	18
4.2.3.1 Larva Migrans Cutânea (LMC).....	20
4.2.4 <i>Toxocara</i> spp.....	21
4.2.4.1 Larva Migrans Visceral.....	22
4.2.4.2 Larva migrans ocular.....	24
4.3 Sanidade parasitológica de areias.....	24
5 MATERIAL E MÉTODOS	28
5.1 Levantamento de dados e de bibliografia em periódicos	28
5.2 Local De Estudo.....	28
5.3 Coleta das amostras de areia	29
5.4 Experimentos de contaminação artificial das areias.....	30
5.4.1 Obtenção do Inóculo	30
5.4.2 Tipos de tratamento empregados para recuperação de ovos.	33
5.5 Exame parasitológico de fezes.	35
5.5.1 Método de sedimentação espontânea (Hoffman, Pons e Janer, 1934)	35
5.5.2 Método de Flutuação em solução saturada de cloreto de sódio – Método de Willis (Willis, 1921).	36
5.5.3 Método de centrífugo-flutuação em solução saturada de sulfato de zinco (Método de Faust e cols, 1938).....	36
5.5.4 Centrifugo-sedimentação em formol-éter ou Método de Ritchie modificado (Ritchie, 1948; Knight et al., 1976).....	37
6. RESULTADOS.....	38

6.1 Levantamento de dados e bibliografia em periódicos	38
6.2 Experimentos de contaminação artificial.	38
6.3 Contaminação ambiental de areias por ovos de helmintos.....	45
6.4 Exame parasitológico de fezes	47
7. DISCUSSÃO.....	48
8 CONCLUSÃO	57
9 REFERÊNCIAS	58
10. APÊNDICES	65
10.1 Apêndice 1: Submissão de projeto para o edital da Fundação Araucária (2016).....	65
10.2 Apêndice 2: Submissão de projeto para o Edital Universal (2016).....	66
10.3 Apêndice 3: Metodologia padronizada.....	67

1. INTRODUÇÃO

As doenças parasitárias, especialmente as causadas por enteroparasitos, são consideradas um problema de saúde pública mundial contribuindo para elevadas taxas de morbidade e mortalidade, principalmente, nos países em desenvolvimento. Estimativas recentes referentes à prevalência mundial de importantes doenças parasitárias demonstram que dois bilhões de pessoas em todo o mundo albergam geohelminhos como *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Strongyloides stercoralis* e ancilostomatídeos (*Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus*) (Tanner et al., 2009; Oro et al., 2010; Plutzky, 2011).

A disseminação de enteroparasitos compreende múltiplos fatores, estando associada a práticas inadequadas de higiene pessoal, a deficiência ou inexistência de saneamento ambiental e à precária condição de vida de determinadas populações, bem como aos hábitos arraigados e relutância em modificá-los (Teixeira e Heller, 2004; WHO, 2005; Belloto et al., 2011).

Os dados de morbi-mortalidade associados às geohelmitoses, são relevantes devido aos danos causados à saúde humana, como má-absorção e obstrução intestinal, diarreia, anemia, menor capacidade de trabalho, baixo rendimento escolar e déficit no desenvolvimento físico e cognitivo em crianças, sendo intimamente relacionados à carga parasitária albergada pelo indivíduo (Teixeira e Heller, 2004; Fletcher et al., 2012).

O solo é considerado uma importante fonte de disseminação e infecção por geohelminhos principalmente para crianças, já que estas têm maior contato com o mesmo e por apresentar deficiências relacionadas aos hábitos de higiene. A contaminação de solos por geohelminhos deve-se primariamente à falta de saneamento básico, fossas sépticas com vazamento, escoamento urbano, defecação humana e em

extensão, pela circulação de animais que eliminam ovos e larvas de helmintos parasitos constituindo um potencial de contaminação zoonótico para o ser humano (Milano et al., 2002; Mentz et al., 2004).

Ressalte-se que o solo do tipo arenoso é um importante foco de infecção por parasitos devido a sua característica geológica, que possibilita a retenção de água nos poros, sendo essencial para sobrevivência de diversos helmintos, que encontram condições ideais, como umidade, temperatura e oxigenação para o embrionamento dos ovos ou desenvolvimento de estádios larvares (larvas rabditóides e filarióides) (Vinha, 1965; WHO, 2005; Santarém et al., 2009; Bellato, 2010). A contaminação de solos arenosos, como as areias de praias, merece especial menção, visto que o contato com a praia pode disseminar uma ampla gama de enteropatógenos de origem antroponótica e helmintos de caráter zoonótico - Síndromes de Larva Migrans Visceral e Cutâneas (WHO, 2003; Fletcher et al., 2012).

Os patógenos também são introduzidos majoritariamente nas areias das praias em decorrência do crescente descarte inadequado de lixo, dejetos de animais trazidos pelas águas de chuvas, e também devido às influências das marés (Hotez et al., 2009).

Em 1998 a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) realizou um estudo epidemiológico das principais praias do município, objetivando detectar e correlacionar a incidência de gastroenterites em banhistas e os índices de contaminação fecal das praias (Cetesb, 1998). Os resultados revelaram que nas praias mais poluídas, somente o contato com a areia já constituía fator de risco para a manifestação de sinais de diarreia, náuseas e vômitos. Além disso, constatou-se que na areia seca encontra-se maior contaminação por coliformes fecais e estreptococos fecais, quando comparado com a areia úmida e, que a principal fonte de contaminação da areia das praias são os cursos d'água e "lavagem" da areia pela água do mar.

A estreita relação com o ambiente faz com que os geohelminintos tenham um impacto patogênico importante tanto sobre o ser humano quanto sobre os animais. As síndromes de Larva Migrans Cutânea e Visceral estão entre as mais prevalentes em todo o mundo, incluindo os países industrializados (Pawlowki, 2001).

A porcentagem de solo contaminado por ovos de *Toxocara* spp. variou entre 12,0 a 60,3 % no Brasil, 14,4 a 20,6 % nos Estados Unidos da América, 13,0 a 87,1 % na Europa, 6,6 a 63,3 % na Ásia e 30,3 a 54,5 % na África. A elevada prevalência encontrada no território brasileiro pode ser explicada pelas condições ecológicas favoráveis ao desenvolvimento do ciclo biológico destes patógenos, ao tipo de solo que retém umidade e temperaturas elevadas (Rubinsky-Elefant et al., 2010; Wells 2007; Hotez et al., 2009).

Diferentes métodos são utilizados para a pesquisa de ovos de helmintos em areia de praias, praças, parques públicos entre outros, a partir de solos de tipo arenosos ou com outra composição. Ressalte-se, porém, que a maioria dos protocolos e / ou metodologias analíticas utilizadas nestes estudos para o isolamento e detecção de ovos de helmintos, não estabelecem a sensibilidade do método empregado para tal detecção.

A variabilidade dos resultados pode ser atribuída não apenas devido às condições ambientais e epidemiológicas, mas também à diversidade dos métodos empregados. Em adição, diversos protocolos para a recuperação de elementos parasitários, muitas vezes valem-se de adaptações de métodos utilizados na rotina clínica para a detecção de patógenos. Desta forma, torna-se relevante o desenvolvimento e padronização de metodologias que apresentem boa sensibilidade de isolamento e detecção de ovos de helmintos em diferentes matrizes de solo.

2 JUSTIFICATIVA

A padronização de metodologias de detecção para investigação de helmintos em solo é relevante, visto que existe a necessidade de determinação de padrões sanitários para a areia de praias, uma vez que não existem critérios oficiais regularmente estabelecidos por legislação.

O potencial de inovação deste trabalho consiste em gerar e difundir dados inexistentes no litoral do Paraná quanto à contaminação por organismos patogênicos e verificação da segurança sanitária das areias de diferentes praias do litoral paranaense.

Estes resultados permitirão embasamento para futuras decisões estratégicas, primeiramente em nível regional, para o desenvolvimento e estruturação de políticas públicas e, para a elaboração de proposta de criação de resolução estadual que contemple a pesquisa de organismos patogênicos.

As metodologias e procedimentos padronizados e / ou validados neste projeto servirão para investigação de patógenos e rastreamento das fontes de contaminação podendo ser replicado pelo setor público ou privado e, embasará o artigo 8º da Resolução do CONAMA Nº 274 / 2000 que recomenda aos órgãos ambientais a avaliação das condições parasitológicas e microbiológicas da areia, para futuras padronizações.

O Instituto Ambiental do Paraná (IAP) atua como parceiro no presente estudo e necessita destes dados para tal proposição.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Padronizar um método de detecção de ovos de helmintos em amostras de areia de praia mediante aplicação de diferentes experimentos de contaminação artificial tendo como modelo ovos de *Ascaris suum*.

3.2 Objetivos Específicos

- Aplicar o método padronizado que obtiver melhor sensibilidade de detecção de ovos de helmintos nas areias das praias selecionadas do litoral do Paraná, para verificar a ocorrência natural de ovos de helmintos e aferir a qualidade sanitária.
- Realizar ampla revisão da literatura em diferentes bases de dados nacionais e internacionais para elaboração e submissão de projetos de pesquisa em diferentes agências nacionais de fomento.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Contaminação ambiental de praias: considerações gerais

Na alta temporada, especialmente durante o verão, as cidades litorâneas recebem milhares de turistas, atraídos principalmente pelo lazer, sendo este período importante para a economia destas regiões devido ao turismo tornar-se a principal fonte de receita destes municípios.

A limpeza, qualidade da água e manejo de lixos são essenciais para manter a atratividade do litoral, por isso a importância da gestão da orla e o bom comportamento dos banhistas. No entanto, o aumento do contingente populacional no verão nem sempre é acompanhado da melhoria na infraestrutura de saneamento básico. O relatório da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB, 2009), ressaltou que muitas cidades brasileiras têm como destino comum, o imenso aporte de esgoto produzido, as praias uma vez que muitas se estabeleceram a beira mar com infraestrutura de saneamento deficiente, influenciando, desta forma, diretamente a qualidade das águas costeiras. (BIRD, 1996; WHO, 1998; Moore et al., 2013; Harder-Lauridsen et al., 2013).

A alta ocupação de turistas favorece a contaminação das areias e da água do mar, que recebem lixo, dejetos de animais ou poluição trazida pelo carreamento de água de chuvas, especialmente após períodos de precipitação, comuns durante o verão ou devido às marés. A ressuspensão de sedimento que contém altas densidades de microrganismos pode contribuir para que patógenos acumulados na areia sejam liberados para coluna de água, aumentando demasiadamente sua concentração (Wyn-Jones et al., 2012).

Além disso, a própria água do mar impactada por efluente doméstico, pode contaminar as areias das praias. Estudos realizados pela CETESB (2009) mostraram que a areia seca, areia úmida e a água do mar apresentam concentrações diferentes de microrganismos, sendo a areia seca mais contaminada, que a molhada. Independente do tipo de amostra analisada, diversos estudos apontaram um aumento da contaminação, concentração e disseminação de patógenos (bactérias, fungos, vírus e parasitos) no verão, correlacionados principalmente ao afluxo de turistas (Obiri-Danso et al.,1999; Kampbell et al., 2002; Vieira et al.,2002). Considera-se a areia da praia como importante foco de contaminação e disseminação de patógenos, sendo o local onde os turistas passam maior parte do tempo.

A ampla gama de patógenos que podem ser veiculados pela rota fecal-oral, por exemplo, quando ingeridos acidentalmente através de água, contato com a areia ou mesmo por ingestão de alimentos de origem marinha contaminados, pode representar um risco de aquisição de doenças gastrointestinais, oftálmicas ou dermatológicas para os banhistas (Moore et al, 2013).

Estima-se que o banho em águas litorâneas destinadas à recreação humana poluídas por resíduos fecais causam mais de 120 milhões de casos de doenças gastrointestinais e 50 milhões de casos de doenças respiratórias graves a cada ano (Shuval et al., 2003 ; AMBIENTE BRASIL, 2013).

De acordo com o *Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS, 2013)* somente 48,6 % da população brasileira tem acesso à coleta de esgoto. Mais de 100 milhões de brasileiros não tem acesso a este serviço e, somente 39,0 % de todo o esgoto gerado no país é tratado. No estado do Paraná, as estimativas revelam que 60,0 % dos paranaenses possuem coleta de esgoto e 63,75 % tratamento de esgoto,

porcentagem esta que posiciona o estado do Paraná com maior índice de tratamento de esgoto na região sul (SNIS, 2013). Entretanto, o saneamento do litoral paranaense é dissonante: na avaliação da infraestrutura e segurança sanitária realizada pela Secretaria de Estado do Turismo (SETU) o saneamento das praias paranaenses mostrou-se deficiente, pois de acordo com a Companhia de Saneamento do Paraná (Sanepar, 2013), o atendimento de esgoto das cidades do litoral são os seguintes: Matinhos (50,64 %), Pontal do Paraná (25,80 %) e Guaratuba (55,27 %).

No Brasil a qualidade sanitária das praias é avaliada seguindo a resolução do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) n° 274 de 29 de novembro de 2000, que estipula o compromisso de investigar a qualidade das águas destinadas para recreação, por meio de parâmetros padronizados, sendo considerada imprópria quando o valor obtido na última amostragem for superior a 2500 NMP / 100 mL para coliformes termotolerantes, ou 2000 NMP / 100 mL para *Escherichia coli* ou 400 NMP /100 mL para enterococos.

A Organização Mundial de Saúde (OMS, 2003), em sua publicação sobre critérios de qualidade para ambientes recreacionais naturais recomenda a realização de avaliações que permitam compreender a evolução da qualidade das areias das praias, pois além de promoverem a saúde da coletividade, pode ser importante ferramenta de gestão para a orla. No entanto, pouca atenção tem sido dada a qualidade das areias de praias no Brasil. O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) recomenda aos órgãos ambientais a avaliação da qualidade parasitológica e microbiológica da areia de praias para futuras padronizações de acordo com a Resolução n° 274 / 2000.

A Secretaria Municipal de Meio Ambiente (SMAC) do Rio de Janeiro foi pioneira e editou a Resolução n° 081 / 2000. Contudo, esta tinha caráter provisório de

dois anos e tratava apenas das condições bacteriológicas, não estabelecendo a análise para fungos e parasitos, assim como não estabelecia indicadores e os respectivos limites para esses microrganismos. Na ausência de padronização nos valores e metodologia para a avaliação da qualidade microbiológica da areia, no Rio de Janeiro, a prefeitura por meio de uma Resolução da Secretaria Municipal de Meio Ambiente (SMAC nº 468/10) estabeleceu limites máximos para classificação das areias para recreações de contato primário, não recomendando o contato com areias nas quais tenham sido determinadas concentrações superiores a 3800 NMP de *Escherichia coli* por 100g. A escolha desse valor foi baseada nos resultados das análises realizadas na areia de uma praia considerada limpa e sem influência de urbanização.

O Estado de São Paulo também estabeleceu uma legislação concernente a esse aspecto, Lei Estadual nº 14.366/2011 e outorga a CETESB o monitoramento das areias das praias do litoral, dos rios e represas do estado. No Paraná, também no ano de 2011, foi editado o projeto de lei nº 824 com o programa de limpeza e emissão de boletins da qualidade da areia do litoral pelo Instituto das Águas do Paraná da Secretaria Estadual de Meio Ambiente, apenas durante a alta temporada realizando apenas a análise de bactérias indicadoras de contaminação fecal.

Em seu relatório de 2015 a CETESB, destaca o quanto é laborioso classificar a areia da praia como apropriada ou não e também a importância de avaliações periódicas da qualidade da areia. Estas análises podem trazer informações importantes sobre a evolução da qualidade desse meio, medir a eficácia das medidas tomadas, como material para a educação sanitária dos frequentadores das praias e, sobre os riscos à saúde advindos do contato com areia contaminada e as maneiras de evitá-los. O mesmo relatório ressalta que além da dificuldade da representatividade da amostragem, não existe padrão de qualidade das areias associado ao risco à saúde, o que torna bastante

complexo e pouco eficaz o monitoramento das areias nos moldes empregados quanto à balneabilidade.

4.2 Geohelmintos

Geohelmintos são um grupo de parasitos nematóides que causam infecções em seres humanos e animais, devido ao contato com ovos ou larvas que se tornam infectantes no solo, com umidade e temperaturas adequadas, entre outros fatores (Bethony et al., 2006). Fazem parte deste grupo os nematódeos da classe Sercernentea, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*, *Strongyloides stercoralis* entre outros (Plutzky, 2011)

Estima-se que mundialmente 819 milhões de pessoas estão infectadas com *Ascaris lumbricoides*, 465 milhões com *T. trichiura*, e 439 milhões, com ancilostomatídeos (Pullan et al., 2014).

As geohelmintoses são doenças geralmente associadas à pobreza, à falta de acesso aos serviços de saúde, à ausência de infraestrutura de saneamento, à higiene pessoal inadequada, aos baixos níveis de educação e, às condições de moradia precárias. Por isso, representam um flagelo a mais para essas populações que vivem em condições de insalubridade e de inacessibilidade aos serviços básicos (Crompton e Nesheim, 2002; Silva et al., 2003; Silva et al., 2011).

As geohelmintoses compõem, junto com a Doença de Chagas, malária, esquistossomose e leishmaniose, a lista da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 17 doenças tropicais negligenciadas. Segundo Crompton e Nesheim (2002) a morbidade causada pelas geohelmintoses pode ser maior que aquela causada pela malária.

Bethony et al. (2006) afirmam que esta falta de atenção e investimentos para estas doenças ocorre por três motivos: pela cronicidade, por afetarem principalmente as populações menos favorecidas economicamente e pela grande dificuldade em quantificar seus efeitos na economia, no desenvolvimento e na educação. Porém, possuem grande importância em saúde pública devido ao impacto que causam no bem-estar das populações.

Estima-se que mais de dois bilhões de pessoas estejam infectadas por alguma geohelmintose. Destas, 800 milhões são crianças, sendo que entre 20,0 e 30,0 % dos infectados residem na América Latina (Ehremberg, 2002). A distribuição das geohelmintoses é global, sobretudo nas áreas rurais, em regiões quentes e úmidas, como as tropicais e equatoriais, pois o clima é extremamente importante para o desenvolvimento das larvas, que necessitam, de modo geral, de uma temperatura ótima entre 23 a 30 °C e, onde as condições sanitárias são inadequadas (Bethony et al., 2006; Brooker, 2010; Rocha et al., 2011). (Figura 1).

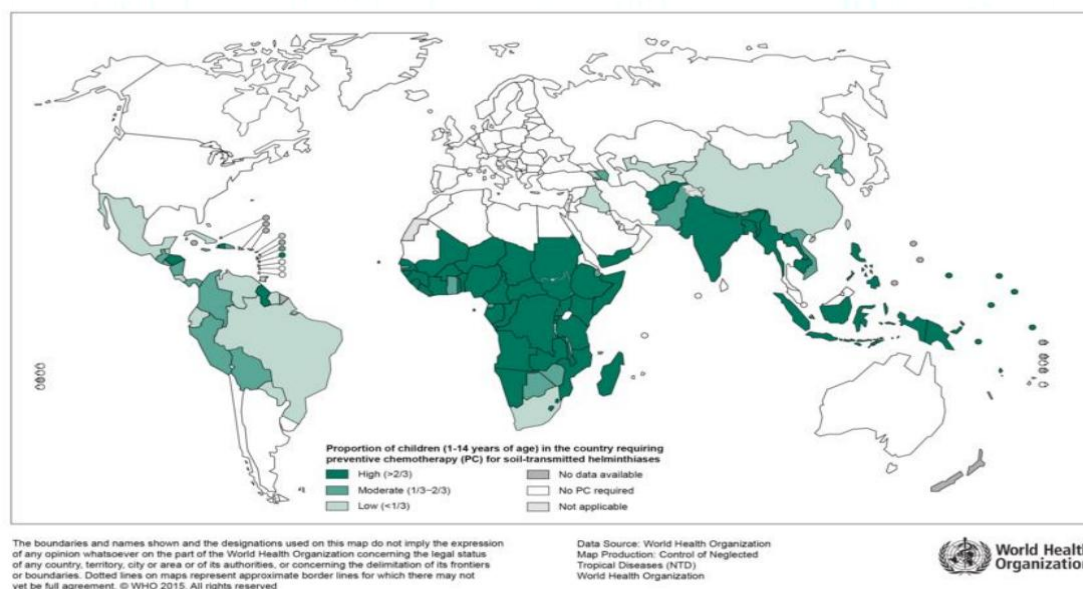


Figura 1 - Proporção de crianças por país que necessitam de tratamento contra geohelmintoses, de acordo com a última revisão feita pela OMS (2015).

Como o metabolismo e a via de transmissão destes parasitos são semelhantes, além de ocuparem o mesmo nicho ambiental e por produzirem em geral grande quantidade de ovos, é comum encontrar indivíduos parasitados com mais de uma espécie de helminto (poliparasitismo) (Melo, 2004; Ohja et al., 2014).

A patogenia está associada com a quantidade de vermes (carga parasitária) presentes na infecção e os sintomas são dependentes da espécie do helminto e do seu ciclo de vida. Dentre estes, destacam-se os transtornos nutricionais como, por exemplo, diminuição do apetite, da absorção de proteínas e gorduras, redução na absorção e utilização dos precursores da vitamina A, inadequada ingestão de micronutrientes, principalmente o zinco, folato e vitamina B12, perda de ferro e diminuição da atividade da enzima lactase (Tripathy et al., 1972; Brooker et al., 2010).

Esses distúrbios geram crescimento infantil deficiente, energia insuficiente para dar suporte ao desenvolvimento fetal em gestantes, ao trabalho em adultos e às atividades escolares em crianças. Contribuem também para obtenção de doenças relacionadas à deficiência de vitamina A, ao desenvolvimento de intolerância a lactose e à deficiência de ferro e anemia crônica (Crompton e Nesheim, 2002).

4.2.1 *Ascaris lumbricoides*

O *Ascaris lumbricoides* está amplamente distribuído sendo encontrado em quase todos os países do mundo. A frequência da infecção está relacionada com as características do parasito como a elevada produção de ovos pelas fêmeas, que depositam cerca de 200.000 ovos não embrionados por dia. Estima-se que um único verme pode liberar até 27 milhões de ovos durante o curso de uma infecção (China et al.2014; Ojha et al., 2014).

Diversos fatores ambientais influenciam na dispersão e epidemiologia da parasitose, entre eles: a resistência à dessecação, a manutenção da viabilidade dos ovos por meses ou anos no ambiente, ausência de saneamento básico, presença de contaminação fecal do solo e, uma estreita relação com o grau de desenvolvimento socioeconômico da população (Bogitsh et al., 2013).

Dentre as enteroparasitoses, a ascariíase é a helmintíase de maior prevalência no mundo acometendo cerca de 30,0 % da população mundial sendo mais comum em crianças por estarem mais expostas ao solo, frequentemente estarem na fase oral e, por apresentarem hábitos de higiene deficientes (Costa - Macedo et al., 1999; Crua, 2003; Bogitsh et al., 2013).

As principais vias de transmissão se relacionam com a ingestão de água e alimentos contaminados com os ovos, sendo também transmitidos por vetores mecânicos (Bethony et al., 2006; Melo et al., 2011). Os ovos depositados no solo são resistentes à dessecação, mas quando férteis são muito sensíveis a temperaturas ambientais. Os ovos férteis, eliminados pelas fezes dos hospedeiros, irão embrionar no meio externo, em condições ótimas como: temperatura entre 25 °C e 30 °C, umidade mínima de 70% e oxigênio em abundância, podendo estar infectantes (apresentando o estágio de L3 – filarióide) em cerca de 15 dias. (Ojha et al., 2013)

O desenvolvimento dos ovos cessa a temperaturas inferiores a 15,5 °C e não sobrevivem quando expostos por aproximadamente uma hora à temperatura constante superior a 45° C. Ademais, podem retomar a sua cadeia evolutiva quando recolocados em meio úmido sendo muito resistentes a uma variedade de agentes físicos e químicos (Neves, 2011; Bogitsh et al., 2013).

Após a ingestão dos ovos larvados contendo a L3, esses atravessam todo o trato digestório e eclodem no intestino delgado. As larvas dirigem-se ao ceco e cólon, penetram pela mucosa intestinal e chegam ao sistema porta e depois ao fígado. Ganham a veia cava e seguem para o coração e, posteriormente irão realizar o ciclo de Looss, com passagem obrigatória pelo pulmão. Neste órgão, realizam uma muda (L4) e sequencialmente, nos alvéolos pulmonares, diferenciam-se em L5.

As larvas encaminham-se para a faringe podendo seguir dois caminhos, ser expelidas ou deglutidas. Uma vez deglutidas, chegam ao intestino delgado, transformam-se em adultos jovens em cerca de 20 a 30 dias após a infecção e alcançam a maturidade sexual em 60 dias. Os vermes adultos realizam a cópula e a fêmea grávida realiza a oviposição, eliminando ovos pelas fezes do hospedeiro. A duração do ciclo evolutivo, de ovo a ovo (período pré-patente) requer um mínimo de dois meses, nas condições mais favoráveis. A longevidade dos *Ascaris* adultos é estimada de um a dois anos (Rey, 2011; Bogitsh et al., 2013).

A patogenicidade da ascaridíase é influenciada por vários fatores como: local onde os parasitos se alojam, carga parasitária, a fase de desenvolvimento em que se encontram, bem como a condição do hospedeiro, idade, estado imunitário e nutricional (Dold e Holland, 2011; Yap, Utzinger, Hattendorf e Steinmann, 2014).

Quando os vermes são abundantes, as larvas migratórias passam por diferentes órgãos podendo desencadear enterite hemorrágica, hepatomegalia, reações alérgicas e induzir a síndrome de Löeffler, que é caracterizada por febre, tosse seca, dor torácica, infiltrados pulmonares, dispnéia e falta de ar durante o esforço. As migrações nos pulmões desenvolvem uma resposta inflamatória do hospedeiro vigorosa que inclui níveis elevados de IgE sérica e eosinofilia. A gravidade dessas doenças está

correlacionada ao número de larvas que migram simultaneamente (Beaver, 1975; Doria et al., 2000; Hotez, 2000)

Quando a carga parasitária exibida pelo indivíduo é elevada, pode ocorrer oclusão (obstrução) intestinal devido ao enovelamento de vermes, bloqueando o fluxo de líquidos orgânicos, a passagem de alimentos e exercendo pressão sobre órgãos, podendo também ocorrer lesões na parede intestinal, por formação de massas volumosas no interior do intestino que acabam por dilatar e romper a mesma. Recomenda-se intervenção cirúrgica para evitar a formação do “bolo” de *Ascaris* quando o parasito se enovela. (Doria et al., 2000; Crua, 2003; Mota et al., 2004).

Igualmente importante nesta questão da patogenicidade, são as suas localizações ectópicas, decorrentes de migrações erráticas que podem provocar abscessos, perfurações e obstruções, por exemplo nas vias aéreas, ou nos canais pancreáticos causando pancreatites, entre outros. A digestão pode ser prejudicada, sendo o verme capaz de exercer ação espoliativa competindo com o hospedeiro por proteínas, carboidratos e vitaminas, especialmente A e C. Ainda, pode exercer ação tóxica devido à liberação de antígenos parasitários pelo helminto (Grasberger et al., 1994; Hotez, 2000; Dold e Holland, 2011; Moraes et al., 2008).

Apesar de ser uma doença cosmopolita, a maior parte das infecções ocorrem nos continentes Asiático (73,0 %), África (12,0 %) e América Latina (8,0 %). Nos Estados Unidos, há quatro milhões de pessoas infectadas, localizadas, sobretudo, em comunidades de imigrantes vindos de países em desenvolvimento. Sua ocorrência é muitas vezes irregular dentro de cada país: a prevalência na Nigéria, por exemplo, varia de 0,9 a 98,2 %. Em aldeias de Gana, também encontra-se uma enorme variabilidade

nas taxas de infecção - de 0 a 76,0 %. Condições climáticas têm um importante papel nas taxas de infecções. (Neves, 2011; Bogitsh et al., 2013)

Em geral, a prevalência é menor em regiões áridas, sendo, contudo, relativamente alta onde o clima é úmido e quente, condição ideal para a sobrevivência e o embrionamento dos ovos. Além disso, áreas desprovidas de saneamento com alta densidade populacional contribuem significativamente para o aumento da carga da doença. (Neves, 2011; Bogitsh et al., 2013; WHO, 2014).

No Brasil a prevalência do *Ascaris lumbricoides* varia regionalmente: no Maranhão, Silva *et al.*, (2011) encontraram ovos do helminto parasito em 53,6 % das amostras fecais analisadas; no Rio Grande do Sul a prevalência detectada foi de 47,0 % (Basso et al., 2008), em Minas Gerais 59,5% (Campos et al., 2002), na Bahia 48,3% (Santos - Junior et al., 2006), no Amazonas 68,1% (Silva et al., 2009) e no Paraná em Goioerê a prevalência foi de 39,2% (Oliveira et al., 2010).

4.2.2 *Trichuris trichiura*

O verme *Trichuris trichiura* é um geohelminto parasito do intestino grosso de seres humanos, sendo seus ovos eliminados pelas fezes do hospedeiro em estado não infectante. No solo quente e úmido, se desenvolvem e tornam-se infectantes entre 15 e 30 dias (Fortes, 2004).

Após a ingestão dos ovos por diferentes vias de transmissão (mãos, alimentos ou água contaminada), ocorre a eclosão no intestino delgado, e a liberação de larvas que amadurecem e transformam-se em adultos no cólon, sem a realização do ciclo de Looss (Márquez-Navarro et al., 2012).

As localizações primárias dos vermes adultos são as regiões do ceco e cólon ascendente. As fêmeas começam a oviposição 60-70 dias após a infecção, eliminando entre 3.000 e 20.000 ovos por dia. Sobrevivem cerca de dois anos no corpo do hospedeiro, porém, há relatos de infecções com duração de 8 anos ou mais. (Neves, 2011; Bogitsh et al., 2013)

A gravidade da tricuriase depende da carga parasitária, mas também está relacionada a fatores como idade do hospedeiro, estado nutricional entre outros. Em geral as infecções são leves, sem sintomas clínicos, na maioria dos indivíduos; quando sintomáticas, os indivíduos parasitados podem apresentar desconforto abdominal, flatulência, diarreia e constipação (Ojja et al., 2014).

Em infecções intensas e crônicas, o parasito se distribui por todo o intestino grosso, atingindo também a porção distal do íleo e reto ocasionando dor abdominal (epigástrica), vômitos, diarreia, distensão abdominal, anorexia, perda de peso, anemia e tenesmo. Ressalte-se que em infecções maciças, pode ocorrer prolapso retal. Infecções bacterianas secundárias são comuns, como resultado da penetração do revestimento da mucosa dos vermes, proporcionando “porta” de entrada para as bactérias patogênicas. O poliparasitismo por *Trichuris* sp., *E. histolytica*, ancilostomatídeos, ou por *Ascaris lumbricoides* são comumente observados. (Cooper et al., 1997; Neves, 2011; Bogitsh et al., 2013)

Apresentam distribuição cosmopolita, ocorrendo com maior frequência em países tropicais onde existe um déficit em infraestrutura sanitária sendo considerado o terceiro nematóide mais comum em humanos. Nos Estados Unidos, é o segundo mais comum, sendo sobrepujado apenas por *Enterobius vermicularis* e é encontrado

predominantemente no sudeste do país, em paralelo com infecções por *Ascaris lumbricoides* (Bogitsh et al., 2013).

No Brasil, a tricuriase incide mais intensamente na Amazônia e na faixa litorânea, de clima equatorial e chuvas distribuídas pelo ano todo; em regiões de planalto tropical e/ou de estações secas, encontra-se uma menor prevalência (Rey, 2011; Neves, 2011; Bogitsh et al., 2013).

4.2.3 Ancilostomatídeos

Os vermes adultos de ancilostomatídeos (*Necator americanus* e *Ancylostoma duodenale*) habitam o intestino delgado de seres humanos e as formas larvares, estão presentes no sistema respiratório. Quando os ovos são eliminados nas fezes e em condições favoráveis (temperatura de 23 a 33 C°, sombra e um solo arenoso rico em materiais orgânicos), as larvas eclodem em 1 a 2 dias, se alimentam de bactérias e materiais orgânicos no solo e duplicam seu tamanho em 5 dias.

As larvas rabditóides (L1) amadurecem no solo, transformando-se em larva L2 (rabditóide) e, em seguida, após 5 a 10 dias, tornam-se larvas filarióides (larvas L3), que são larvas infectantes, com capacidade de sobreviver entre 3 a 4 semanas em condições ambientais favoráveis (Fortes, 2004).

A infecção de seres humanos ocorre quando estas larvas penetram ativamente pela pele do hospedeiro - geralmente dos pés e pernas. No caso de *Ancylostoma duodenale*, a infecção também pode decorrer da ingestão das larvas filarióides (via oral). Após a penetração, entram na circulação sanguínea do hospedeiro, migram para o lado direito do coração, e entram nos pulmões através da artéria pulmonar. Rompem os capilares pulmonares, entram nos alvéolos e migram para cima da árvore respiratória,

realizando uma muda (L4). O período migratório dura cerca de uma semana. Na terceira muda, cada larva desenvolve uma cápsula bucal temporária que lhe permite alimentação. Uma vez que as larvas atingem o intestino delgado, escavam ativamente nos espaços intervilosidades onde, por volta do décimo terceiro dia, se submetem a sua quarta muda, tornando-se sexualmente maduros entre 5 a 6 semanas pós-penetração. (Bogitsh et al., 2013; Bellato, 2010)

Os indivíduos que apresentam baixa carga parasitária, podem se apresentar assintomáticos e contaminarem o solo durante vários anos. (Neves,2011). Segundo Yu et al., (1995), as larvas infecciosas de *A. duodenale*, presentes em mulheres grávidas, entram no colostro e no leite materno pós-parto, o que pode ocasionar a infecção dos bebês - ancilostomíase infantil.

O quadro clínico pode variar desde a inexistência de sintomas até situações de gravidade extrema. A fase aguda está relacionada com a migração das larvas através de tecidos e a implantação dos vermes adultos no intestino delgado. Em pacientes com parasitismo intenso, além dos sintomas característicos de anemia, palidez, Síndrome de Löeffler, geofagia, emagrecimento, dores abdominais e debilidade, pode também provocar hipoproteinemia e atraso no desenvolvimento físico e mental (Neves, 2011; Bogitsh et al., 2013).

Trata-se de uma doença de distribuição mundial que ocorre preferencialmente em crianças com mais de seis anos, adolescentes e em indivíduos idosos. No Brasil, predomina nas áreas rurais, estando muito associada às áreas sem saneamento básico e cujas populações têm como hábito andar descalças. Estima-se que 72,5 milhões de pessoas abrigam *A. duodenale*, a maioria (59 milhões) na Ásia. Cerca de 384,3 milhões estão infectados com *N. americanus* em todo o mundo, dos quais um milhão vive nos

Estados Unidos (Brasil, 2004; Bogitsh et al., 2013), sendo esta, a espécie mais prevalente também no Brasil.

4.2.3.1 Larva Migrans Cutânea (LMC)

A larva migrans cutânea (LMC) também conhecida popularmente como bicho geográfico é uma dermatite serpiginosa causada pela migração de larvas de nematódeos em um hospedeiro não habitual. A invasão do organismo humano por parasitos próprios de outros animais acompanha-se, geralmente, de um desenvolvimento atípico do parasito envolvido, que mostra-se incapaz de completar seu ciclo nesses hospedeiros, observando nessa condição que a forma larvária infectante, por falta de estímulos adequados ou de outras condições metabólicas, não consegue evoluir até verme adulto. (Araújo et al., 2000).

No Brasil, o *Ancylostoma brasiliense* e *A. caninum* constituem os principais nematódeos envolvidos, larvas de terceiro estágio, presentes em solos contaminados por fezes de cães e gatos, penetram na pele e migram pelo tecido subcutâneo, provocando erupções serpiginosas, distribuídas principalmente nos membros inferiores, pernas, nádegas e mãos. O intenso prurido gerado pode resultar em escoriações ou infecções secundárias, agravando o quadro (Mattone-Volpe et al., 1998; Figueiredo et al., 2005).

A transmissão da LMC é mais frequente em praias e em terrenos arenosos, onde cães e gatos infectados contaminam o solo através de suas fezes, favorecendo a infecção de pessoas que não estão devidamente protegidas. A natureza do solo, o calor e a umidade elevada favorecem o desenvolvimento das larvas até o estágio infectante. Em algumas regiões, isto ocorre apenas nos meses do ano caracterizados por temperaturas e umidades mais altas. Na região Nordeste, a incidência da ancilostomose está ligada a distribuição das chuvas, e o desenvolvimento das larvas e a transmissão dos parasitos

está na dependência direta da temperatura e umidade do solo, ou seja, do índice pluviométrico (Pessôa; Martins, 1988; Lima et al., 2005).

No Brasil, apesar de não se obter dados sobre a prevalência da LMC, essa enfermidade tem sido relatada em vários estados e frequentemente está relacionada a pacientes que tiveram contato com areias de depósitos domiciliares ou áreas de recreação. Em Campo Grande (MS), Araújo et al., (2000) relataram vários casos de LMC em crianças de uma escola de educação infantil, a avaliação parasitológica da areia da área de recreação evidenciou larvas de ancilostomatídeos. Em uma área favelizada de Fortaleza (CE), foram examinados 1185 habitantes, 3,1% manifestaram LMC, destes 43,0 % apresentavam mais de um trajeto larval (Heukebach et al., 2004). Em Uberaba (MG) Calleiros et al.,(1999) relataram um caso de ocorrência de LMC no couro cabeludo de um adolescente de 12 anos, o ancilostomatídeo foi encontrado no interior da glândula sebácea, destacando a ocorrência deste parasito em locais pouco usuais.

4.2.4 *Toxocara* spp.

Toxocara canis é um nematódeo, cujo principal hospedeiro é o cão. São amplamente encontrados em solos, uma vez que a fêmea do helminto produz até 200.000 ovos por dia (Bellato, 2010). Como a carga parasitária no animal infectado pode alcançar até várias centenas de parasitos, os hospedeiros podem contaminar o ambiente com milhões de ovos por dia.

Os ovos de *Toxocara canis* desenvolvem-se melhor em solos de tipo argiloso, principalmente quando não há exposição permanente ou direta à luz solar, que exerce efeito deletério sobre as larvas. São muito resistentes a fatores adversos, podendo permanecer viáveis por tempo prolongado no solo. Para que haja o embrionamento são

necessárias condições adequadas de temperatura (15 °C a 35 °C) e umidade acima de 85,0 %, sendo que, nessas condições, 85,0 % dos ovos tornam-se infectantes no período de duas a cinco semanas (Glickman & Schantz, 1981; Abe & Oselka, 1991)

Pode apresentar duas formas de migração nos canídeos. Na forma hepato traqueal o cão ingere ovos embrionados presentes no solo contendo larvas infectantes. Ao ingerir o ovo embrionado, ocorre a liberação de larvas no intestino delgado, que penetram na mucosa intestinal, invadem a corrente linfática ou sanguínea e alcançam o fígado em 24 horas. Através do sistema vascular, atingem o coração e os pulmões. Dos pulmões, algumas larvas passam dos brônquios para a traquéia e faringe, sendo então deglutidas. Após duas mudas, essas larvas tornam-se adultos na luz intestinal, iniciando, então, a postura de ovos. Estes ovos aparecem nas fezes quatro a cinco semanas após a infecção (Abe & Oselka, 1991; Glickman & Schantz, 1981).

Na migração, as larvas chegam aos pulmões retornam ao coração e migram para os tecidos e órgãos do hospedeiro permanecendo encistadas. Em fêmeas gestantes, no terço final de gestação, as larvas são liberadas dos tecidos, provavelmente por influências hormonais, migrando para a placenta e/ou glândulas mamárias, ocasionando assim, a infecção neonatal de filhotes pelas vias transplacentária e transmamária (Barriga, 1991; Santarém et al., 2009; Bellato, 2010).

4.2.4.1 Larva Migrans Visceral

As síndromes de larvas migrans são zoonoses que envolvem a migração de larvas de helmintos de hospedeiros naturais para diversas partes do organismo do hospedeiro infectado. *Toxocara* spp é um dos principais causadores da LMV em

humanos, seus hospedeiros naturais são os cães e gatos. Ela ocorre devido à ingestão acidental de ovos embrionados desse parasito, que eclodem no intestino delgado liberando as larvas que penetram nas paredes desse órgão, entrando na circulação e atingindo órgãos, como o fígado, coração, pulmão, cérebro, músculos e os olhos.

Como o parasita não alcança o seu desenvolvimento no tecido humano, causa severa reação inflamatória local, fenômeno que é a base patológica da doença. (Andresiuk et al., 2003; Despommier et al., 2003)

Ocorre principalmente em crianças com idade de 1 a 4 anos, sendo os sintomas variáveis de acordo com a carga parasitária, a frequência de reinfecções, localização das lesões e da intensidade das reações inflamatórias (Andresiuk et al., 2003).

Apresenta distribuição mundial, sendo as maiores taxas de infecção encontradas nas Américas, África e Ásia, provavelmente pela maior exposição dessas populações aos agentes zoonóticos. A prevalência de anticorpos contra antígenos de *Toxocara canis* varia entre 2,0 a 80,0 % em diferentes populações humanas (Pawlowki, 2001).

As condições epidemiológicas necessárias para a ocorrência dessa doença são: clima favorável para o desenvolvimento do ovo (fase de vida dos parasitas que ocorre no ambiente), trânsito livre de animais em áreas de recreação infantil, áreas de lazer (praias, praças e caixas de areia), aumento progressivo do número de animais domiciliados e errantes e com idade inferior a um ano.

A contaminação ambiental é o melhor indicador do risco da população humana contrair a infecção. No solo, as condições favoráveis de umidade, temperatura e oxigenação proporcionam o desenvolvimento dos ovos e larvas infectantes (L3) (Enko et al., 2009).

4.2.4.2 Larva migrans ocular

A larva migrans ocular é uma síndrome resultante da migração de larvas para os olhos do hospedeiro acidental, região de predileção (tropismo) de seus agentes etiológicos mais comuns *T. canis* e *T. cati*.

A infecção ocular geralmente é unilateral e os sintomas variam de acordo com a localização e atividade larval, bem como a magnitude da inflamação. A gravidade da enfermidade está relacionada com o número de larvas no olho e a resposta imune do hospedeiro.

As lesões observadas são decorrentes de reações tóxicas ou imunoalérgicas aos agentes larvais, principalmente após a morte das larvas, que proporcionam a formação de um granuloma ou até mesmo o deslocamento total da retina (Figueiredo et al., 2005; Dimian et al., 2007).

4.3 Sanidade parasitológica de areias

A qualidade da areia tem sido objeto de estudo de diferentes grupos de pesquisa devido à sua importância epidemiológica e possibilidade de transmissão de patógenos para os seres humanos.

Não é infrequente o achado de várias espécies de helmintos parasitos, contaminando concomitantemente o mesmo solo; Silva et al. (2009), detectou ovos de ancilostomatídeos, *Trichuris trichiura*, *Ascaris lumbricoides* e cistos de *Entamoeba coli* em praias de Pernambuco.

No litoral de Santos, estado de São Paulo, Rocha et al., (2011), obtiveram amostras positivas para larvas e ovos de ancilostomatídeos, ovos de *Toxocara* spp, *Trichostrongylus* spp., *Ascaris lumbricoides*, oocistos de coccídios e cistos de *Entamoeba* sp.

Na Argentina, Milano et al. (2002), recuperaram ovos de *Toxocara canis* e Ancilostomatídeos. Pedrosa et al. (2014) avaliaram as praias de Fortaleza e verificaram a presença de ancilostomatídeos, *Trichuris trichiura* e *Strongyloides stercoralis*. Ressalte-se que em nenhum destes estudos foi feita a cultura de larvas para identificação mais precisa das espécies de larvas, visto que a imensa maioria dos nematóides são exclusivamente de vida livre e muito similares.

As diferenças observadas entre os resultados podem ser atribuídas não apenas às condições ambientais e epidemiológicas, mas também à diversidade dos métodos empregados.

Diversos autores utilizam diferentes métodos para a recuperação de elementos parasitários (Tabela 1), muitas vezes valendo-se de adaptações de métodos empregados na rotina clínica para a detecção de patógenos, o que nem sempre apresenta boa sensibilidade e acurácia para a detecção de ovos de helmintos presentes no ambiente.

Tabela 1 - Pesquisa de geohelminthos em diferentes matrizes de solo

AMOSTRA	METODOLOGIA EMPREGADA	RESULTADO	REFERÊNCIA
Areia de Litoral	Técnica de sedimentação espontânea, modificado por Duwel (1984) e modificada por Toparlak et al., (2002) - Centrífugo-flutuação em Solução de Sulfato de Zinco (Faust et al.,1939) -Técnica de Rugai modificada por Carvalho et al., (2005)	Ascarídeos Tenídeos; Ancilostomatídeos <i>Strongyloides</i> spp. Amebas; <i>Giardia</i>	(Sousa et al., 2014)
Areia de litoral	- Tubo Cônico de Centrífuga - Técnica de Ueno (Ueno & Gonçalves 1998).	larvas de ancilostomatídeos	(Hohlenwerger et al.2011)
Areia de Litoral	Sedimentação espontânea (Hoffman, 1934)	<i>Ascaris</i> spp	(Santiago et al., 2011)
Areia de Litoral	- Método de Faust (1939) modificado segundo Mentz et al., (2004) - Kazacos et al., (1983) modificado.	Ancilostomatídeos <i>Ascaris</i> spp Ancilostomatídeos <i>Toxocara</i> spp	(Matesco et al., 2006)
Areia de Creche	Técnica de Willis (1921) modificada por Golvan (1977)	Ovos: Ancilostomatídeos, <i>Toxocara</i> spp, <i>Dipylidium caninum</i> ,	(Figueiredo et al., 2012)

		<i>Ascaris</i> sp., <i>Trichuris</i> sp.	
		e larvas da família	
		Rhabdiasidae	
Areia de Creche	Método de Hoffman Pons e Janer (1994) adaptado para solo.	Ancilostomatídeos; <i>Toxocara</i> sp. <i>Strongyloides stercoralis</i> , <i>Ascaris lumbricoides</i> , <i>Taenia</i> sp.	(Martins et al., 2016)
Praças públicas	-Método de Rugai e cols. com adaptação para solo (sedimentação forçada após sedimentação espontânea), -Willis (flutuação espontânea com cloreto de sódio) -Caldwell e Caldwell modificado (flutuação forçada com hipoclorito de sódio e dicromato de potássio.	<i>Toxocara</i> spp <i>Trichuris</i> spp Ancilostomatídeos	(Cassenote et al., 2011)
Praças Públicas	Faust, Lutz e Baermann	Ovos de <i>Ancylostoma</i> sp. <i>Toxocara</i> sp. Superfamília Strongyloidea (excluindo ancilostomatídeos)	(Sprenger et al., 2014)
Praças Públicas	- Método de centrífugo flutuação (sulfato de zinco; d = 1.200).	<i>Toxocara</i> spp	(Santarém et al., 2009)
Praças Públicas	Rugai modificado por Carvalho et al., 2005	<i>Ascaris</i> spp <i>Enterobius</i> sp. <i>Trichuris</i> sp.	(Moraes et al., 2016)

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Levantamento de dados e de bibliografia em periódicos

Para submeter o projeto a editais de fomento e conhecer as metodologias utilizadas em outros trabalhos, foi realizada uma revisão bibliográfica nos seguintes bancos de dados: *Google Scholar*, *Scopus*, *SciELO*, *PubMed*, *NCBI*, utilizando as palavras chaves: geohelminths, enteroparasitoses, fontes de infecção, saneamento e areia de praia ou ainda termos em inglês: soil transmitted helminths, helminths, enteroparasites, environment, beach sand.

5.2 Local De Estudo

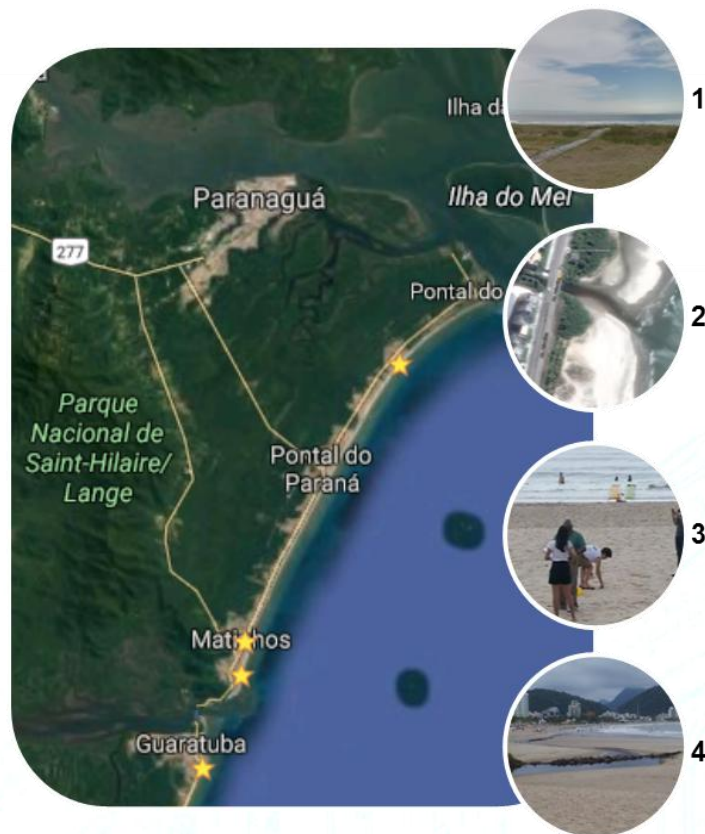
Para realizar a padronização de um método e verificar a ocorrência de ovos de helmintos no litoral paranaense foram selecionados pontos de coleta georreferenciados onde atua o Instituto Ambiental do Paraná (IAP), o qual realiza boletins de balneabilidade da qualidade das praias como descrito a seguir: (Figura 2).

Ponto 1: Praia de Pontal do Paraná, no Balneário de Shangri-lá: Coordenadas: (25°37'35.06"S 48°25'03.12"O)

Ponto 2: Praia de Matinhos, próximo ao Rio Matinhos: Coordenadas: (25°48'46.03"S 48°31'56.62"O)

Ponto 3: Praia Brava de Caiobá: Coordenadas: (25°50'14.29"S 48°32'14.18"O)

Ponto 4: Guaratuba, próximo ao Rio Brejatuba. Coordenadas: (25°53'53.51"S 48°33'55.07"O)



FONTE: A autora (2016) e Google Maps (2016).

Figura 2 - Mapa representativo dos pontos de coleta de areia de praias do litoral paranaense.

5.3 Coleta das amostras de areia

Em um frasco de vidro autoclavável foram colhidas amostras de 50g de areia, com camada superficial e profundidade de 5 a 10 cm de areia (Figura 3). Antes de utilizá-las no experimento de contaminação artificial, o material foi esterilizado em autoclave - vapor fluente por uma hora. Cada alíquota permaneceu fechada, e armazenada em condições refrigeradas, sendo aberta uma de cada vez para a contaminação.

Para a verificação da contaminação natural por ovos de helmintos nas areias das diferentes praias, seguiram-se os mesmos procedimentos supracitados, sendo as amostras acondicionadas em caixas isotérmicas e transportadas para o Laboratório de



Figura 3 - Coleta de amostras de areia. Fonte: A autora (2016).

5.4 Experimentos de contaminação artificial das areias

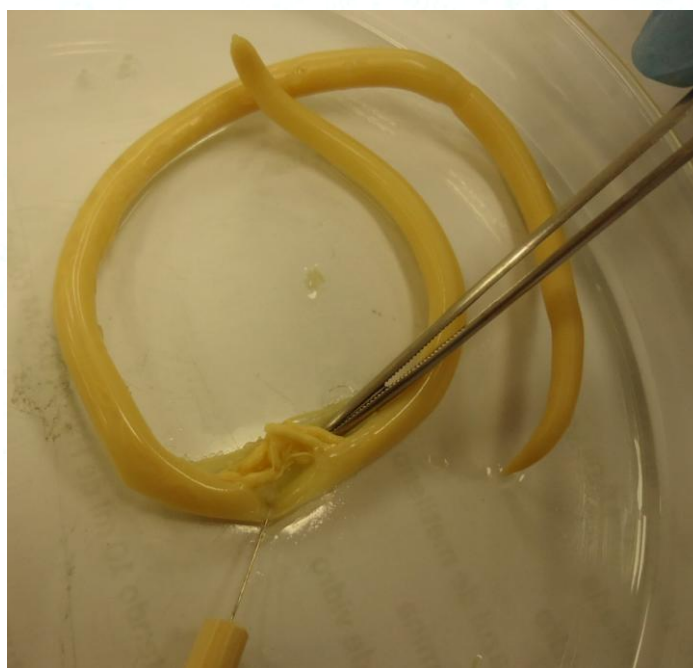
5.4.1 Obtenção do Inóculo

Para a obtenção da suspensão purificada de ovos de helmintos, fêmeas de *Ascaris suum* foram dissecadas com o auxílio de protocolo baseado em Jensen et al., (2009). As fêmeas foram obtidas de suínos da cidade de Pomerode, Santa Catarina, região endêmica para ascaridiose suína, sendo estas armazenadas em solução de formalina a 3,0 %.

As fêmeas foram imersas em água isenta de cloro e seus úteros retirados para a obtenção dos ovos sob estereomicroscópio (Figura 4). Em uma placa de petri, contendo água declorada, os fragmentos do útero foram pressionados para que os ovos fossem liberados. Com auxílio de pipeta Pasteur, utilizou-se solução de eluição Tween 80 (0,1

%) para lavar a suspensão de ovos e tentar separar os grumos de ovos eventualmente presentes na amostra (Figura 5).

Em seguida, o material foi peneirado para retirada de fragmentos grosseiros e centrifugado a 1000 RPM por 5 minutos. O sedimento contendo os ovos foi armazenado em água mineral contendo algumas gotas de formalina 10,0 % sob refrigeração, até o momento de contaminação das amostras de areia.



Fonte: Diego A. G. Leal.

Figura 4 - Retirada do útero de fêmea de *Ascaris suum* para obtenção do inóculo.

Para enumerar a suspensão, o material foi homogeneizado com auxílio de vórtex durante dois minutos e o tubo *ependorf*, invertido três vezes, para completa homogeneização da suspensão.

Em seguida, retirou-se 1 μ l da suspensão, sendo esta adicionada em 19 μ l de solução de eluição na lâmina para contagem dos ovos. Esse procedimento foi repetido 10 vezes para obtenção de uma média dos ovos presentes na suspensão estoque.

Para cada tratamento escolhido para recuperação dos ovos em areia contaminada, foi feito um novo inóculo. Para tanto, diluiu-se 10 µl da suspensão estoque em 90 µl de água destilada (1:10). Antes dos experimentos, retirou-se 10 µl da suspensão de uso e, efetuou-se uma contagem para confirmar se cada novo inóculo apresentava-se dentro da média padronizada a partir da suspensão estoque. Para cada tratamento, utilizou-se sempre 10 µl da suspensão de ovos para efetuar a contaminação das amostras, sendo o volume adicionado em cada amostra de 90 µl, para se ter uma contaminação na ordem de 10^2 .

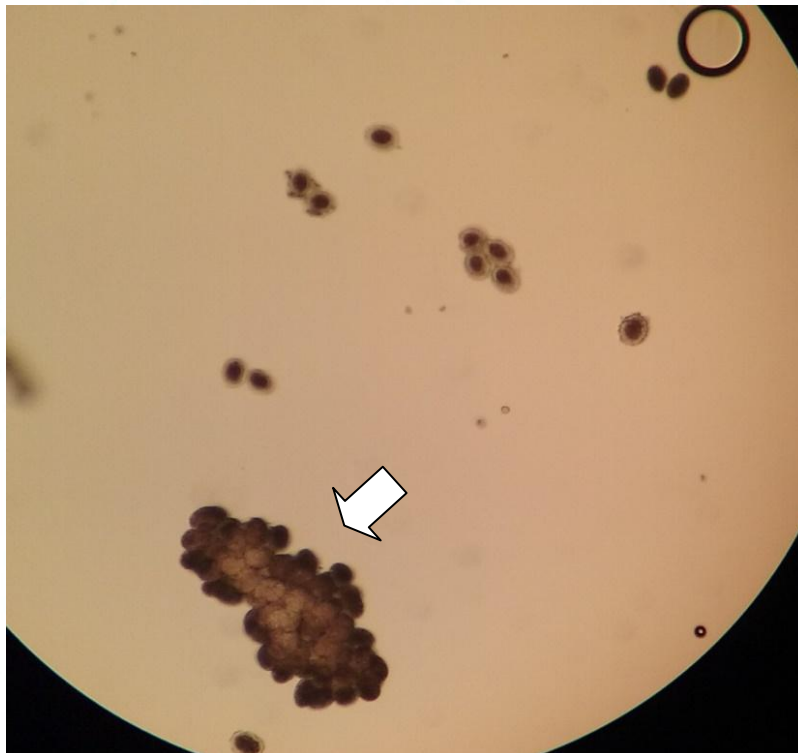


Figura 5 - Formação de grumos de ovos de *Ascaris suum* durante a produção do inóculo.

Fonte: A autora (2016).

5.4.2 Tipos de tratamento empregados para recuperação de ovos.

Para a padronização do método foram realizados ensaios de contaminação artificial em areia de praia tendo como modelo ovos de *Ascaris suum* empregando 8 tratamentos diferentes (n = 3 / método) adaptado e modificado de Oliveira (2012).

A metodologia que apresentou melhor eficiência de recuperação (sensibilidade de detecção) foi empregada para a pesquisa da contaminação natural por ovos de helmintos na areia das praias. Foram determinados oito tratamentos com três variáveis: homogeneização (agitador vórtex ou agitador magnético), solução dispersante (glicina 1M ou Tween 80) e tempo de contato (5 minutos ou 1 hora) (Fluxograma 1).

Após cada tipo de tratamento, as amostras de areia contaminadas foram centrifugadas a 1120 x g e submetidas à flutuação em sacarose (gravidade específica 1,24) completando o volume até a formação de um menisco positivo. Colocou-se uma lamínula sobre o tubo de ensaio e aguardou-se 40 minutos. Decorrido o tempo, a lamínula foi colocada em lâminas e os ovos contabilizados. Ressalte-se que a estimativa final do número de ovos recuperados por tratamento foi feita após 4 flutuações sequenciais de 40 minutos, conforme descrito anteriormente. Cada tratamento foi repetido três vezes.

Para obter a eficiência de recuperação de ovos nos diferentes tratamentos, utilizou-se a seguinte equação padronizada por Boni (2012) e modificado no presente estudo:

$$ER: \frac{X}{Y} \times 100 \quad (1)$$

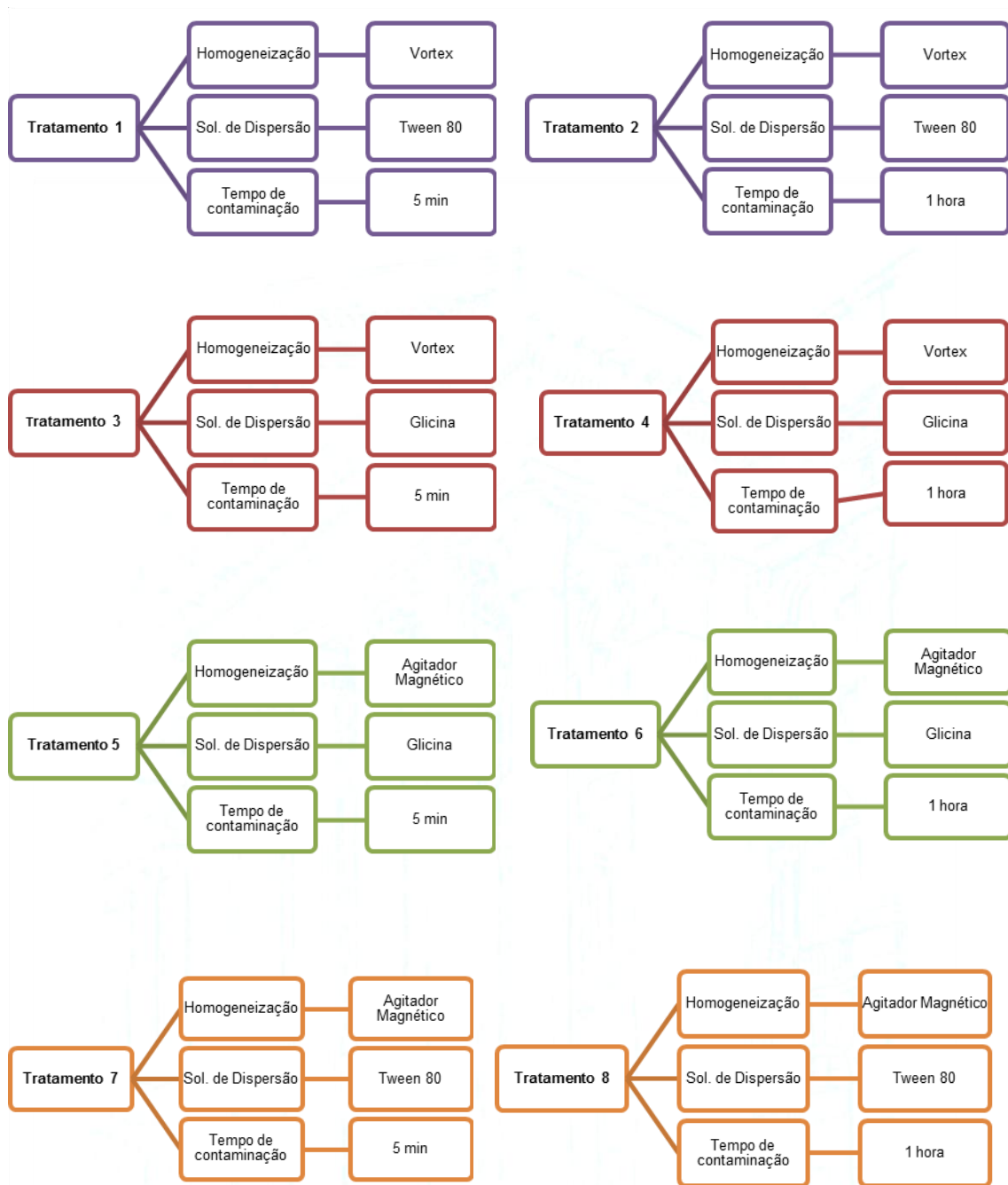
Y

Onde:

ER= eficiência de recuperação do método;

X = nº de ovos recuperados;

Y = nº de ovos semeados.



Fluxograma 1: Delineamento dos experimentos com ovos de *Ascaris suum*. Fonte: A autora (2016).

5.5 Exame parasitológico de fezes.

Durante a coleta de areia na praia de Matinhos, foram encontradas fezes próximo ao local de coleta (Figura 6). Para verificar se esta seria uma fonte de contaminação do local, coletamos as fezes e examinamos utilizando diferentes métodos coproparasitológicos:



Figura 6: Amostras de fezes em Matinhos. Foto: A autora (2016)

5.5.1 Método de sedimentação espontânea (Hoffman, Pons e Janer, 1934)

O método de sedimentação espontânea foi efetuado para a pesquisa de ovos de helmintos. A amostra fecal foi homogeneizada em água e cerca de 4g de fezes em água coado em gaze dobrada 4 x. Posteriormente, o material fecal foi adicionado em um cálice de sedimentação e deixado em repouso por pelo menos uma hora. Decorrido o tempo, alíquotas do sedimento foram aspiradas com auxílio de pipeta Pasteur,

transferidas para uma lâminas e adicionou-se uma gota de Lugol ao material, sendo este recoberto com lamínula e examinado ao microscópio óptico.

5.5.2 Método de Flutuação em solução saturada de cloreto de sódio – Método de Willis (Willis, 1921).

O método de Willis foi empregado para pesquisa de ovos de ancilostomatídeos. Em um recipiente de boca larga, diluiu-se 2g de fezes em solução saturada de cloreto de sódio (densidade de 1,13), completando-se o volume do recipiente com a mesma solução até a formação de um menisco positivo no mesmo. Colocou-se uma lamínula sobre o recipiente e aguardou-se pelo menos 15 minutos para a retirada da lamínula para análise.

5.5.3 Método de centrífugo-flutuação em solução saturada de sulfato de zinco (Método de Faust e cols, 1938).

O método de Faust foi empregado para a pesquisa de cistos de protozoários intestinais. Homogeneizou-se de 2 a 5g de fezes em água, sendo o material filtrado em gaze dobrada 4 x. O material filtrado foi recolhido e transferido para tubos de centrifugação e completados com água destilada. Em seguida, efetuou-se centrifugação do material fecal durante 5 minutos a 2000rpm. Desprezou-se o sobrenadante, e os mesmos procedimentos de centrifugação foram repetidos até que o sobrenadante ficar mais límpido.

À última centrifugação, adicionou-se ao tubo de ensaio solução saturada de sulfato de zinco (densidade = 1,18), sendo este submetido à centrifugação por 3 minutos

a 1000RPM. Com auxílio de alça de platina, devidamente flambada, retirou-se alíquotas superficiais do material flutuado no tubo, com o cuidado de somente encostar na película, sem afundar a alça. As alçadas foram transferidas para lâminas, adicionou-se uma gota de Lugol e recobriu-se a mesma com uma lamínula para observação ao microscópio.

5.5.4 Centrifugo-sedimentação em formol-éter ou Método de Ritchie modificado (Ritchie, 1948; Knight et al., 1976).

O método de Ritchie baseia-se na sedimentação pela centrifugação e permite encontrar ovos e larvas de helmintos e oo/cistos de protozoários intestinais.

Diluiu-se 3 mL de fezes, previamente fixadas em formalina 10,0 %, sendo o material transferido para tubos Falcon de 15 mL. Adicionou-se mais formalina 10% para completar a marca de 7 mL. Em seguida completou-se com 3 mL de Acetato de etila até a marca de 10 ml do tubo Falcon sendo submetido à centrifugação por 3 minutos a 1700 RPM.

Após a centrifugação, duas fases foram formadas, mantendo-se separadas por uma interface, e no fundo do tubo Falcon o sedimento com os parasitos. Com o auxílio de um bastão, descolamos a camada de detritos da parede do tubo e desprezamos o sobrenadante, deixando apenas o sedimento no tubo. Adicionamos uma gota do sedimento na lâmina utilizando a pipeta Pasteur para análise do material.

6. RESULTADOS

6.1 Levantamento de dados e bibliografia em periódicos

Após ampla revisão bibliográfica em bases de dados nacionais e internacionais, dois projetos de pesquisa foram elaborados e submetidos para agências de fomento, como segue:

- 1.) Fundação Araucária (PPSUS – 2016) (Apêndice 1).
- 2.) Edital Universal (CNPq – 2016) (Apêndice 2).

6.2 Experimentos de contaminação artificial.

Para enumerar a suspensão de ovos, realizamos 10 contagens de lâminas. Os resultados obtidos estão detalhados na (Tabela 2).

Em 1 μ l de suspensão estoque foram detectados em média 91 ovos. Sendo assim, em nossa suspensão estoque de 100 μ l encontramos 9100 ovos e 910 ovos em 10 μ l.

Tabela 2 - Resultados da contagem de ovos presentes em 1µL para padronização do inóculo.

CONTAGEM DE OVOS PARA PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO	
Nº de Contagens	Nº de ovos observados
1	78
2	82
3	93
4	93
5	112
6	109
7	102
8	74
9	73
10	94
Valor total	910
Média	91
Desvio Padrão	±14
Em 10 µl	91
Em 90 µl	819

No tratamento 1, a homogeneização (Figura 7) foi realizada utilizando o Tween 80 como solução de dispersão e o aparelho vórtex. A média da eficiência de recuperação das três réplicas foi de 9,9% (Tabela 3).

No tratamento 2, modificamos a centrifugação aumentando a rotação para 3100 RPM (1258 x g) e o tempo de contato do inóculo com a areia foi de uma hora (Tabela 4).

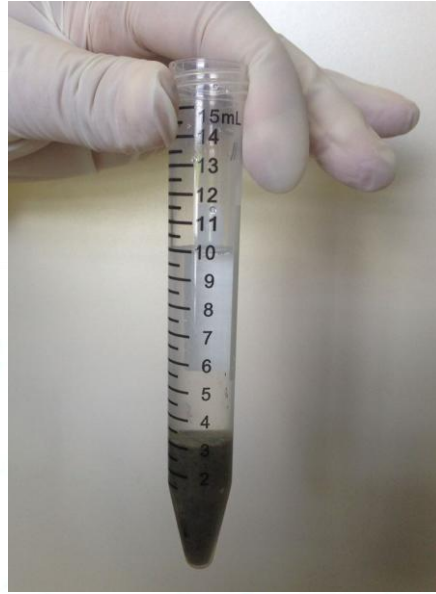
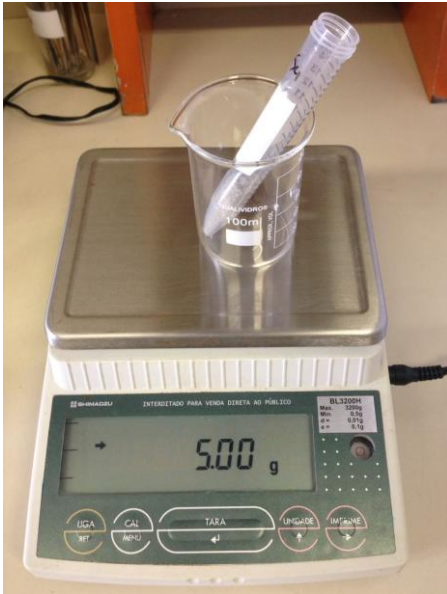


Figura 7 - Etapa de homogeneização do solo utilizando o aparelho vórtex. Fonte: A autora (2016)

Tabela 3 - Eficiência de recuperação do tratamento 1 (Vórtex + Tween 80 + 5 min).

Tratamento 1		
Quantidade de ovos no inóculo	Réplica	Recuperação
819	1	9,4 %
819	2	13,8 %
819	3	6,5 %
Média		9,9 %
Desvio Padrão		± 3,68

Tabela 4 - Eficiência de recuperação do tratamento 2 (Vórtex + Tween 80 + 1h).

Tratamento 2		
Quantidade de ovos no inóculo	Réplica	Recuperação
819	1	6,1 %
819	2	8,5 %
819	3	10,5 %
Média		8,37 %
Desvio Padrão		± 2,20

O tratamento 3 foi realizado utilizando a glicina (1M ph 5,5) como solução de dispersão e a homogeneização permaneceu da mesma forma, utilizando o aparelho vórtex, sendo o tempo de contato de cinco minutos. A média da taxa de recuperação de ovos, mediante este tratamento foi de 15,4 % (Tabela 5).

No tratamento 4, aumentamos o tempo de contato para uma hora e a taxa de recuperação aumentou consideravelmente, com média de 41,63 % dos ovos recuperados (Tabela 6).

Tabela 5 - Eficiência de recuperação do tratamento 3 (Vórtex + Glicina+ 5min)

Tratamento 3		
Quantidade de ovos no inóculo	Réplica	Recuperação
819	1	15,1 %
819	2	17,1 %
819	3	14,0 %
Média		15,4 %
Desvio Padrão		± 1,57

Tabela 6 - Eficiência de recuperação do tratamento 4 (Vórtex + Glicina + 1h)

Tratamento 4		
Quantidade de ovos no inóculo	Réplica	Recuperação
819	1	45,5 %
819	2	44,4 %
819	3	35,0 %
Média		41,63 %
Desvio Padrão		± 5,77

Do tratamento 5 ao 8 utilizamos o agitador magnético para homogeneização do solo (Figura 8), onde 5g de areia de praias foram pesadas em um béquer e, contaminadas com o inóculo respeitando o tempo de contato referente ao tratamento, 5 minutos (tratamento 5 e 7) e uma hora (tratamento 6 e 8).

Para cada tratamento, adicionou-se 10 mL de solução de dispersão, Glicina (tratamento 5 e 6) e Tween 80 (tratamento 7, 8), sendo submetidos à homogeneização em agitador magnético durante 5 minutos. O material foi transferido para um tubo Falcon de 15 ml e centrifugado a 3100 rpm (1258 x g) durante 5 minutos.



Figura 8 - Homogeneização do solo como agitador magnético. Fonte: O autor (2016)

Tabela 7 - Eficiência de recuperação do tratamento 5 (Agitador Magnético + Glicina + 5 min).

Tratamento 5		
Quantidade de ovos no inóculo	Réplica	Recuperação
819	1	7,81 %
819	2	6,95 %
819	3	11,96 %
Média		8,90 %
Desvio Padrão		±2,67

Tabela 8 - Eficiência de recuperação do tratamento 6 (Agitador Magnético + Glicina + 1h)

Tratamento 6		
Quantidade de ovos no inóculo	Réplica	Recuperação
819	1	5,98 %
819	2	11,23 %
819	3	10,37 %
Média		9,19 %
Desvio Padrão		±2,81

Tabela 9 - Eficiência de recuperação do tratamento 7 (Agitador Magnético + Tween 80 + 5 min)

Tratamento 7		
Quantidade de ovos no inóculo	Réplica	Recuperação
819	1	4,88 %
819	2	4,15 %
819	3	6,4 %
Média		5,14 %
Desvio Padrão		±1,15

Tabela 10 - Eficiência de recuperação do tratamento 8 (Agitador Magnético + Tween 80 + 1h)

Tratamento 8		
Quantidade de ovos no inóculo	Réplica	Recuperação
819	1	3,9 %
819	2	6,22 %
819	3	5,0 %
Média		5,04 %
Desvio Padrão		±1,16

Dentre todos os ensaios de recuperação de ovos (Figura 9), o ensaio que apresentou a maior eficiência de recuperação foi o 4 (Fluxograma 1), homogeneização com vórtex, tendo como solução de dispersão a glicina 1M e, tempo de contato de 1 hora. Portanto, este foi o método escolhido para a pesquisa de ovos de helmintos em areias de praias, em situação de contaminação natural (Apêndice 3).

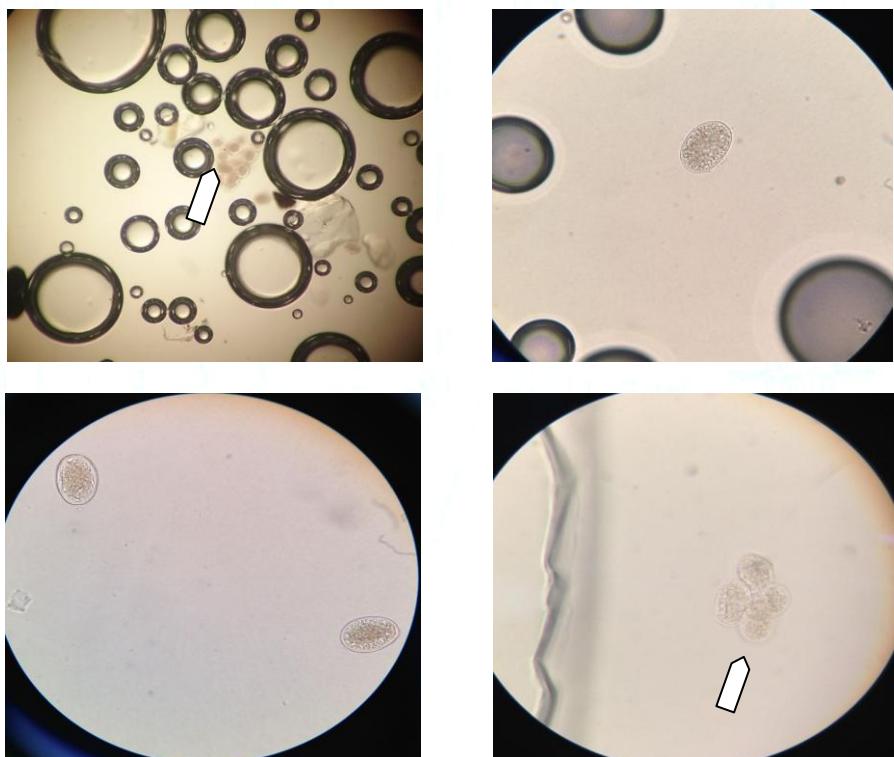


Figura 9- Recuperação de ovos de *Ascaris suum* em diferentes tratamentos.

6.3 Contaminação ambiental de areias por ovos de helmintos

Após padronização do protocolo de pesquisa de ovos de helmintos em areias de praias, duas amostras de areia foram coletadas, nas 4 praias escolhidas no presente estudo para aferição da ocorrência de contaminação ambiental por formas parasitárias (Tabela 11).

Todas as amostras foram analisadas em duplicata. Ao processar a amostra da praia de Matinhos, detectou-se contaminação por ovos do parasito *Trichuris* spp.

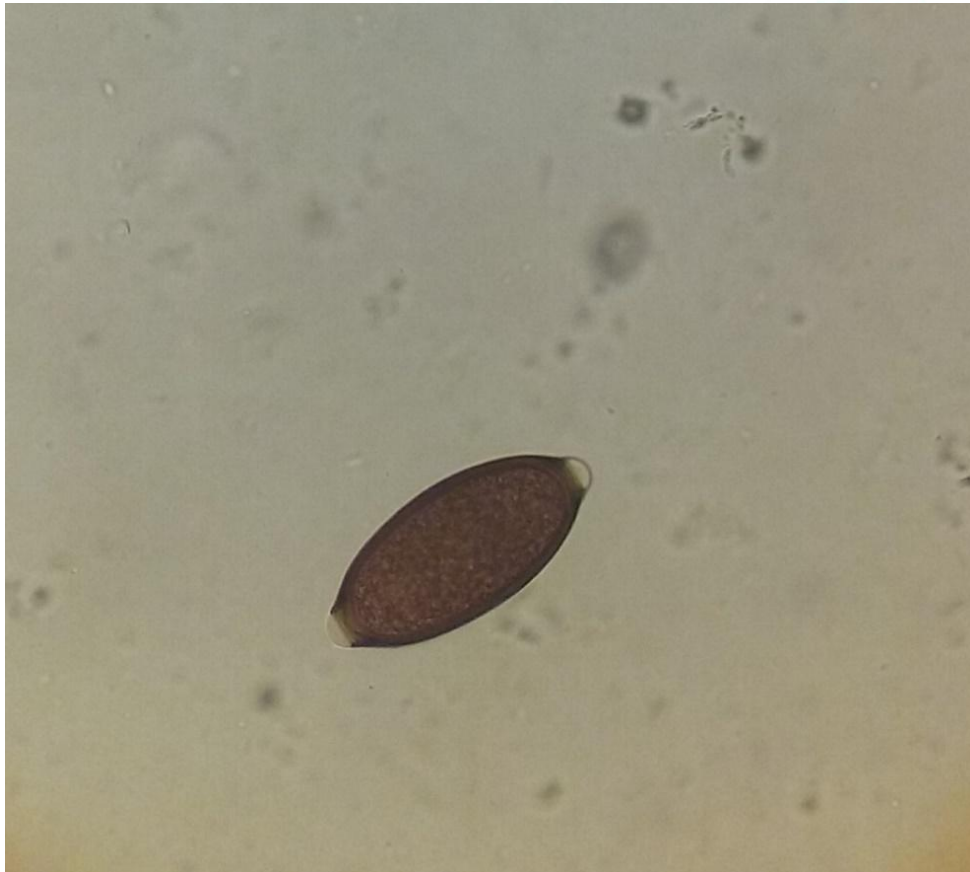


Figura 10 - Ovo de *Trichuris* spp., encontrado na areia da praia de matinhos, visualizado em aumento de 10x. Fonte: A autora (2016)

Tabela 11 - Contaminação ambiental por ovos de helmintos parasitos nas areias de diferentes praias analisadas no presente estudo.

AMOSTRAS DE AREIA DA PRAIA			
BALNEÁRIO DE CAIOBÁ – PRAIA BRAVA			
1.1*	Neg	2.1	Neg
1.2	Neg	2.2	Neg
1.3	Neg	2.3	Neg
1.4	Neg	2.4	Neg
MATINHOS – PRÓXIMO AO RIO MATINHOS			
1.1	<i>Trichuris</i> sp (1) ^{nº de ovos / amostra}	2.1	Neg
1.2	<i>Trichuris</i> sp (5)	2.2	Neg
1.3	<i>Trichuris</i> sp (1)	2.3	Neg
1.4	<i>Trichuris</i> sp (1)	2.4	Neg
GUARATUBA – PRÓXIMO AO RIO BREJATUBA			
1.1	Neg	2.1	Neg
1.2	Neg	2.2	Neg
1.3	Neg	2.3	Neg
1.4	Neg	2.4	Neg
PONTAL DO PARANÁ - BALNEÁRIO DE SHANGRI-LÁ			
1.1	Neg	2.1	Neg
1.2	Neg	2.2	Neg
1.3	Neg	2.3	Neg
1.4	Neg	2.4	Neg

*Todas as amostras colhidas no campo, foram analisadas mediante 4 flutuações sequenciais, de acordo com o protocolo de contaminação artificial padronizado e descrito anteriormente.

6.4 Exame parasitológico de fezes

Amostras de fezes encontradas na praia de Matinhos foram processadas por 4 técnicas parasitológicas (n = 2 amostras colhidas). Os resultados obtidos podem ser observados na tabela 12. Ovos de ancilostomatídeos foram detectados em ambas as amostras (Figuras 11 e 12).

Tabela 12 - Resultado das análises parasitológicas de amostras de fezes coletadas em matinhos, processadas por diferentes métodos.

AMOSTRAS DE FEZES				
	Willis	HPJ	Ritchie	Faust
Amostra 1	Ancilostomatídeo	Ancilostomatídeo	Ancilostomatídeo (larvado)	Ancilostomatídeo
Amostra 2	Ancilostomatídeo	Neg	Neg	Neg



Figura 11 - Ovo de ancilostomatídeo blastomerado, aumento 10x.



FONTE: A autora (2016).

Figura 12 - ovos de ancilostomatídeo larvados - aumento de 10 x.

7. DISCUSSÃO

Padronizar uma metodologia eficiente e que apresente boa sensibilidade de recuperação de ovos de helmintos é uma atividade laboriosa, uma vez que sua eficiência pode variar frente a diversos fatores: tipo de solo, condições ambientais, escolha do local de coleta da amostra, tipo de solução dispersante utilizada, número de lâminas examinadas, ressuspensão de sedimento entre outros fatores (Oge, 2000).

Para amostragem, coletamos o material superficial até 10 cm de profundidade, visto que O'lorcain, (1994) descreve que os ovos de *Toxocara* spp. são encontrados na superfície do solo até cerca de 12 cm de profundidade, em especial 8 cm, sofrendo influências da chuva. No presente estudo, optou-se por analisar 5 g de amostra de areia de praia. Kazacos et al., (1983), ressalta que a quantidade de solo usada para análise colabora para uma maior ou menor recuperação de parasitos e indica que 30 g de solo é a quantidade máxima a ser eficientemente processada. Diante do exposto, repetimos quatro vezes a metodologia nas amostras do litoral paranaense, resultando em 20 g de areia por amostra.

As técnicas utilizadas para o diagnóstico de parasitos em amostras fecais não são recomendadas para o isolamento e detecção de ovos de helmintos em diferentes matrizes de solo, que requer técnica especial, devido à forte ligação exibida pelos ovos de helmintos às suas partículas, podendo gerar resultados falso-negativos. Por isso, a fase de homogeneização e aplicação de solução de dispersão tem grande importância na separação de partículas, por quebrarem as forças eletrostáticas propiciando liberação dos ovos e remoção de partículas de solo finas que podem impedir a sua flutuação (Hawksworth et al., 2007).

Além disso, na maioria dos estudos conduzidos para a pesquisa de contaminação natural de ovos e larvas de helmintos em solos, não são apresentados dados da eficiência de recuperação do método empregado para tal detecção.

O detergente 7X tem sido relatado como sendo superior a outros agentes de dissociação, incluindo Triton X-100 e Tween 80 para a recuperação de ovos de *Ascaris* a partir de resíduos e do solo. Alguns trabalhos denotam uma recuperação três vezes maior de ovos quando utilizando o Tween 80 como agente dispersante (Kazacos, 1983; Nelson et al., 2001; Jeandron et al., 2014).

Entretanto, nossos resultados mostraram-se mais promissores, quando se utilizou a solução de glicina (1M, ph 5,5) como adjuvante da etapa de dispersão e recuperação de ovos, sendo a eficiência de recuperação superior àquela apresentada quando utilizada a solução de Tween 80, independente das variáveis de homogeneização e tempo de contato. A pesquisa realizada por Cook et al. (2006) também evidenciou melhor recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras ambientais, ao utilizar a solução de glicina 1M como solução dispersante.

No presente estudo, ao utilizar o detergente aniônico Tween 80, notamos um excesso de formação de bolhas que dificultava a recuperação de ovos, ou mesmo interferia na visualização da amostra (Figura 13).

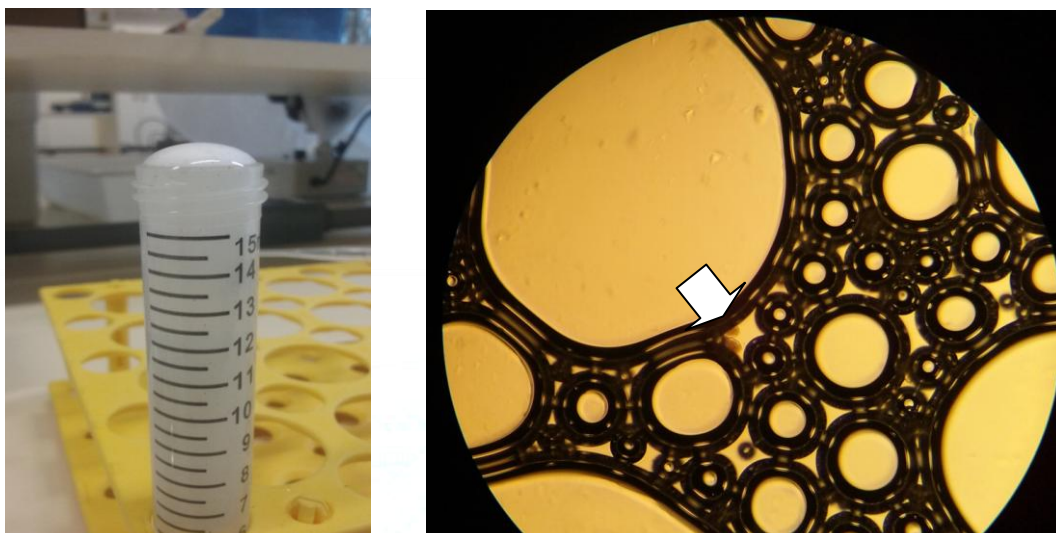


Figura 13 - Formação de bolhas nos tratamentos que utilizam o Tween 80 como solução de dispersão. Fonte: O autor (2016).

Quanto aos tratamentos de homogeneização das amostras após contaminação artificial, a utilização do vórtex por dois minutos, apresentou melhor aplicabilidade, considerando as taxas de recuperação, em comparação à homogeneização sob agitador magnético. Na metodologia descrita por de O'locarcin e colaboradores (1994), descrita por Gnani et al., (2013) como a mais eficiente, utiliza-se o aparelho vórtex em etapa de homogeneização de amostra.

A homogeneização utilizando agitador magnético resultou em menor recuperação de ovos (Tabelas 7 - 10). Este fato pode ser atribuído à etapa de transferência do material do béquer para o tubo Falcon, onde se perde muitos ovos. As menores taxas de recuperação encontradas nos tratamentos 7 e 8, utilizando-se a solução de eluição Tween 80, associada à homogeneização em agitador magnético, pode ser atribuída à formação de bolhas, conforme mencionado anteriormente e maior número de etapas relacionadas ao processamento das amostras.

No primeiro tratamento, a velocidade de rotação utilizada durante a centrifugação foi de 2240 RPM (651 x g) por cinco minutos, conforme protocolo de Boni (2012). No entanto, ao analisar o sobrenadante notamos a presença de vários ovos. Optou-se por aumentar a rotação para 3100 RPM (1258 x g), e menor concentração de ovos foram perdidos no sobrenadante.

Considera-se a velocidade e o tempo de centrifugação uma variável importante na recuperação de ovos. No método de Silva et al., (1991) a rotação utilizada foi 2.000 RPM durante dois minutos e, Dunsmore et al., (1984) utilizaram a mesma velocidade de rotação, porém com tempo superior de centrifugação - 10 minutos. Na metodologia utilizada por O'lorcain, (1994) ocorrem duas centrifugações: a primeira a 1500RPM (3279 x g) durante 5 minutos e após a retirada do sobrenadante, lavagem do sedimento, e ressuspensão da amostra com solução de Na NO₃ saturado (Nitrato de sódio) (sp.gr-1,35) a segunda centrifugação decorria a 4000 RPM (2325 x g) durante 15 min.

De acordo com Kazacos, (1983), métodos que aplicam a técnica de centrífugo-flutuação são capazes de recuperar de 22 a 40 vezes mais ovos de helmintos do solo do que as técnicas de flutuação isoladamente. A combinação de ambas as técnicas proporciona uma amostra com uma elevada concentração de parasitos, auxiliando na remoção de partículas e maior purificação da amostra.

A maioria dos ovos de parasitos, com exceção de ovos operculados e aqueles com maior densidade do que o meio flutuante pode ser recuperado eficientemente em uma condição viável, por exemplo, de densidade durante a flutuação. Smith et al., (1998), relata que a gravidade específica de muitos ovos de helmintos situa-se entre $1 \pm 0,5$ e $1 \pm 0,18$ (por exemplo, *A. lumbricoides*, $1 \pm 0,13$; *T. Trichiura* spp., $1 \pm 0,15$) e

eles podem ser concentrados por flutuação, pelo qual as partículas menos densas do que o meio flutuam para a superfície da solução empregada.

Quinn et al., (1980), destacam que as variáveis densidade e as propriedades físico-químicas da solução de flutuação empregada para a detecção de ovos de parasitos no solo devem ser consideradas. Em adição, a eficiência da flutuação é impactada pelas propriedades da solução de flutuação, pelas características da matriz do solo e, pela área da secção transversal disponível para o curso dos ovos flutuarem em relação ao volume de matriz presente. Augustine & Smillie (1962) reforçam que o solo arenoso é mais propício a maturação de larvas, em média 43,0 % enquanto que em solos argilosos só 0,6 a 12,0 % das larvas se desenvolvem.

A solução de flutuação utilizada no presente trabalho, em todos os tratamentos, foi a sacarose (gravidade específica de 1,24). Alguns estudos apontaram baixas recuperações de ovos quando utilizando a sacarose, devido provavelmente à sua viscosidade (Ayres et al., 1996; Loh et al., 1998; Bowman et al., 2003). Outra característica reportada é que a sacarose pode deformar ovos, e interferir na quantificação. No entanto, não foram observadas alterações nas formas parasitárias no presente estudo.

Oliveira (2012) ao comparar as soluções de flutuação: sulfato de zinco (densidade 1,18), solução saturada de cloreto de sódio e sacarose (densidade 1,33), observou melhores recuperações com sacarose gravidade específica (1,33) para ovos. Kuczynska e Shelton (1999) em experimentos de extração de oocistos de *Cryptosporidium* em solos também observaram melhores recuperações com sacarose.

Para melhorar as recuperações, é indicado fazer flutuações sequenciais a fim de recuperar ovos presos entre partículas, como relata Quinn et al., (1980) que obtiveram

um adicional de 10 a 20,0 % a mais de recuperação dos ovos semeados. Os ovos podem ser recuperados em até cinco lâminas, sendo que a maioria deles é recuperada nas três primeiras lâminas. O tempo de flutuação também é importante fator na recuperação, o ideal seria 20 minutos, podendo ser aumentado quando a solução é altamente viscosa como é o caso da solução saturada de açúcar. Organismos que sobem para a superfície começam a afundar após cerca de 1h de flutuação, por conseguinte, a amostra deve ser removida do menisco antes deste período (Kazacos, 1983; Loh; Israf, 1998 Oge; Oge, 2000).

Tendo em vista que no presente estudo a solução de flutuação apresentou-se viscosa o tempo de flutuação padronizado foi de 40 minutos, sendo a lamínula trocada quatro vezes, para aumentar a recuperação de ovos.

Após a padronização e escolha da melhor metodologia de detecção em condições de contaminação artificial (Apêndice 3), a mesma foi aplicada para a detecção de ovos naturalmente presentes no ambiente e, conhecer-se o nível de contaminação do litoral paranaense.

Um dado importante observado nas praias escolhidas foi a presença de “línguas negras” ou rios (Figura 14) que se comunicam com a areia e contribuem para a contaminação do solo arenoso do local.

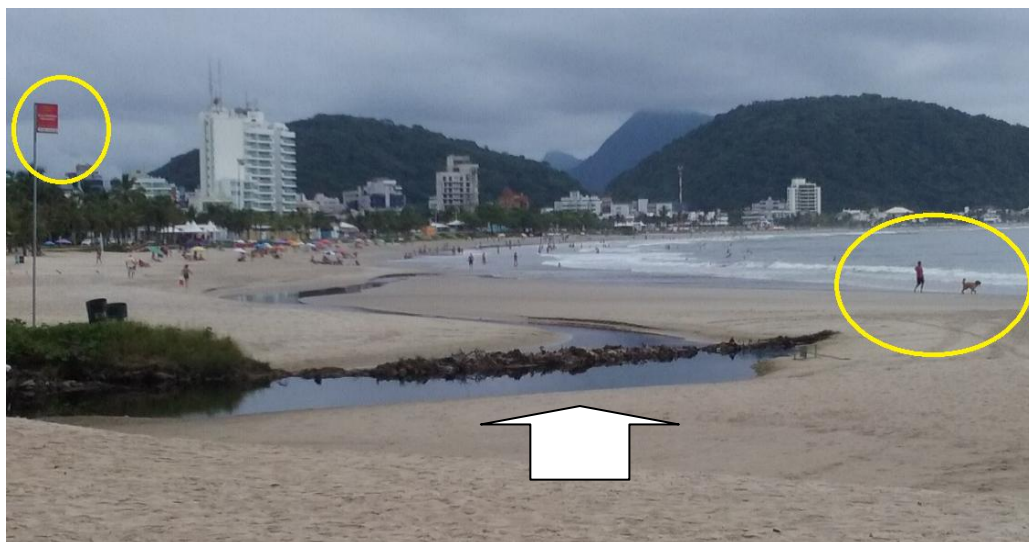


Figura 14 - Língua negra (seta branca), presença de cães e placa indicando a qualidade de balneabilidade de uma das praias, como imprópria para banho. Fonte: A autora (2016)

No ponto de coleta próximo ao rio matinhos, foram detectados ovos de *Trichuris* spp.; estes foram visualizados nas quatro repetições, sendo que em uma delas, encontrou-se cinco ovos do helminto.

Dentre os poucos trabalhos realizados em praias brasileiras, convém salientar o trabalho de Lagaggio et al., (2004), realizado em Guaíba (RS), que encontrou ovos de *Taenia* spp, *Giardia* spp. e ancilostomatídeo, assim como Bordinhão et al., (2006) em Guanabara (RJ) que detectaram grande variedade de parasitos como *Enterobius vermicularis*, *Ascaris lumbricoides*, cistos de *Giardia*, *Entamoeba histolytica*, *Strongyloides stercoralis*, ancilostomatídeos e *Trichuris trichiura*.

Santos et al., (2006) analisaram o litoral de Salvador (BA) e identificou a presença de ovos de *Ancylostoma* spp. *Toxocara* spp. *Toxascaris*, ovos da família Taeniidae, *Trichuris* spp. e *Ascaris* spp.

Na cidade de Corrientes, na Argentina, foram analisadas amostras de areia de seis praias. Das 324 amostras analisadas, 32,7% estavam contaminadas. Em 100 % das amostras encontrou-se a espécie *Ancylostoma* spp. e em 0,3% *Toxocara* sp. (Milano & Oscherov, 2002).

Thé et al. (2005), analisaram o nível de contaminação das praias da Barra até Itapoã em Salvador na Bahia. Foram coletadas 790 amostras de areia e, 29,0 % estavam positivas. Os parasitos do gênero *Ancylostoma* spp. foram mais frequentes que os do gênero *Toxocara* sp. Também foram encontrados parasitos dos gêneros *Toxascaris* sp., *Ascaris* sp., *Taenia* sp. e *Trichuris* sp.

Um estudo de contaminação de água do mar e da areia de praias, realizado na Flórida, revelou contaminação tanto na areia quanto na água por *Vibrio vulnificus* e *Polyomavirus* humanos, enquanto na água do mar, detectou-se contaminação para cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. (Abdelzaher et al., 2010).

Deve-se salientar que no presente estudo, em todas as praias analisadas, notou-se a presença de cães errantes ou cães com proprietários e, ao longo da orla de matinhos encontramos fezes que provavelmente seriam de cão.

Estes fatos ressaltam a importância de analisar a qualidade parasitológica da areia, quanto à contaminação advinda de seres humanos ou de origem zoonótica e, possibilidade de transmissão de doenças para os seres humanos. Este fato foi comprovado neste estudo onde detectou-se contaminação por ovos de *Trichuris* sp. e por uma imensa quantidade de ovos de ancilostomatídeos.

O parasito ancilostomatídeo foi verificado nas duas amostras fecais analisadas, sendo que em uma delas, foi detectado por todos os métodos coproparasitológicos efetuados.

A relevância da padronização de um método de recuperação de ovos de helmintos a partir de amostras ambientais, especialmente aquelas destinadas à recreação humana, consiste no fornecimento de evidências de contaminação por diferentes enteroparasitos sendo um importante indicador biológico de contaminação fecal.

Além disso, sinaliza a necessidade de pesquisa de outros agentes etiológicos causadores de gastroenterite, com implicações importantes em saúde humana como os enterovírus, o vírus da hepatite A e as enterobactérias (Silva et al. 1991).

8 CONCLUSÃO

1. O melhor tratamento evidenciado pelo presente estudo, em situação de contaminação artificial, foi a utilização de vórtex para homogeneização da amostra, seguida de utilização de solução de dispersão de glicina 1M e tempo de contato de 1h.
2. As condições do litoral paranaense, a partir da análise da contaminação ambiental por helmintos parasitos, podem ser consideradas preocupantes visto que formas parasitárias (ovos) de *Trichuris* spp. e uma grande concentração de ovos de Ancilostomatídeos foram identificados nas fezes presentes na areia, indicando um risco à saúde da população autóctone e para os visitantes das praias destes locais.
3. Reitera-se a importância da pesquisa de ovos de helmintos como bons indicadores de contaminação ambiental, visto que por serem maiores, mais resistentes, persistirem mais tempo no solo, e serem relativamente mais fáceis de serem evidenciados no ambiente, fornecem indicação segura de contaminação fecal, demonstrando a necessidade de estabelecer seu monitoramento, a fim de garantir a qualidade sanitária de praias e minimizar os riscos em saúde pública.
4. O presente estudo que está inserido em um projeto de pesquisa de monitoramento de praias do litoral paranaense foi submetido ao Edital Universal 1 – 2016 e aprovado (Apêndice 2).

9 REFERÊNCIAS

- Araújo, F.R; Araújo, C. P; Werneck M. R; Gorski, A. Larva migrans cutânea em crianças de uma escola em área do Centro-Oeste do Brasil / Cutaneous larva migrans in children of a school, Brazil. **Ver Saúde Publica.** v.34 n.1 p. 84-5, 2000.
- Abe Jacob, C.M.; Oselka, G.W. Toxocaríase na infância. **Pediatr.** v.13, p.4855,1991.
- Abdelzaher A.M; Wright M.E; Ortega C; Solo-Gabriele H.M; Miller G; Elmir S; Newman X; Shih P; Alfredo Bonilla J; Bonilla T. Presence of Pathogens and Indicator Microbes at a Non-Point Source Subtropical Recreational Marine Beach. **Appl. Environ. Microbiol.** v.76 n.3, p.724–732, 2010.
- Andresiuk, M.V; Denegri, G.M; Esardella, N.H; Hollmann, P. Encuesta coproparasitológica canina realizada en plazas públicas de la ciudad de Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. **Parasitol Latinoamer** v. 58, p.17-22, 2003.
- Ayres, R.; Lee, D.; Mara, D. Analysis of wastewater for use in agriculture – A laboratory manual of parasitological and bacteriological techniques. **Dept of Civil Engineering University of Leeds. England, Leeds. U.K.** p.31 , 1996.
- Baermann, G. Eine einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomum (Nematoden) larven in Erdproben. **Geneeskundig Tijdschrift voor Nederlandsch Indië**, v.57, p.131-137, 1917.
- Barriga, O.O. Rational control of canine toxocariasis by the veterinary practioner. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 98, p. 216-221, 1991
- Basso, R.M.C.; Silva Ribeiro, R.T.; Soligo, D.S.; Ribacki, S.I.; Callegari Jacques, S.M.; Zoppas, B.C.A. Evolução da prevalência de parasitoses intestinais em escolares em Caxias do Sul, RS. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.41, n.3, p.263-268, mai-jun, 2008.
- Belatto, V. Larva Migrans Cutanea e visceral. In: **Manual de Zoonoses. Programa de Zoonoses região Sul**, v. 1, 2ª ed., p.56-67, 2010.
- Belloto, M. V. T. Enteroparasitoses numa população de escolares da rede pública de ensino do Município de Mirassol, São Paulo, Brasil. **Rev. Pan. Amaz. Saúde**, v. 2 n.1, p.3744, 2011
- Bethony, J.; Brooker, S.; Albonico, M.; Geiger, S. M.; Loukas, A.; Diemert, D.; Hotez, P. J. Soil – transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. **The Lancet.** v.367, p.1521-1532, 2006.
- Bird, E. C. F. Beach Management. New York: Wiley. 219 p, 1996.
- Boukai N. Qualidade sanitária da areia das praias no município do Rio de Janeiro: diagnóstico e estratégia para monitoramento e controle **[dissertação de mestrado]** Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro: 2005.

Bowman, D.D et al Precision and accuracy of an assay for detecting Ascaris eggs in various biosolid matrices. **Water Res.** v.37, p.2063–2072, 2003.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. CONAMA. Resolução nº 274, de 29 de novembro de 2000. Dispõe sobre os critérios de balneabilidade em águas. Diário Oficial da União: República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, no 18, de 25 de janeiro de 2001, Seção 1, páginas 70-71. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/Acesso em: Agosto/ 2016>

Brooker, S. Estimating the global distribution and disease burden of intestinal nematode infections: adding up the numbers – a review. **Int. J. Parasitol.** v.49, p.1137:1144, 2010.

Bundy DAP, Cooper ES. Trichuris and trichuriasis in humans. **Adv Parasitol** v. 28, p.107-173, 1989.

Castro, J. M.; Santos, S. V.; Monteiro, N. A. Contaminação de canteiros da orla marítima do Município da Praia Grande, São Paulo, por ovos de Ancylostoma e Toxocara em fezes de cães. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 2, p. 199-201, mar./abr. 2005.

Calleiros LC, Silva JH, Saad K, Lopes ER, Oliveira ACM. Larva migrans em glândula sebácea do couro cabeludo. **Rev Soc Bras Med Trop.** v. 9, p. 32: 187, 1999.

Campos R, Briques W. Levantamento multicêntrico de parasitoses intestinais no Brasil. Os resultados finais. Rhodia: São Paulo; 1988. In: Carvalho OS. Prevalência de helmintos intrestinais em três mesorregiões do Estado de Minas Gerais. **Rev Soc Bras Med Trop.** v. 35, n. 6, p. 597-600, 2002.

CETESB. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Estudo epidemiológico: ocorrência de distúrbios gastrointestinais em banhistas e sua correlação com a qualidade sanitária das águas das praias. São Paulo, 1998.

CETESB. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Qualidade das praias litorâneas do Estado de São Paulo. Governo do Estado de São Paulo. São Paulo: Secretaria de Meio Ambiente; 2009.

CETESB. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Qualidade das águas superficiais no estado de São Paulo 2014. São Paulo, 2015.

Costa-Macedo LM, Costa MCE, Almeida LM. Parasitismo pelo Ascaris lumbricoides em crianças menores de dois anos em comunidade aberta do Rio de Janeiro. **Cad Saúde Públ**, v. 15, p.173-178, 2003.

Crompton, D. W. T.; Nesheim, M.C. Nutritional impact of intestinal helminthiasis during the human life cycle. **Annual Rev. Nut.** v.2, p.35-59, 2002.

de Oliveira, C. M. B. Determinação de protocolo para detecção de cistos de Giardia spp. e ovos de helmintos, em solos. Dissertação Mestrado. Unicamp, São Paulo, 2012.

Despommier D. Toxocariosis: Clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. **Clin Microbiol Rev.** v.16, p.265-272, 2003.

Dimian MM, Martins M, Sardinha JF, Souza L O, Chaves A, Tavares AM. Frequência de anticorpo anti *Toxocara canis* em comunidade do Rio Uatumã, no Estado do Amazonas. **Rev Soc Bras Med Trop.** v.40, n.6, 2007.

Ehremberg, J. P. Por um continente livre de verminoses. Washington. **Organização Panamericana da Saúde.** 2002

Enko k, Tada T, Ohgo KO, Nagase S, Nakamura K, Ohta K. Fulminant eosinophilic myocarditis associated with visceral larva migrans caused by *Toxocara canis* infection. **Circ J.** v. 8, p.73: 1344, 2009.

Faust, E.C.; D'antoni, J.S.; Odom, V.; Miller, M.J.; Peres, C.; Sawitz, W.; Thomen, L.F. A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. Preliminary communication. **Am. J. Trop. Med.** v.18, p.169-183, 1938.

Figueiredo S.D.P, Taddei J.A.A.C, Menezes J.J.C, Novo NF, Siva EOM, Cristovão H.L.G. Estudo clínico epidemiológico da toxocaríase em população infantil. **J. Pediatr.** v.81, 2005.

Fletcher, S. M.; Stark, D.; Harkness, J.; Ellis, J. Enteric protozoa in the developed world: a public health perspective. **Clin. Microbiol. Rev.** v.25, p.420-449, 2012.

Fontes, G., Oliveira, K.K.S.; Oliveira, A.K.L.; Rocha, E.M.M. Influência do tratamento específico na prevalência de enteroparasitoses e esquistossomose mansônica em escolares do município de Barra de Santo Antônio. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,** v.36, n.5, p.625-628, set-out. 2003.

Gani, R. Charitha, V, C. Kondaiah, P. M., & Srilatha, C. Comparative evaluation of flotation techniques for the detection of soil borne parasites. **Journal of parasitic diseases,** v.37, n.2, p.260-263, 2013.

Glickman, L.T; Schantz, P.M. Epidemiology and pathogenesis of zoonotic toxocaríasis. **Epidemiology Review,** v.3, p.230-50, 1981

Hotez, P.J. Pediatric geohelminth infections: Trichuriasis, Ascariasis, and Hookworm infections. **Sem Ped Infect Dis** v.11, p.236-244, 2000.

Grasberger B.L, Clore G.M, Gronenborn, A.M. High resolution structure of *Ascaris* trypsin inhibitor in solution: direct evidence for a pH-induced conformational transition in the reactive site. **Structure** v.95, n.2, p. 669-678, 1994.

Heukebach J, Wilcke T, Feldmeier H. Cutaneous larva migrans (creeping eruption) in urban slum in Brazil. **Int J Dermatol.** v. 5, p. 43-511, 2004.

Hoffman, W.A.; Pons, J.A.; Janer, J.L. The sedimentation concentration method in schistosomiasis mansoni. **Journal of Public Health and Tropical Medicine,** ago. 1933

- Hotez, P.J; Wilkins, P.P; Toxocariasis: America's most common neglected infection of poverty and a helminthiasis of global importance? **PLoS Negl Trop Dis**. p.3-400, 2009.
- Jeandron, A., Ensink, J. H., Thamsborg, S. M., Dalsgaard, A., Sengupta, M. E. A quantitative assessment method for *Ascaris* eggs on hands. **PloS one**, v. 9, n.5, e96731. 2014
- Kazacos, K.R. Improved method for recovering Ascarid and other helminth eggs from soil associated with epizootics and during survey studies. **Am. J. Vet. Res.** V.44, p.896–900, 1983.
- Lima, W.S, Camargo, M.C.V, Guimarães, M.P. Surto de Larva migrans em uma creche de Belo Horizonte, Minas Gerais (Brasil). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** v.26, p.122-124, 1984.
- Lima W.S. Larva migrans. In: Neves DP, editor. **Parasitologia humana. São Paulo: Atheneu**; p. 242-246, 2000.
- Guimarães, A.M, Alves, E.L, Rezende, G.F, Rodrigues, M.C. Ovos de *Toxocara* sp. e larvas de *Ancylostoma* sp. em praça pública de Lavras, MG. **Rev Saude Publica** . v.39, p.293-295, 2005.
- Mattone-Volpe F. Cutaneous larva migrans infection in the pediatric foot. A review and two case reports. **J Am Pediatr Med Assoc** .v. 31, p, 88:228, 1998.
- Melo, M.C.B.; Klem, V.G.Q.; Mota, J.A.C.; Penna, F.J. Parasitoses intestinais. **Revista de Medicina de Minas Gerais**, v.14, p.3 -12, 2004.
- Melo, A.C.F.L.; Furtado, L.F.V.; Ferro, T.C.; Bezerra, K.C.; Costa, D.C.A.; Costa, L.A.; Da Silva, L.R. Contaminação parasitária de alfaces e sua relação com enteroparasitoses em manipuladores de alimentos. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 5, n. 3, p. 47-52, 2011.
- Mentz, M.B; Rott, M.B; Jacobsen, S.I.V, Baldo G, Rodrigues Jr, V. Frequência de ovos de *Toxocara* spp. em três parques públicos da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Rev. Patol. Trop.** v.33, p.105-112, 2004.
- Milano, A.M.F; Oscheorov, E.B. Contaminación por parásitos caninos de importancia zoonótica en playas de la ciudad de Corrientes, Argentina. **Rev. Latinoam. Parasitol.** v.57, p.119-123, 2002.
- Morgan, R. Preferences and Priorities of Recreational of Beach Users in Wales, UK. **Journal of Coastal Research, Lawrence**, v.15, n. 3, p. 653-667, Mai. 1999.
- Moore, M.N; Depledge, M.H; Fleming, L; Hess, P; Lees, D; Leonard, P; Madsen, L; Owen, R; Pirlet, H; Seys, J; Vasconcelos, V; Viarengo, A. Oceans And Human Health (Ohh): A European Perspective From The Marine Board Of The European Science Foundation (Marine Board-Esf). **Microb Ecol.** V. 65, p. 889–900, 2013
- Nelson, K.L. and Darby, J.L. Inactivation of viable *Ascaris* eggs by reagents during enumeration. **Appl. Environ. Microbiol.** v.67, p.5453–5459, 2001.

- Neves, D. P et al. Parasitologia humana. 12.ed. São Paulo: **Editora Atheneu**, 2011.
- Oliveira, U. D., & Chiuchetta, S. J. R. Ocorrência de enteroparasitoses na população do Município de Goioerê-PR. **UNICIÊNCIAS**, v.14,n.2, 2015.
- Oge, H. and Oge, S. Quantitative comparison of various methods for detecting eggs of *Toxocara canis* in samples of sand. **Vet. Parasitol.** v.92, p75–79, 2000.
- O’Lorcain P . Prevalence of *Toxocara canis* ova in public playgrounds in the Dublin area of Ireland. **J Helminthol** v. 68, p.237–241, 1994.
- Oro, D.; Koproski, G. K.; Oro, N. A.; Sbardelotto, C.; Seger, J. Prevalência de parasitas intestinais em crianças de Descanso – Santa Catarina – Brasil. **Unesc & Ciência – ACBS, Joaçaba**, v. 1, n. 2, p. 151-156, jul./dez. 2010.
- Quinn, R., Smith, H. V., Bruce, R. G., & Girdwood, R. W. A. Studies on the incidence of *Toxocara* and *Toxascaris* spp. ova in the environment. 1. A comparison of flotation procedures for recovering *Toxocara* spp. ova from soil. **Journal of Hygiene**, v.84, n.01, p. 83-89, 1980.
- Rio de Janeiro. (Município). Secretaria do Meio Ambiente. SMAC. Resolução SMAC Nº468 de 28/01/2010. Dispõe sobre a análise e informações das condições das areias das praias no Município do Rio de Janeiro.
- Rey, L. Bases da Parasitologia Médica. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
- Rey, L. Bases da parasitologia médica. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011
- Ritchie, L.S.; An ether sedimentation technique for routine stool examinations. **Bull. U.S. Army Med. Dept.** v.8 p.326, 1948
- Rocha, S.; Pinto, R. M. F.; Floriano, A. P.; Teixeira, L. H.; Bassili, B.; Martinez, A.; Costa, S. O. P.; Caseiro, M.M. Environmental analyses of the parasitic profile found in the sandy soil from the Santos municipality beaches, SP, Brazil. **Rev. Ins. Med. Trop. de São Paulo**, v.53, p.277- 281, 2011.
- Santos-Junior, G.O.; Silva, M.M.; Santos, F.L.N. Prevalência de enteroparasitoses em crianças do sertão baiano pelo método de sedimentação espontânea. **Revista de Patologia Tropical**, v.35, n.3, p.233-240, set-dez. 2006.
- Santarém V.A, Magoti L.P, Sichieri T.D. Influence of variables on centrifuge-flotation technique for recovery of *Toxocara canis* eggs from soil. **Rev Inst Med trop Sao Paulo** v.51, n.3, p.163–167, 2009.
- Shuval H. Estimating the global burden of thalassogenic diseases: human infectious diseases caused by wastewater pollution of the marine environment. **J. Water Health**,v.1 n.2, p.53–64, 2003
- SMAC. Prefeitura Municipal do Rio de Janeiro. Secretaria Municipal do Meio Ambiente. Resolução SMAC nº 468 de 28 de dezembro de 2000. Dispõe sobre a análise

e informações das condições das areias das praias do Município do Rio de Janeiro. D.O. Rio de 29.12.2000.

Silva, N. R.; Brooker, S.; Hotez, P. J.; Montresor, A.; Engels, D.; Savioli, L. Soiltransmitted helminth infections: updating the global picture. **Trends. Parasitol.** v.19, p.547 – 551, 2003.

Silva, P.F.; Cavalcanti, I.M.D.; Irmão, J.I. & Rocha, F.J.S. - Common beach sand contamination due to enteroparasites on the southern coast of Pernambuco State, Brazil. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v.51 n.4, p. 217-218, 2009.

Silva, E.F.; Almeida, K.S.; Souza, J.J.N.; Freitas, F.L.C. Enteroparasitoses em crianças de áreas rurais do município de Coari, Amazonas, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v.38, n.1, p.35-43, jan-mar. 2009.

Silva, J.C.; Furtado, L. F. V.; Ferro, T. C.; Bezerra, K. C.; Borges, E. P.; Melo, A. C. F. L. Parasitismo por *Ascaris lumbricoides* e seus aspectos epidemiológicos em crianças do estado do Maranhão. **Rev. Ins. Med. Trop. de São Paulo**, V.44, p.100-102, 2011.

Smith, H.V. (1998) Detection of parasites in the environment. *Parasitology* 117 (Suppl.), S113–S141

Tanner, S.; Leonard, W.R.; Mcdad, T.W.; Reyes-Garcia, V.; Godoy, R.; Huanca, T. Influence of helminth infection on childhood nutritional status in lowland Bolivia. **Am. J. Hum. Biol.** V.21, p. 651-656, 2009.

Teixeira, J. C.; Heller, L. Fatores ambientais associados às helmintoses intestinais em áreas de assentamento subnormal, juiz de fora, MG. **Eng. Sanit. Ambient.**v.9, n.4,p. 301, 2004.

Thé, T. S.; Santos, A. B.; Souza, T. P.; Santos, N. M. Contaminação das praias por parasitos caninos de importância zoonótica na orla da parte alta da cidade de Salvador/Bahia. In: Congresso Brasileiro De Parasitologia. Porto Alegre. Goiânia: **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, 2005.

Tripathy, K.; Duque, E.; Bolaños, O.; Lotero, H.; Mayoral, I. G. Mal absorption syndrome in ascariasis. **The Amer. J. Clinical. Nut.** .v.25, p. 1276-1281, 1972.

Urquhart, G. M.; Armour, J.; Duncan J. L.; Dunn A. M.; Jennings, F. W.; *Parasitologia Veterinária*, 2 ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 1998.

WHO, World Health Organization. Deworming for health and development. Report of the Third Global Meeting of the Partners for Parasite Control. **Geneva: World Health Organization; 2005**

WHO, 2015. Investing to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases: Third WHO Report on Neglected Tropical Diseases 2015. Holmes P, ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 161–167, 2015.

World Health Organization. World Health Report. Programmes and projects – Soiltransmitted helminthes [texto na internet]. Genebra, 2010. Disponível em: <http://www.who.int/intestinal_worms/en/. Acesso em: 18/ 10/ 2016

WHO. Guidelines for safe recreational water environments. Geneva, 2003. v. 1: Coastal and fresh waters. Available in: .

WILLIS, H.H.; A simple levitation method for detection of hookworm ova. **Medical Journal of Australia, North Sidney**, v.8, p.375-376, 1921.

Wyn-Jones, A.P; Wyer, M.D; Kay, D; Au-Yeung, H.C; Girones, R; López Pila, J; Husman, A.M.R; Rutjes, S; Schneider, O. Relationships Between Human Adenoviruses And Faecal Indicator Organisms In European Recreational Waters. **Water Research** v.46, p. 4130-4141, 2012.

Yu SH, Jiang ZX. Infantile hookworm disease in China. A review. **Acta Tropica** v.59, p.265-270, 1995.

10. APÊNDICES

10.1 Apêndice 1: Submissão de projeto para o edital da Fundação Araucária (2016).

Projeto PPSUS - EFP_00012772

Dados do Edital

Tipo do fomento	Sigla do Edital
Fomento PPSUS	EFD_00000115
Nome do Edital	
Programa Pesquisa para o Sistema Único de Saúde: Gestão Compartilhada em Saúde PPSUS Edição 2015 Fundação Araucária-PR / SESA-PR / MS-Decit/ CNPq	

Dados do Coordenador do Projeto

Nome do Pesquisador		
DIEGO AVERALDO GUIGUET LEAL		
Instituição de vínculo do coordenador	Órgão	Unidade
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA	---	---
UF	Município	
PR	CURITIBA	
Endereço Comercial	CEP	E-mail
RUA XV DE NOVEMBRO - 1299 --- CENTRO	80060000	diego.leal@ufpr.br
Telefone Comercial	Fax	
(041) 32642243 ---	(041) 32642243	

Dados do Projeto

Sigla do Projeto	
EFP_00012772	
Título	
MONITORAMENTO AMBIENTAL DE PARASITOS NO LITORAL DO PARANÁ COMO INSTRUMENTO PARA ELABORAÇÃO DE PROPOSTA DE LEGISLAÇÃO ESTADUAL DE BALNEABILIDADE.	
Modalidade de Gestão	Setor de aplicação da Pesquisa
Estudo Multicêntrico	Políticas públicas e saúde
Duração total	Data prevista para início
24 meses	01/12/2016
Pesquisa envolve algum grupo Populacional?	A Pesquisa terá como escopo alguma Área Geográfica?
Não	Sim
Resumo	

10.2 Apêndice 2: Submissão de projeto para o Edital Universal (2016).



Número do Processo: 409636/2016-9
Nome: Diego Averaldo Guiguet Leal
Data Envio: 26/02/2016 7:37:55
Setor: COIAM/CGCTM/DABS
CA: CA

IDENTIFICAÇÃO - PROJETO

NÚMERO DO PROCESSO	LINHA DE FOMENTO/CHAMADA
409636/2016-9	Apoio a Projetos de Pesquisa / Universal 01/2016 - Faixa A - até R\$ 30.000,00
COMITÊ ASSESSOR	
CA - Ciências Ambientais	
ÁREA DE CONHECIMENTO	
Qualidade do Ar, das Águas e do Solo	
MODALIDADE CONTRATAÇÃO	CA DE JULGAMENTO
Individual	CA - Ciências Ambientais

DADOS DO SOLICITANTE

PROPONENTE	CPF	TITULAÇÃO MÁXIMA
Diego Averaldo Guiguet Leal	292.956.038-00	Doutorado
DATA DE NASCIMENTO	SEXO	E-MAIL
02/10/1982	Masculino	lealdag@gmail.com
END RESIDENCIAL	TELEFONE RESIDENCIAL	NACIONALIDADE
Rua Doutor Quirino - De 1302/1303 Ao Fim - Campinas SP	19 - 37227920	Brasileiro
FAX		
INSTITUIÇÃO PROPONENTE		
UFPR - Universidade Federal do Paraná (Rua XV de Novembro, 1299 Curitiba)		
ÁREA DE ATUAÇÃO DO PROPONENTE		
<ul style="list-style-type: none"> - Ciências Biológicas/Protozoologia de Parasitos - Ciências Biológicas/Parasitologia Ambiental - Ciências Biológicas/Parasitologia clínica - Ciências Biológicas/Helmintologia de Parasitos 		

INSTITUIÇÕES - PROJETO

FUNÇÃO	NOME
Colaboradora	UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas
Colaboradora	IAP - Instituto Ambiental do Paraná
Colaboradora	UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Executora/Sede	UFPR - Universidade Federal do Paraná

10.3 Apêndice 3: Metodologia padronizada

Material necessário:

- Estante de tubos; tubo Falcon de 15 mL, pipetas Pasteur, lâminas, lamínulas.
- Solução de Sacarose gravidade específica 1,24, Glicina (1M; ph 5,5).
- Aparelho Vortéx.

Procedimento metodológico:

1. Colocar 5g de solo no tubo Falcon de 15 mL.
2. Adicionar 8 mL de solução dispersante: Glicina (1M, ph 5,5)
3. Homogeneizar manualmente: virar o tubo 10 vezes.
4. Homogeneizar com vortéx: 2 minutos
5. Centrifugar a 3100 rpm (1258 g) por 5 minutos.
6. Esperar 5 minutos
7. Retirar o sobrenadante e passar para outro tubo.
8. Adicionar 10 ml de sacarose, no tubo contendo a amostra.
9. Completar o volume com sacarose até formação de um menisco positivo.
10. Colocar uma laminula sobre o tubo.
11. Esperar 40 minutos
12. Retirar a lamínula com cuidado, colocar em uma lâmina e analisar.
13. Trocar a lamínula 4 vezes.