

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PATRICIA PADILHA RIBEIRO

PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIAS DE DETECÇÃO DE HELMINTOS
TRANSMITIDOS PELO SOLO VISANDO O MONITORAMENTO DA QUALIDADE
AMBIENTAL DE PRAIAS E OUTRAS MATRIZES DE SOLO ARENOSO

CURITIBA

2020

PATRICIA PADILHA RIBEIRO

Padronização de metodologias de detecção de helmintos transmitidos pelo solo visando o monitoramento da qualidade ambiental de praias e outras matrizes de solo arenoso

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, área de concentração em Parasitologia, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Diego Averaldo Guiguet Leal

Co-orientadora: Profa. Dra. Márcia Kiyoe Shimada

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Ribeiro, Patrícia Padilha

Padronização de metodologias de detecção de helmintos transmitidos pelo solo visando o monitoramento da qualidade ambiental de praias e outras matrizes de solo arenoso. / Patrícia Padilha Ribeiro. – Curitiba, 2020. 149 p.: il.

Orientador: Diego Averaldo Guiguet Leal.

Coorientadora: Márcia Kiyoe Shimada.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Helminto. 2. Solos arenosos. 3. Microbiologia ambiental. 4. Parasitologia. 5. Praias. I. Título. II. Leal, Diego Averaldo Guiguet, 1982-. III. Shimada, Márcia Kiyoe, 1974-. I. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (22. ed.) 592.3



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MICROBIOLOGIA,
PARASITOLOGIA E PATOLOGIA - 40001016044P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de PATRICIA PADILHA RIBEIRO intitulada: *Padronização de metodologias de detecção de helmintos transmitidos pelo solo visando o monitoramento da qualidade ambiental de praias e outras matrizes de solo arenoso*, sob orientação do Prof. Dr. DIEGO AVERALDO GUILLET LEAL, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 12 de Agosto de 2020.

Assinatura Eletrônica

13/08/2020 13:02:22.0

DIEGO AVERALDO GUILLET LEAL
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

13/08/2020 13:31:06.0

ROSIMEIRE NUNES DE OLIVEIRA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA)

Assinatura Eletrônica

13/08/2020 13:30:05.0

RONALDA SILVA DE ARAÚJO
Avaliador Externo (COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO)

Assinatura Eletrônica

13/08/2020 12:44:01.0

MIGUEL MANSUR AISSE
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

DEDICATÓRIA

A Sirlene,

Você é poderosa por fazer sua voz ser ouvida e mostrar
diariamente seu lugar no mundo!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas oportunidades e bênçãos concedidas.

Aos meus pais, Sebastião e Sirlene, que sempre primaram pela educação de seus filhos, apoiando e incentivando em todos os momentos da vida. Vocês são meu porto seguro e minha inspiração de luta. À minha irmã, Priscila, fiel companheira, obrigada por acreditar em mim e me motivar a seguir em frente. Ao meu afilhado, Miguel, por me ensinar todos os dias sobre o amor genuíno das crianças. A Papati te ama!

As colegas de laboratório, Amanda, Bárbara, Juliana, Máira e Roberta por me acolherem em momentos difíceis, foi determinante estar cercada de pessoas como vocês nessa trajetória. Em especial Amanda e Bárbara, parceiras de inesquecíveis aventuras durante as coletas das amostras. Ao Thiago, que mesmo distante se fez presente dando suporte, amor e carinho.

Ao meu orientador Diego Averaldo Guiguet Leal, pela dedicação e troca de experiência profissional nesses quatro anos de orientação. A minha co-orientadora Márcia Kiyoe Shimada, pelos ensinamentos acadêmicos e apoio nessa jornada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Às agências de fomento – Fundação Araucária - CP 01/2016 - Programa Pesquisa para o Sistema Único de Saúde: Gestão Compartilhada em Saúde - (Convênio 50 / 2017) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Universal - MCTI / CNPq nº 01/2016), processo 409636/2016-9 pelo financiamento do projeto “Monitoramento ambiental de parasitos no litoral do Paraná como instrumento para elaboração de proposta de legislação estadual de balneabilidade”.

Às instituições parceiras Centros Municipais de Educação Infantil (CMEI), Instituto Ambiental do Paraná (IAP) e Laboratório Central do estado do Paraná (LACEN) que colaboraram viabilizando o desenvolvimento dessa pesquisa.

Em um momento crítico como o que vivemos não posso deixar de agradecer a universidade pública e as políticas de expansão universitária, que me possibilitaram o acesso à formação gratuita e de qualidade. Me sinto honrada por essa oportunidade e por representar os filhos da classe trabalhadora, que lutam pela formação acadêmica.

*Diz-se que, mesmo antes de um rio cair no oceano ele treme de medo.
Olha para trás, para toda a jornada, os cumes, as montanhas, o longo caminho sinuoso através das florestas, através dos povoados, e vê à sua frente um oceano tão vasto que entrar nele nada mais é do que desaparecer para sempre.
Mas não há outra maneira. O rio não pode voltar.
Ninguém pode voltar. Voltar é impossível na existência. Você pode apenas ir em frente.
O rio precisa se arriscar e entrar no oceano.
E somente quando ele entra no oceano é que o medo desaparece.
Porque apenas então o rio saberá que não se trata de desaparecer no oceano, mas tornar-se oceano.
Por um lado é desaparecimento e por outro lado é renascimento.
Assim somos nós.
Só podemos ir em frente e arriscar.
Coragem! Avance firme e torne-se Oceano!*

Osho

RESUMO

O solo é considerado o principal reservatório ambiental de ovos de helmintos, entretanto, inexistente um método padrão ou ISO (*International Organization for Standardization*) validada para a detecção destes patógenos em matrizes arenosas ambientais. O monitoramento de helmintos transmitidos pelo solo (HTS) em áreas recreacionais é relevante por fornecer dados dos eventuais riscos associados à saúde pública. Os objetivos deste estudo foram: i) padronizar metodologias para recuperação de ovos de helmintos em diferentes matrizes de solo arenoso mediante ensaios de contaminação artificial; ii) realizar o monitoramento da contaminação por ovos de helmintos em areias de praias do litoral do Paraná por um período de dois anos aplicando a metodologia padronizada; iii) verificar a qualidade sanitária das praias mediante determinação da concentração de *Escherichia coli* e *Enterococcus* sp.; iv) realizar o monitoramento da contaminação por helmintos em areia de parques e Centros Municipais de Educação Infantil (CMEI) localizados na cidade de Curitiba. Três áreas de recreação foram selecionadas para realização dos ensaios controle e de monitoramento: área 1 - praias de Matinhos, Caiobá e Guaratuba (24 meses / praia), área 2 - parques públicos (n = 3) e área 3 - creches de Curitiba (n = 3) (10 meses / área). Para estimar a sensibilidade da taxa de recuperação de ovos, 64 protocolos foram analisados em triplicata (192 ensaios) da seguinte forma: 32 ensaios para areia de praia (área 1) e 16 ensaios para cada área 2 e 3. Um número conhecido de ovos de *Ascaris suum* foi inoculado em amostras de areia esterilizadas e as seguintes variáveis foram analisadas: homogeneização (vórtex ou agitador magnético), solução de dispersão (Glicina 1M, Tween™ 80, Triton™ X-100 e ICN 7X®) e tempo de contato (5 minutos ou 1 hora). Para a área 1, a maior eficiência de recuperação (41,7 %) foi obtida pelo protocolo 10: tempo de contato de 1 hora e homogeneização de 5 g de amostra com Glicina 1(M) em vórtex seguida de centrifugação (1.250 x g / 5 min) e quatro flutuações sequenciais - 40 minutos cada, em sacarose (1,24 g/cm³). Para as áreas 2 e 3 as maiores eficiências de recuperação (29,6% e 27,3%) respectivamente, foram obtidas através do protocolo 11: 5g de caixa de areia (1 hora de contato) submetida à homogeneização com Triton™ X-100 em vórtex e, centrífugo-flutuação (1.250 x g / 5 min) aliada a três flutuações sequenciais de 30 minutos cada em sacarose (1,24 g/cm³). Em 24 meses de monitoramento da contaminação ambiental por ovos de HTS em areias das praias, pelo menos um gênero de helminto foi detectado em 25% dos meses, sendo *Trichuris* spp., *Ascaris* spp., e ovos da família Ancylostomatidae evidenciados com maior frequência. Elevadas concentrações de bactérias indicadoras foram evidenciadas nestes ambientes, sobretudo *Enterococcus* sp. Ovos da família Ancylostomatidae, *Ascaris* spp. e *Trichuris* spp., foram detectados em 45% das amostras arenosas oriundas de parques de Curitiba, enquanto em CMEI, a contaminação por HTS foi detectada em 70% das amostras que albergavam principalmente *Ascaris* spp. e ovos da família Ancylostomatidae. Os protocolos padronizados neste estudo demonstraram ser eficazes para recuperação de ovos em diferentes matrizes arenosas com diferentes composições granulométricas quando considerados os resultados obtidos em ensaios controle e, especialmente devido à detecção de ovos em situação natural de contaminação em todas as áreas analisadas. Estes resultados deverão ser utilizados pelo órgão ambiental estadual para a proposição de legislação que contemple a pesquisa de HTS e estabelecimento de limites de bactérias indicadoras de contaminação fecal em areias do litoral. Além disso, denotam a necessidade de monitoramento rotineiro de parasitos em diferentes áreas de recreação, visando estabelecer a qualidade sanitária e a minimização dos riscos à saúde pública.

Palavras Chaves: Helmintos Transmitidos pelo solo (HTS). Matrizes de Solo Arenoso; Microbiologia Ambiental; Padronização; Parasitologia Ambiental; Praias.

ABSTRACT

The soil is considered the main environmental reservoir of helminth eggs, however, there is no standard method or validated ISO (*International Organization for Standardization*) for the detection of these pathogens in environmental sandy matrices. The monitoring of Soil Transmitted Helminths (STH) in recreational areas is relevant since it provides data of possible risks associated with public health. The goals of this study were: i) to standardize methodologies for the recovery of helminth eggs in different sandy soil matrices through artificial contamination assays. ii) to perform the monitoring of helminth egg contamination in beach sands from Paraná coast during two years, applying the standardized methodology; iii) to verify the sanitary quality of beaches by the estimation of the concentration of *Escherichia coli* and *Enterococcus* sp; iv) to conduct monitoring of helminth's contamination in sand areas from parks and Municipal Centers for Early Childhood Education (MCECE) located in the city of Curitiba. Three recreational areas were selected for control trials and monitoring: area 1 – beach sands - Matinhos, Caiobá and Guaratuba (24 months / beach), area 2 - public parks (n = 3) and area 3 – day care center from Curitiba (n = 3) (10 months / area). To estimate the sensitivity of egg recovery rate, 64 protocols were analyzed in triplicate (192 trials) as follows: 32 assays for beach sand (area 1) and 16 assays for areas 2 and 3 each which presented similarity granulometric composition. A known number of *Ascaris suum* eggs were inoculated into sterilized sand samples and the following variables were analyzed: homogenization (vortex or magnetic stirrer), dispersion solution (Glycine 1M, Tween™ 80, Triton™ X-100 and ICN 7X®) and contact time (5 minutes or 1 hour). For area 1, the highest recovery efficiency (41.7%) was obtained by protocol 10: contact time of 1 hour and homogenization of 5 g of sample with Glycine 1(M) in vortex followed by centrifugation (1250 x g / 5 min) and four sequential flotation - 40 minutes each, in a sucrose solution (1.24 g / cm³). For areas 2 and 3 the highest recovery efficiency (29.6% e 27,3%), respectively, was obtained through the protocol 11: 5g of sandbox (1 hour of contact) submitted to homogenization with Triton™ X-100 in vortex, followed by centrifugal-flotation (1250 x g / 5 min) allied to three sequential flotations of 30 minutes each in a sucrose gradient (1.24 g / cm³). In 24 months of monitoring of environmental contamination by STH eggs on the beach sands, at least one genus of helminth was detected in 25% of the months, with *Trichuris* spp., *Ascaris* spp., and eggs of the Ancylostomatidae family being most frequently found. In addition, high concentrations of fecal indicator bacteria have been detected in these environments, especially *Enterococcus* spp. Eggs of the family Ancylostomatidae, *Ascaris* spp. and *Trichuris* spp., were detected in 45% of the sandy samples from parks of Curitiba, while in CMEI, contamination by STH was detected in 70% of samples being more frequently detected *Ascaris* spp. and eggs of Ancylostomatidae family. The protocols standardized in this study proved to be effective for recovering eggs in different sandy matrices with different granulometric compositions when considering the results obtained in control tests and, especially due to the detection of eggs in a natural contamination situation in all analyzed areas. These results will be used by the state environmental agency to propose a legislation that contemplates the research of STH and limits for indicator bacteria in coastal sand areas. They also denote the need for routine monitoring of parasites in different recreation areas, to estimate its sanitary quality and to minimize public health risk.

Key words: Beaches; Environmental Microbiology; Environmental Parasitology; Sandy Soil matrices; Standardization; Soil Transmitted Helminths (STH).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Indicadores de esgotamento sanitário nas capitais costeiras brasileiras: percentual de esgoto coletado (azul) e efetivamente tratado (verde).	18
Figura 2: Distribuição global e número de pesquisas que determinaram a ocorrência de ovos de helmintos em areia de praias*	26
Figura 3: Ciclo de vida dos Helmintos Transmitidos pelo Solo (HTS).	40
Figura 4: Dissecção do útero de fêmea de <i>Ascaris suum</i> para obtenção dos ovos para a fase de padronização (A, B); Ovos dispersos na placa de Petri observados em estereoscópico em aumento de (10X) (C); Suspensão de ovos purificados (D).	47
Figura 5: Pontos de coleta selecionados para o monitoramento da qualidade sanitária do litoral paranaense.	56
Figura 6: Modelo de área demarcada para coleta de amostras de areia.	57
Figura 7: Animais locais circulando nas praias no período de monitoramento do litoral (A, B, C) e fezes de animais encontradas nas areias das praias (setas) (D)...	58
Figura 8: Determinação da concentração de bactérias indicadoras de contaminação fecal em areias de praia do litoral paranaense: Método substrato definido: Colilert e Enterolert.....	61
Figura 9: Parques públicos de Curitiba selecionados para o monitoramento da ocorrência de helmintos em caixas de areia.....	63
Figura 10: Centros Municipais de Educação Infantil de Curitiba selecionados para o monitoramento da ocorrência de helmintos em caixas de areia.	65
Figura 11: Modelo de área demarcada para coleta de amostras de areia.	66
Figura 12: Representação gráfica das taxas de recuperação de ovos de <i>Ascaris suum</i> por flutuação sequencial (%) referente ao protocolo 10.	73
Figura 13: Representação gráfica das taxas de recuperação de ovos de <i>Ascaris suum</i> por centrífugo-flutuação seguida de flutuações sequenciais (%) referente ao protocolo 11.....	79
Figura 14: Formas parasitárias observados em amostras de areia provenientes do litoral Paranaense: Larva de nematódeo (A); Ovos da família Ancylostomatidae (B, C); Ovo de <i>Trichuris</i> sp em estágio embrionário. (D) sob o aumento de 400 X.	85

Figura 15: A orla da praia de Matinhos como peridomicílio (B) e a presença constante de animais nestes ambientes (A).....	88
Figura 16: Ovos encontrados nas fezes de animais: Ovos de <i>Toxocara</i> spp., (A, B); Ovos da família Ancylostomatidae (C, D); Ovos de <i>Trichuris</i> spp. (E, F) sob aumento de 400 X.....	89
Figura 17: Formas parasitárias detectadas em amostras de areia provenientes de Parques Públicos e CMEI de Curitiba: Ovo de <i>Ascaris</i> spp. (A, B); Ovo da família Ancylostomatidae (C); Ovo de <i>Trichuris</i> spp. aumento 100 X (D) sob o aumento de 400 X (A, B, C).	92
Figura 18: Gráfico do panorama geral da ocorrência de ovos de helmintos encontrados nas áreas públicas destinadas à recreação: 1, 2 e 3 (Praias do litoral Paranaense, Parques Públicos e CMEIs de Curitiba).	93
Figura 19: Ação de Educação em saúde para alunos da Educação Infantil: Explicação lúdica sobre doenças causadas por HTS (A, B); Atividade de lavagem correta das mãos (C); Alunos participando da atividade “Caça as Parasitoses”; (D) Orientação passada aos alunos sobre o risco de se infectar com ovos de helmintos nas caixas de areia (E); Finalização das atividades: recebimento de medalha “guardião das parasitoses”.....	95

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1: Delineamento experimental do estudo.	44
Fluxograma 2: Variáveis empregadas para padronização do protocolo de detecção de ovos de helmintos em diferentes matrizes arenosas.	49
Fluxograma 3: Variáveis empregadas para padronização do protocolo de detecção de ovos de helmintos em diferentes matrizes arenosa.....	50
Fluxograma 4: Etapas e variáveis empregadas para recuperação de ovos de HTS a partir de 32 protocolos analisados em areias de praias do Paraná contaminadas artificialmente.....	51
Fluxograma 5: Etapas e variáveis empregadas para recuperação de ovos de HTS a partir de 32 protocolos analisados em areias de parques e CMEI de Curitiba contaminadas artificialmente.....	52
Fluxograma 6: Eficiência de recuperação de cada protocolo.	53
Fluxograma 7: Metodologia padronizada para detecção de ovos de helmintos em areia de praia (área 1) a partir do protocolo 10 que apresentou a maior eficiência de recuperação de ovos em amostras de areia contaminadas artificialmente.....	72
Fluxograma 8: Método de centrifugo flutuação seguida de flutuação sequencial padronizado para detecção de ovos de helmintos em areia de áreas de recreação de centros urbanos (área 2 e 3).....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais diagnósticos de viajantes que retornaram aos seus países de origem com alguma enfermidade após visita ao Brasil durante o período compreendido entre 1997 a 2013.....	19
Tabela 2: Indicadores demográficos, socioeconômicos e sanitários dos municípios do Litoral Paranaense.....	21
Tabela 3: Laudo da análise granulométrica do solo das três áreas selecionadas para o estudo.	45
Tabela 4: Eficiência de recuperação (ER) de ovos de helmintos em areia de praia contaminada artificialmente (dose 1) mediante aplicação de 16 protocolos com a metodologia de flutuação em sacarose ($d = 1,24 \text{ g / cm}^3$).....	70
Tabela 5: Eficiência de recuperação (ER) de ovos de helmintos em areia de praia contaminada artificialmente (dose 2) mediante aplicação de 16 protocolos com a metodologia de flutuação em sacarose ($d = 1,24 \text{ g / cm}^3$).....	71
Tabela 6: Comparação da recuperação de ovos por cada flutuação sequencial de acordo com as doses utilizadas (D1 e D2) no protocolo 10.....	74
Tabela 7: Eficiência de recuperação (ER) de ovos de helmintos em solos arenosos de parques (área 2) contaminado artificialmente mediante aplicação de 16 protocolos com a metodologia de centrifugo-flutuação em sacarose ($d = 1,24 \text{ g / cm}^3$).....	76
Tabela 8: Eficiência de recuperação (ER) de ovos de helmintos em solo arenoso de CMEI (área 3) contaminado artificialmente mediante aplicação de 16 protocolos com a metodologia de centrifugo-flutuação em sacarose ($d = 1,24 \text{ g / cm}^3$).....	77
Tabela 9: Comparação da recuperação de ovos por cada flutuação sequencial de acordo com a matriz arenosa utilizada no protocolo 11.	80
Tabela 10: Ocorrência de ovos de helmintos em dois anos de monitoramento da contaminação de areias de praias do litoral paranaense.....	84
Tabela 11: Densidade média de indicadores microbiológicos em NMP / 100 g de contaminação fecal (<i>E. coli</i> e <i>Enterococcus</i>) em areias de praia do litoral paranaense.....	87
Tabela 12: Positividade das amostras de solo de parques públicos de Curitiba.....	90
Tabela 13: Positividade das amostras de solo CMEIs de Curitiba.	91

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Localidades do Brasil e de outros países em que se aferiu a contaminação por ovos de helmintos em praias destinadas a recreação humana*	27
Quadro 2: Ocorrência global de ovos de helmintos em solos arenosos destinados à recreação infantil.	32
Quadro 3: Estudos em que se aferiu a sensibilidade de detecção de ovos de helmintos para avaliação da contaminação de diferentes tipos de solo.....	36
Quadro 4: Características geográficas dos pontos de coleta de praias do Paraná eleitas para o monitoramento da qualidade sanitária do litoral durante dois anos..	55
Quadro 5: Características geográficas dos pontos de coleta dos Parques Públicos da cidade de Curitiba monitorados no presente estudo.	62
Quadro 6: Características geográficas dos pontos de coleta dos Centros Municipais de Educação Infantil de Curitiba	64

LISTA DE SIGLAS

CDC - Centro de Controle e Prevenção de Doenças

CEI – Centros de Educação Infantil

CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

CMEI – Centros Municipais de Educação Infantil

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

DALY - *Disability Adjusted Life Years*

DTN – Doenças Tropicais Negligenciadas

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

FEE - *Foundation for Environmental Education*

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

HTS – Helmintos Transmitidos pelo Solo

IAP – Instituto Ambiental do Paraná

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IDHM – Índice de Desenvolvimento Humano Municipal

ISO - *International Organization for Standardization*

LACEN – Laboratório Central do Estado do Paraná

LMC – Larva *Migrans* Cutânea

LMV – Larva *Migrans* Visceral

MUG - 4-metil umbeliferil- β -D-glicuronídeo

NMP – Número Mais Provável

ONU – Organização das Nações Unidas

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PIB – Produto Interno Bruto

PR – Paraná

SC – Santa Catarina

SEMA – Secretaria do Meio Ambiente

SESA – Secretaria da Saúde do Estado do Paraná

SIMEPAR – Sistema Meteorológico do Paraná

SMAC – Secretaria Municipal do Meio Ambiente

SNIS – Sistema Nacional de Informações sobre o Saneamento

SUS – Sistema Único de Saúde

UFPR – Universidade Federal do Paraná

UV – Radiação Ultravioleta

WASH - *Water, Sanitation and Hygiene*

WHO - *World Health Organization*

X – GLU - 5-bromo-4-cloro-3-indolyl- β -D-glucopiranosidase

LISTA DE SIMBOLOS

\leq - . Menor ou igual a

® - Marca registrada

$C_4H_8O_2$ - Ácido isobutírico

g – Grama

g / cm^3 - Grama por centímetro cúbico

g / kg^{-1} – Grama por quilograma

Km – Quilômetro

Km^2 - Quilômetro quadrado

M – Molar

m^2 - Metro quadrado

$MgSO_4$ – Sulfato de Magnésio

ml – Mililitro

mm – Milímetro

$NaNO_3$ – Nitrato de Sódio

° C – Graus Celsius

pH - potencial Hidrogeniônico

R\$ - Real

™ - *Trademark Symbol*

U\$ - Dólar

$ZnSO_4$ – Sulfato de Zinco

μl – Microlitro

μm – Micrometro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 Turismo em cidades litorâneas no Brasil e o saneamento ambiental.	16
2.1.1 Caracterização do litoral paranaense.....	20
2.2 Legislações que regem a balneabilidade do litoral brasileiro	22
2.3 Contaminação ambiental de praias do Brasil e do mundo por ovos de helmintos.	25
2.4 Ocorrência de ovos de helmintos em solos arenosos destinados à recreação infantil.....	31
2.5 Métodos de recuperação de ovos de helmintos em diferentes matrizes de solo arenoso.....	35
2.6 Helmintos Transmitidos pelo Solo	39
3. OBJETIVOS.....	43
3.1 Objetivo geral	43
3.2 Objetivos específicos	43
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	44
4.1 Delineamento do estudo.....	44
4.2 Etapa 1: Experimentos de contaminação artificial em diferentes matrizes arenosas	45
4.2.1 Análise granulométrica de cada tipo de solo.....	45
4.2.2 Esterilização das amostras de solo	46
4.2.3 Obtenção e preparo da suspensão de ovos de <i>Ascaris suum</i>	46
4.2.4 Protocolos empregados para determinar a eficiência de recuperação de ovos em areias de praias, parques e CMEI.....	48
4.3 Análise estatística	54
4.4 Etapa 2: Monitoramento da ocorrência natural de ovos de helmintos em solos de diferentes áreas de recreação do litoral e capital do Paraná.	55

4.4.1 Monitoramento de praias do estado – Área 1.....	55
4.4.2 Análise de amostras fecais	58
4.4.3 Análise microbiológica	59
4.4.4 Monitoramento de HTS em parques e caixas de areia de CMEI destinadas a recreação em Curitiba, Paraná– áreas 2 e 3.	61
4.4.5 Intervenção educativa em saúde escolar	67
5. RESULTADOS	68
5.1 Experimentos de contaminação artificial em diferentes matrizes arenosas.....	68
5.1.1 Avaliação da eficiência de recuperação de ovos de helmintos em areia de praia (área 1).	68
5.1.2 Avaliação da eficiência de recuperação de ovos de helmintos em areia de parques e caixas de areia de CMEI em Curitiba (áreas 2 e 3).	75
5.2 Ocorrência natural de ovos de helmintos em areias do litoral paranaense	82
5.3 Análise microbiológica das areias de praia do litoral do Paraná	86
5.4 Ocorrência de ovos de helmintos em amostras fecais coletadas nas praias do litoral do Paraná.	88
5.5 Contaminação ambiental de áreas de recreação infantil (área 2 - Parques Públicos e área 3 - CMEI)	90
5.6 Ações educativas em saúde para educação infantil – creche como ambiente de transmissão de parasitos.	94
6. DISCUSSÃO	96
6.1 Padronização de metodologias para detecção de ovos de helmintos em diferentes matrizes arenosas.	96
6.2 Monitoramento da qualidade sanitária do litoral paranaense	104
6.3 Ocorrência de ovos de helmintos em solos arenosos de áreas de recreação infantil	112
7. CONCLUSÕES	118
REFERÊNCIAS	120
APÊNDICES	141

Apêndice A - Ensaio de contaminação artificial para padronização do protocolo.	141
Apêndice B - Situações verificadas durante o monitoramento da ocorrência de ovos de helmintos no litoral do Paraná	143
Apêndice C - Monitoramento da ocorrência de ovos de helmintos em áreas de recreação– parques públicos e CMEI de Curitiba.	145
ANEXOS	147
Anexo A – Produtos derivados da Dissertação de Mestrado	147
Anexo B - Carta de efetivação de parceria entre a UFPR e o IAP.	148
Anexo C - Autorização para atuação nos CMEI que compõe a regional do Cajuru, Curitiba.	149

1. INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta uma extensa área costeira consistindo em uma das principais atrações turísticas do país. Em decorrência disso, recebe milhares de visitantes - nacionais e internacionais - especialmente na alta temporada que baseiam sua escolha de destino pela beleza das paisagens, clima tropical e qualidade ambiental / sanitária da área visitada (Leal et al., 2018; Instituto Trata Brasil, 2019).

Entretanto, o descarte inadequado do lixo, a drenagem hídrica de sedimentos carregados pela água da chuva para as praias, o saneamento incapaz de suprir a demanda do aumento populacional e a eliminação de dejetos dos animais que ali circulam, são os principais elos associados à contaminação das praias, representando um fator de risco para aquisição de doenças gastrointestinais, oftálmicas ou dermatológicas (Hotez et al., 2009; Pinto e Oliveira, 2011; Moore et al., 2013).

A população em idade pediátrica é mais propensa a desenvolver infecções veiculadas pelo contato com o solo contaminado devido ao comportamento ligado a fase oral, a geofagia, por frequentar caixas de areia contaminadas e praias, favorecendo a transmissão de patógenos veiculados por diferentes rotas: cutânea, inalação e ingestão de areia contaminada (Gurgel et al., 2005; Solo Gabriele et al., 2016).

Entre estes, destacam-se os Helmintos Transmitidos pelo Solo (HTS) causadores de agravos à saúde humana e, helmintoses de caráter zoonótico como larva *migrans* cutânea e visceral / ocular. Além disso, HTS de transmissão passiva ou de penetração ativa estão inseridos na lista de Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) pela Organização Mundial da Saúde (Hotez et al., 2007; Fialho et al., 2016)

Em virtude da estreita relação entre o ser humano e o ambiente, principalmente em atividades de recreação, e do papel na manutenção dos ciclos biológicos dos HTS

bem como de sua transmissibilidade, vários estudos ao redor do mundo buscaram determinar a contaminação por HTS em caixas de areia de parques públicos (Blaszowska et al., 2015; Otero et al., 2018), peridomicílio (Steinbaum et al., 2016), creches (Moskiva et al., 2016; Nkouayep et al., 2017) e praias (Rocha et al., 2011; Shah et al., 2011; Silva et al., 2017).

A variabilidade dos resultados evidenciados nestes estudos pode estar associada a diferentes concentrações de contaminação e / ou à diversidade de métodos analíticos disponíveis para a detecção de HTS em diferentes matrizes arenosas. Além disso, a não aferição da sensibilidade da técnica empregada para a sua detecção representa importante limitador da acurácia e estimativa fidedigna da contaminação ambiental (Smith, 1999).

O monitoramento de patógenos contaminantes do solo representa grande desafio, visto que inexistente uma metodologia devidamente padronizada (Collender et al., 2015; Amoah et al., 2017). Em adição, não há critérios oficiais estabelecidos por legislação que determinem padrões sanitários, principalmente em areia de praia, para classificações de qualidade (Brasil, 2000; Pinto et al., 2011; Sotero Martins, 2014).

Ressalta-se que dados acerca da epidemiologia ambiental de helmintoses intestinais - especialmente das praias de veraneio frequentadas pela população autóctone e turística do estado do Paraná - são inexistentes e, também se verifica a escassez destes dados em areias do litoral brasileiro, quando se compara a outras matrizes de solo arenoso. Desta forma, o monitoramento sistemático de praias e demais áreas arenosas, emerge como ferramenta importante para a sua gestão e, para o desenvolvimento de programas profiláticos para minimização e controle da poluição fecal, oriundos de ações antropogênicas e/ ou de caráter zoonótico.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Turismo em cidades litorâneas no Brasil e o saneamento ambiental.

O turismo de sol e praia inclui uma grande diversidade de atividades recreativas e prosperou amplamente em áreas costeiras. Aproximadamente 50% das viagens internacionais têm como destino cidades litorâneas e, em termos de economia, a indústria do turismo chega a representar 25% do PIB de alguns países costeiros em desenvolvimento (The Ocean Conference, 2017).

A área costeira brasileira apresenta 8.500 km de extensão sendo uma importante rota turística internacional. Dados disponibilizados pelo Ministério do Turismo (2018) indicam que o país recebeu 6,6 milhões de visitantes de outros países, sendo que 30% destes tiveram como destino cidades litorâneas.

Historicamente, as principais cidades brasileiras se desenvolveram no perímetro costeiro, e atualmente, cerca de 26,6% da população nacional concentra-se nestas áreas (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2010). Entretanto, sérios problemas de infraestrutura básica, principalmente no que diz respeito ao saneamento são recorrentes nestes locais. Este fato é observado em várias regiões costeiras do país e, na região Nordeste - importante polo turístico brasileiro - apenas 34,7% da população têm acesso ao tratamento de esgoto, sendo esta a região que concentra o maior número de municípios costeiros no país. O subinvestimento nesta área fez com que a região deixasse de faturar R\$ 2,6 bilhões para o setor de turismo (Instituto Trata Brasil, 2018).

De acordo com o estudo de Benefícios Econômicos da Expansão do Saneamento Básico conduzido pelo Instituto Trata Brasil (2018), as cidades turísticas costeiras obteriam maior lucro e gerariam mais empregos se houvesse condições favoráveis de saneamento. Além disso, as projeções de incremento de renda associadas

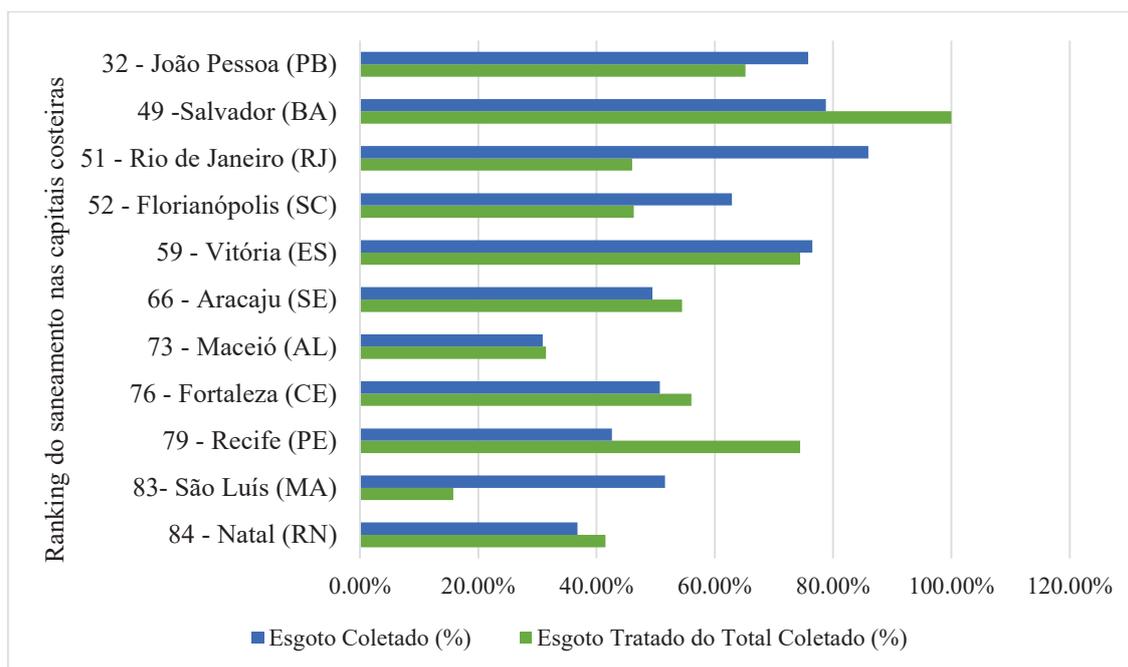
ao turismo no Brasil, atualmente em torno de R\$ 2,1 bilhões ao ano, atingiriam R\$ 42,8 bilhões no país até 2036 caso a universalização do saneamento fosse implantada nestas regiões.

Os índices de saneamento no Brasil têm melhorado nas últimas décadas, mas ainda permanece deficiente. Grande parte da população brasileira carece destes serviços, sobretudo a camada mais pobre (Ferreira et al., 2016). Os últimos dados concernentes ao saneamento ambiental indicam que 47% dos brasileiros não têm acesso à coleta de esgoto, isso significa que quase metade do esgoto produzido diariamente no país é descartado diretamente no ambiente, que inclui rios e outros cursos d'água que afluem para as áreas costeiras (SNIS, 2020).

O Ranking do Saneamento Básico (2020) produzido com base nos dados disponibilizados pelo Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS) – ano base 2018, mostra os piores e melhores índices de saneamento nos 100 maiores municípios do Brasil. Das 20 cidades mais bem posicionadas no referido *ranking*, apenas duas são litorâneas (Santos e Niterói). Em relação às capitais localizadas em áreas costeiras, o gerenciamento do esgoto ainda se mostra insuficiente. Apenas na capital da Bahia (Salvador) a quantidade total - 100% do esgoto coletado - é efetivamente tratado. Entretanto, em nenhuma delas há 100% de cobertura de coleta de esgoto (Figura 1).

A cobertura de serviços de saneamento é fundamental para promoção de saúde e proteção ambiental. A ausência de tratamento de esgoto está diretamente relacionada a incidências de doenças de transmissão fecal-oral (*sewage-borne pathogens*) conferindo altos custos aos cofres públicos todos os anos (Ferreira et al., 2016).

Figura 1: Indicadores de esgotamento sanitário nas capitais costeiras brasileiras: percentual de esgoto coletado (azul) e efetivamente tratado (verde).



Fonte: A autora (2019) (Adaptado SNIS, 2019).

A redução nas internações por doenças entéricas geraria uma considerável economia para o Sistema Único de Saúde (SUS), uma vez que a cada U\$ 1 investido em serviços de saneamento representa economia de U\$ 4,3 em assistência médica (World Toilet Organization, 2019). Neste contexto, as gastroenterites derivadas da exposição à contaminação fecal em áreas costeiras, acarretam em perdas de produtividade, uma vez que estas geram milhões de licenças médicas ao ano, além de ônus individual e econômico (Li e Zhang, 2019). O destino turístico está associado à incidência de doenças em viajantes, sendo que todos os anos, milhões de turistas que visitam regiões tropicais contraem a diarreia do viajante (Hitch, 2019).

Os riscos associados à aquisição de gastroenterites nestas regiões estão vinculados ao tempo de exposição à contaminação, a qualidade ambiental local e ao tipo de viagem, sendo maiores em crianças e viajantes imunossuprimidos, que tendem a ser

hospitalizados por infecções oportunistas, implicando em alterações nos planos de viagem ou ainda óbitos (Steffen, 2017; Langford, 2018; Wolyniec et al., 2018).

De acordo com Wilson et al., (2014), dentre os diagnósticos de doenças infecciosas e parasitárias em pacientes que regressaram ao seu país de origem após visitar o Brasil, prevalecem as doenças dermatológicas. Dentre elas, destaca-se Larva *Migrans* Cutânea (LMC) (Tabela 1), comumente observada em regiões litorâneas tropicais que apresentam precariedade em saneamento ambiental e presença constante de animais domésticos (Sow et al., 2017).

Tabela 1: Principais diagnósticos de viajantes que retornaram aos seus países de origem com alguma enfermidade após visita ao Brasil durante o período compreendido entre 1997 a 2013.

Diagnóstico ^a	Nº de casos	Frequência (%)
1. Síndromes dermatológicas	630	40
Larva <i>Migrans</i> Cutânea (LMC) – <i>Ancylostoma</i> sp.	167	27
Picada de Inseto ^b	99	16
Infecção da pele e tecidos moles ^c	92	15
Erupção cutânea, etiologia desconhecida (não febril)	43	7
Míiase	37	6
Tungíase	35	6
Infecção fúngica (micose superficial / cutânea)	26	4
Raiva, profilaxia pós-exposição	17	3
Leishmaniose cutânea	13	2
2. Síndromes diarreicas	395	25
Diarreia aguda, etiologia desconhecida ^d	146	37
Diarreia crônica desconhecida	70	18
Giardíase	37	9
Infecção por <i>Campylobacter</i>	14	4
3. Síndromes Febris	297	19
Doença Febril não especificada ^e	109	37
Dengue	92	31
Malária ^f	25	8
Infecção pelo vírus Epstein-Barr / Mononucleose	17	6
Doença semelhante a gripe	17	6

Nota: ^a Um ou mais diagnósticos são possíveis para cada viajante que retornou enfermo.

^b Inclui picada de inseto (incluindo ferrão).

^c Inclui infecção de pele e tecidos moles: infecção bacteriana secundária em lesão pré-existente; abscesso superficial da pele.

^d Inclui diarreia aguda (bacteriana); diarreia aguda não especificada; gastroenterite.

^e Inclui doença febril não especificada (< 3 semanas); síndrome viral (sem erupção cutânea).

^f Inclui *Plasmodium falciparum*; *Plasmodium vivax* (n = 20); espécies desconhecidas

Fonte: Modificado de Wilson et al. (2014).

Neste cenário de vulnerabilidade ambiental, o turismo sustentável se torna cada vez mais relevante. Tendo isso em vista a FEE (Foundation for Environmental Education) desenvolveu um projeto de gestão costeira denominado Bandeira Azul, que inclui 47 países. O projeto propõe um conjunto de critérios ambientais, sanitários e de infraestrutura básica os quais as praias participantes devem atender para receber um selo ecológico, aumentando assim a atratividade turística destes locais (Creo et al., 2011).

Além disso, a agenda de desenvolvimento sustentável lançada pela ONU (2015) prevê um plano de ação colaborativa com 17 objetivos a serem alcançados até 2030, os quais determinarão o curso global para promover a qualidade ambiental, saúde e bem-estar. Entre as metas a serem atingidas estão a universalização do acesso aos serviços de saneamento e a proteção de zonas costeiras.

2.1.1 Caracterização do litoral paranaense

A região litorânea paranaense possui uma superfície aproximada de 6.600 km², com uma planície que se estende desde o sopé da serra do mar até o oceano constituindo 91 km de extensão (SEMA, 2006). É composta por sete municípios (Tabela 2) marcados por infraestrutura sanitária e atividades econômicas peculiares, que atendem diferentes seguimentos de turismo. Embora possua uma pequena extensão, concentra uma diversidade de paisagens naturais e históricas, que incluem vilarejos, cachoeiras, serras, ferrovias e ilhas, atraindo número expressivo de visitantes no período de alta temporada (Secretaria do Turismo Paraná, 2015).

A costa do estado é caracterizada pela sazonalidade do turismo de sol e praia. Durante a alta temporada as cidades litorâneas recebem milhões de visitantes e, nos

demais períodos, prevalecem os turistas de segunda residência. A concentração de fluxos em curtos períodos acarreta em impactos negativos, uma vez que as cidades sofrem com o processo de readaptação social e econômica, exigindo planejamento contínuo e flexibilidade na gestão costeira, especialmente na alta temporada, acerca da infraestrutura de saneamento (Scheuer, 2011).

Tabela 2: Indicadores demográficos, socioeconômicos e sanitários dos municípios do Litoral Paranaense

Município	População ^{II}	Área da unidade territorial (km ²) ^{II}	Índice de coleta de esgoto (%)	Índice de tratamento de esgoto	IDHM ^I	Internações por diarreia (1 mil / hab) ^{II}
Guaratuba	37.067	1.326, 670	83,29 ^{III}	100 ^{III}	0,717	1,1
Matinhos	34.720	117,899	78,85 ^{III}	100 ^{III}	0,743	0,2
Paranaguá	154.936	826, 431	72,9 ^{II}	78,7 ^{III}	0,733	0,7
Antonina	18.980	882, 317	73,7 ^{II}	- ^{IV}	0,686	0,5
Morretes	16.406	684, 580	59,38 ^{III}	100 ^{III}	0,710	1,3
Guaraqueçaba	7.636	2.017,030	88,19 ^{III}	100 ^{III}	0,587	1,1
Pontal do Paraná	27.284	200,410	53,12 ^{III}	100 ^{III}	0,737	0,1

Nota: ^I IDHM: Índice de Desenvolvimento Humano Municipal. Fonte: ^{II}IBGE, 2010; ^{III} SNIS, 2020. ^{IV} Dados indisponíveis.

Nas últimas décadas, a ocupação contínua de municípios costeiros e balneários como Matinhos, Caiobá, Guaratuba e Pontal do Paraná acelerou a urbanização da orla, determinando a dinâmica demográfica local (fixa e sazonal). A aquisição de residências para fins de veraneio pela classe média do estado influenciou diretamente o planejamento da infraestrutura das cidades, atendendo a demanda imobiliária em detrimento das comunidades tradicionais e costeiras (Sampaio, 2006; Espinola, 2018).

Nos últimos anos, os serviços de saneamento do litoral tiveram melhorias na área urbana (orlas de Matinhos e Guaratuba) (Tabela 2) com índices de até 100 % de coleta de esgoto, acima da média nacional, que corresponde a 53 %. Nos outros

municípios litorâneos situados na área rural, os indicadores de saneamento atingem apenas 33,7% (IBGE, 2010; SNIS, 2018).

Ainda que os índices de saneamento tenham obtido melhoria nas áreas urbanas, é recorrente a liberação de efluentes no ambiente formando “línguas negras” ao longo da faixa de areia das praias. Em adição, nos períodos de maiores precipitações, há a ocorrência frequente de inundações decorrentes da deficiência estrutural em áreas vulneráveis, afetando a qualidade sanitária local (Rocha et al., 2011; Esteves, 2015).

2.2 Legislações que regem a balneabilidade do litoral brasileiro

A estimativa da enumeração da concentração de bactérias indicadoras de contaminação fecal determina as condições de banho em praias, ou seja, se estão próprias ou impróprias para atividades como natação e mergulho, conhecido também como balneabilidade. Em virtude da facilidade de execução da metodologia e por apresentar baixo custo, a densidade de bactérias indicadoras de contaminação fecal é o parâmetro microbiológico mais amplamente utilizado pelo Brasil e diversos países do mundo para estimar a qualidade das águas de recreação por agências ambientais (Brasil, 2000; Pinto e Oliveira, 2011).

A qualidade sanitária das praias brasileiras é avaliada por programas de monitoramento desenvolvidos em conjunto com vários órgãos estaduais, seguindo a resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº 274 / 2000, que recomenda a adoção de avaliações regulares da qualidade ambiental das águas destinadas à recreação por meio de parâmetros padronizados. A partir da análise microbiológica de cinco amostras consecutivas a água pode ser enquadrada como própria (excelente, muito boa e satisfatória) ou imprópria para recreação de contato

primário. Esta deve ser considerada imprópria quando o valor obtido for superior ao limite proposto de 1000 NMP / 100 mL coliformes termotolerantes, 800 NMP / 100 mL para *Escherichia coli* ou 100 NMP / 100 mL para Enterococos (Brasil 2000).

Escherichia coli é uma bactéria Gram-negativa utilizada globalmente como parâmetro indicador de balneabilidade, sendo abundante e exclusiva da microbiota de animais de sangue quente (homeotérmicos). Sua ocorrência em ambientes aquáticos pode indicar contaminação fecal recente, reforçando que a água esteve sujeita a efluentes domésticos ou fezes de animais silvestres, domésticos ou pássaros (Odonkor e Ampofo, 2013; Alm et al., 2018). Além disso, a presença dessa bactéria pode representar riscos à saúde humana, uma vez que possui cepas patogênicas como, por exemplo, *E. coli* O 157:H7 capaz de produzir toxinas responsáveis por enterites hemorrágicas (Wang et al., 2011; Talukdar et al., 2013).

Enterococos é um grupo de bactérias típicas do trato intestinal de animais vertebrados, especialmente mamíferos. A grande maioria das espécies são comensais, entretanto, algumas delas já foram descritas como patogênicas para seres humanos (Moellering, 1992; Staley et al., 2014). Apresentam ampla resistência a intempéries ambientais, sendo capazes de crescer em grandes amplitudes de temperaturas (10 a 45 ° C), concentrações de salinidade de até 6,5% e, pH 9,6. Desta maneira, é considerado um dos indicadores mais apropriados, principalmente para aferição de qualidade sanitária de águas salinas e salobras (WHO, 2003).

As políticas de gestão costeiras bem como as legislações encontram-se desatualizadas em relação à avaliação dos riscos associados à recreação de contato primário em praias, especialmente a qualidade sanitária de areias no Brasil.

A Secretaria Municipal do Meio Ambiente do Rio de Janeiro, por meio da Resolução SMAC nº 468 de 28 de janeiro de 2010, estabeleceu a avaliação da condição

das areias de praias do Estado a partir de análises parasitológicas e microbiológicas. Os limites máximos propostos para classificação de indicadores microbiológicos sugerem que em concentrações superiores de coliformes totais a 30.000 NMP / 100g e 3.800 NMP / 100 g de *E. coli* não é recomendado o contato primário com areia, especialmente por crianças e idosos (SMAC, 2010).

O Estado de São Paulo também estabeleceu uma legislação concernente a esse aspecto, Lei Estadual nº 14.366/2011 e outorga a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) o monitoramento das areias das praias do litoral paulista.

No Paraná, também no ano de 2011, foi instituído o programa de limpeza e emissão de boletins da qualidade da areia do litoral, pelo Instituto das Águas do Paraná da Secretaria Estadual do Meio Ambiente. O programa realiza a análise microbiológica de areias somente durante a alta temporada, mediante o uso de máquinas que revolvem a parte superficial da areia para maior exposição das bactérias à luz solar.

A Organização Mundial da Saúde (OMS, 2003), indica a areia como uma importante ferramenta de gestão da orla e recomenda a realização de avaliações que permitam compreender a evolução da qualidade das areias das praias, reconhecendo assim seu papel em relação à saúde pública. O CONAMA recomenda aos órgãos ambientais a avaliação da qualidade parasitológica e microbiológica da areia de praias para futuras padronizações de acordo com a Resolução nº 274 / 2000 - artigo 8º(Brasil, 2000).

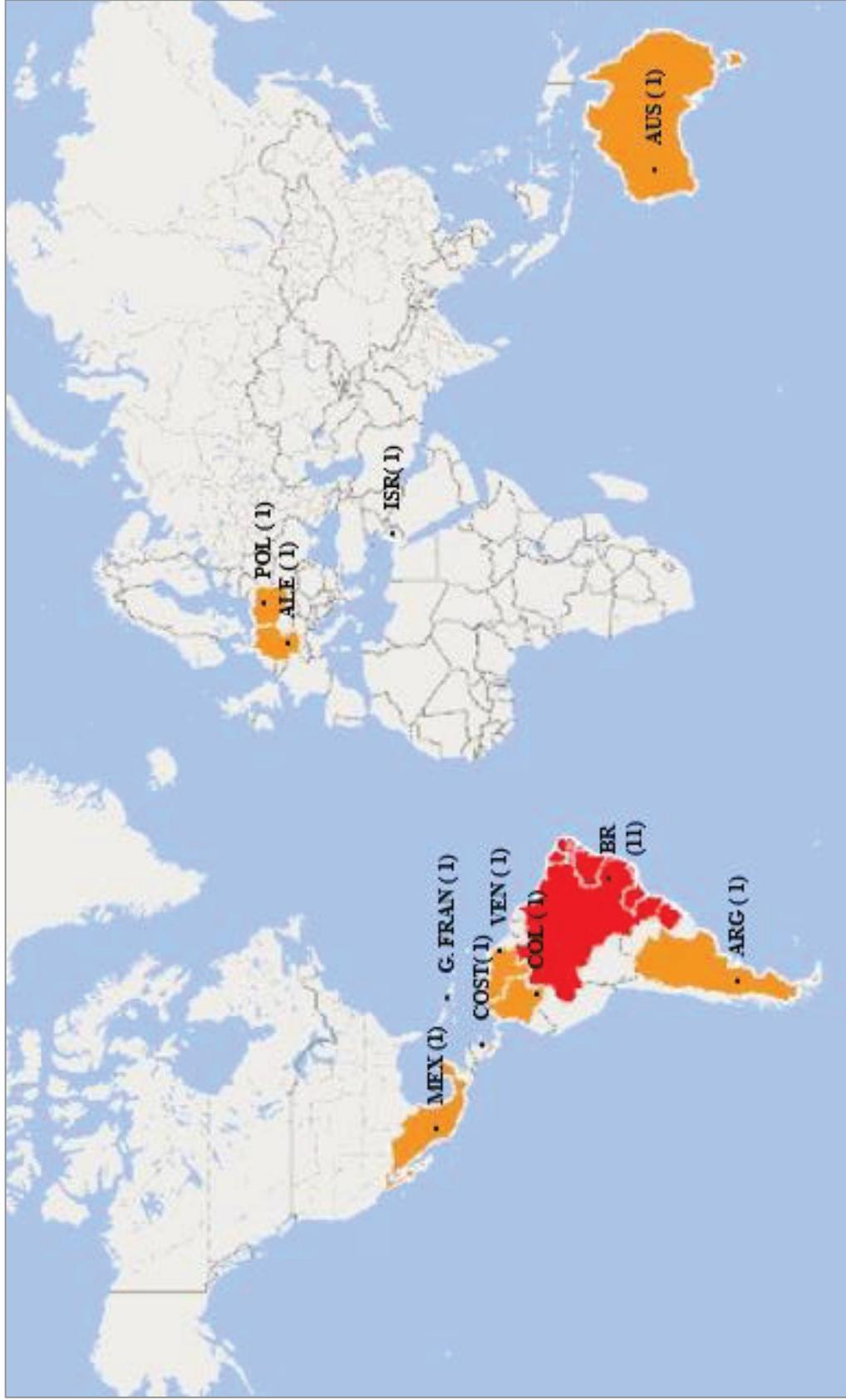
2.3 Contaminação ambiental de praias do Brasil e do mundo por ovos de helmintos.

Residir em áreas costeiras, o ato de brincar em solos contaminados e o turismo costeiro em regiões tropicais endêmicas representam alguns fatores de risco associados à aquisição de HTS. Estudos demonstraram correlação entre os fatores supracitados e a soroprevalência aumentada, por exemplo, para *Toxocara* spp., e a infecção por ancilostomatídeos especialmente em crianças e mulheres grávidas (Manini et al., 2012; Santos et al., 2015; Sow et al., 2017).

A frequência da contaminação de areias está relacionada às características inerentes a estes parasitos como: a produção elevada de ovos pelas fêmeas (por exemplo, *Ascaris lumbricoides* elimina até 200.000 ovos / dia no ambiente) para perpetuação da espécie; a determinantes que se relacionam com a epidemiologia ambiental dos Helmintos Transmitidos pelo Solo, como a elevada resistência a intempéries e fatores abióticos (característica robusta dos ovos e longevidade no meio externo, resistência à dessecação, variações de temperaturas, e exposição constante à radiação solar) conferindo a manutenção da viabilidade / infectividade dos ovos (Pecson et al., 2007; Bogitsh et al., 2013).

No entanto, a pesquisa de ovos de helmintos nestes locais raramente é realizada sendo pouco conhecido o perfil parasitário das areias de praias (Rocha et al., 2011; Manjarrez-Paba et al., 2017). O Brasil lidera o número de relatos de contaminação por ovos de HTS em áreas costeiras em nível mundial (Figura 2). Nos demais países, observa-se inexistência ou escassez de dados acerca da epidemiologia ambiental de HTS, se limitando há apenas um relato por localidade, sendo desta forma, desconhecido o real risco associado à saúde pública (Quadro 1).

Figura 2: Distribuição global e número de pesquisas que determinaram a ocorrência de ovos de helmintos em areia de praias*



Nota: * Artigos selecionados das bases de dados de periódicos científicos: *Scopus*, *Pubmed*, *Science Direct* e *Google Scholar*, utilizando os seguintes descritores: “*Beach Sand*”, “*Helminths*”, “*Soil Transmitted Helminths*”, “*Ascaris*”, “*Trichuris*”, “*Hookworm*”, “*Toxocara*” combinados ao operador AND; Fonte: A autora, 2019.

Quadro 1: Localidades do Brasil e de outros países em que se aferiu a contaminação por ovos de helmintos em praias destinadas a recreação humana* .

Local	Metodologia Empregada	Helminto (s) detectado (os)	Referência
Santos (SP)	Centrífugo-flutuação em sulfato de zinco e sedimentação espontânea (Pessoa, 1982).	<i>Ascaris lumbricoides</i> , <i>Trichuris trichiura</i> , <i>Hymenolepis nana</i> , <i>Enterobius vermicularis</i> e <i>Diphyllobothrium latum</i> .	Sanchez et al., 1986
Salvador (BA)	Centrífugo-flutuação (Dada, 1979) Baermann Moraes mod. De Carli, 2001.	Larvas e ovos de <i>Ancylostoma</i> spp.	Santos et al., 2006
Ipanema (RS)	Centrífugo-flutuação em sulfato de zinco (Faust et al., 1938 mod. Kazacos, 1983).	<i>Ascaris</i> spp, <i>Toxocara</i> spp e Ancilostomatídeo - <i>like</i> .	Matesco et al., 2006
Salvador (BA)	Técnica do Tubo Cônico de Centrífuga (Ueno & Gonçalves 1998)	Larvas de ancilostomatídeos.	Hohlenwerger et al., 2011
Santos (SP)	Rugai mod. Matos Brizolla / (Hoffman, 1934) e (Faust, 1938)	Larvas: <i>Ancylostoma</i> spp. e <i>Strongyloides</i> sp. Ovos: <i>Toxocara</i> spp., Ancylostomatidae <i>Trichostrongylus</i> sp. <i>Ascaris</i> spp.	Rocha et al., 2011
Vitória (ES)	Sedimentação espontânea (Hoffman, 1934) e Método Baerman Moraes, 1917	<i>Ancylostoma</i> sp. <i>Toxocara</i> spp.	Silva et al., 2013
João Pessoa (PB)	Sedimentação espontânea mod. Duwel, 1984. Faust, 1938; Rugai mod. Carvalho et al., 2005	Ascarídeo, Tenídeos, Ancilostomatídeos <i>Strongyloides</i>	Sousa et al., 2014

BRASIL

Corrientes (Argentina)	Centrifugo-sedimentação e Método de Willis	<i>Ancylostoma</i> spp; <i>Toxocara canis</i>	Milano et al., 2002
Costa Rica	Flutuação em sacarose.	Ovos de ancilostomatídeos e ascarídeos	Paquet -Durand et al., 2007
Elota (México)	Sedimentação espontânea.	<i>Ancylostoma</i> spp.	Robles et al., 2010**
Gaza (Israel)	Sedimentação espontânea (Colli et al., 2010)	<i>Ascaris</i> spp., <i>Strongyloides</i> spp., <i>Enterobius</i> sp., <i>Entamoeba histolytica</i> , <i>Taenia</i> spp.	Hilles et al., 2013
Puerto Cabello (Venezuela)	Sedimentação espontânea, técnica de Willis e Rugai mod. Guerrero et al., 2014.	<i>Strongyloides</i> sp. Larvas rabditoídes e filarióides <i>Ancylostoma</i> spp. <i>Toxocara</i> spp.	Guerrero de Abreu et al., 2017
Cartagena (Colômbia)	Técnica de Sloss Sheather, (1999)	<i>Ancylostoma</i> spp. <i>Strongyloides Toxocara</i> spp.	Manjarrez-Paba et al., 2018
Zwierzyniec (Polónia)***	Flutuação em NaNO ₃ (Quin et al., 1980)	<i>Toxocara</i> spp., <i>Ancylostoma</i> spp. <i>Trichuris</i> spp.	Bojar e Kłapeć, 2018

Nota: * Artigos selecionados das bases de dados de periódicos científicos: *Scopus*, *Pubmed*, *Science Direct* e *Google Scholar*, utilizando os seguintes descritores: “*Beach Sand*”, “*Helminths*”, “*Soil Transmitted Helminths*”, “*Ascaris*”, “*Trichuris*”, “*Hookworm*”, “*Toxocara*” combinados ao operador AND; ** Texto incompleto (resumo); *** Praia artificial.

Dentre os estudos que foram capazes de demonstrar a contaminação das areias de praias, altas concentrações de HTS foram evidenciadas, especialmente em praias brasileiras, onde as taxas de contaminação variaram de 12,9% até expressivos 83% de positividade (Sanchez et al., 1986; Neto et al., 2017). As formas parasitárias mais comumente encontradas mundialmente são: larvas de *Ancylostoma* spp., ovos de *Ascaris* spp. e *Toxocara* spp. (Quadro 1).

Os estudos supracitados apresentaram abordagens diferentes: relação entre ocorrência de HTS e sazonalidade, distribuição entre areia úmida e seca e, associação com contaminação fecal (Matesco et al., 2006; Amaral et al., 2015). Sendo assim, demonstram o papel da areia de praia como um elemento passivo na contaminação ambiental, onde se acumulam um grande número de patógenos.

Entre os métodos utilizados para a detecção de helmintos em amostras ambientais (solos de praias) prevalecem aqueles oriundos de adaptações de técnicas empregadas na rotina clínica, que apresentam eficácia limitada e não são próprios para este tipo de matriz, uma vez que não demonstram o real grau de contaminação (Amoah et al., 2017) (Quadro 1).

No caso do Brasil, - líder dos relatos no mundo – ainda se observa escassez ou inexistência de dados em algumas regiões costeiras, como por exemplo, o litoral Paranaense, objeto do presente estudo. Além disso, a documentação de novos relatos bem como a ampliação destes em demais áreas costeiras do país, contribuirá para o embasamento acerca da inclusão do monitoramento de parasitos como indicadores de qualidade ambiental, como reivindicado pela Resolução CONAMA 274 / artigo 8º (Brasil, 2000).

2.4 Ocorrência de ovos de helmintos em solos arenosos destinados à recreação infantil.

As atividades lúdicas desenvolvidas em caixas de areia promovem impactos positivos sobre o desenvolvimento físico e intelectual, especialmente na primeira infância. Em função disso, são amplamente incluídas na rotina de muitos centros de educação infantil, no entanto, esses ambientes têm sido relatados como importantes veículos de exposição humana a uma ampla gama de patógenos (Gyorkos et al., 1994; Gurgel et al., 2005).

Diferentes surtos de enfermidades cutâneas veiculadas pelo contato com solo contaminado (*Soil-borne diseases*) foram associados ao ato de brincar em caixas de areia, entre eles destacam-se os de Larva *Migrans* Cutânea (LMC) em crianças que frequentaram a caixa de areia de uma creche em Minas Gerais e um parque público em São Paulo (Araújo et al., 2000; Santárem et al., 2004). Tendo isso em vista, a contaminação de áreas recreacionais merece atenção especial, visto que essa representa uma das principais formas de disseminação de patógenos e ingestão de ovos embrionados pela rota fecal-oral (Isaac et al., 2019).

Esses ambientes desempenham um papel crucial na perpetuação desse tipo de infecção em crianças em idade escolar, que estão mais propensas a desenvolver episódios de diarreia podendo ter o desenvolvimento físico e cognitivo comprometido (Shivoga e Moturi, 2009; Darlan et al., 2019). Devido a estes ambientes serem continuamente utilizados em atividades de recreação, vários estudos ao redor do mundo tiveram como meta verificar a ocorrência de ovos de helmintos em diversos tipos de solo de áreas urbanas ou rurais em caixas de areia de parques públicos e de creches ou Centros Municipais de Educação Infantil (CMEI) (Quadro 2).

Quadro 2: Ocorrência global de ovos de helmintos em solos arenosos destinados à recreação infantil.

Local	Área de recreação	Metodologia empregada	Helminto (s) detectado (os)	Referência
Baltimore (EUA)	Quintais e jardins residenciais.	Flutuação em sulfato de zinco (ZnSO ₄) (Quinn et al 1980).	<i>Toxocara</i> spp.	Childs, 1985.
Quebec (Canadá)	Creches	Flutuação em sulfato de zinco (ZnSO ₄) e Acetato de Etila C ₄ H ₈ O ₂ .	<i>Toxocara</i> spp.	Gyorkos et al., 1994
Lima (Peru)	Locais Públicos	Flutuação em NaCl.	<i>Toxocara</i> spp.	Lescano et al., 1998
Melbourne (Austrália)	Parques	Flutuação modificada com sulfato de magnésio (MgSO ₄)	<i>Toxocara</i> spp.	Carden et al., 2003
Fernandópolis (Brasil)	Praças e Escolas	Método de Rugai adaptado, Willis, (1921).	<i>Toxocara</i> spp., <i>Trichuris</i> spp e ancilostomatídeos.	Casseno et al., 2011
Tóquio (Japão)	Caixas de Areia	Flutuação em sacarose seguida de PCR	<i>Toxocara</i> spp.	Macuhova et al., 2013

Continua.

Lodz (Polónia)	Escolas, Parques Públicos	Método de flutuação com solução saturada de nitrato de sódio (NaNO ₃).	<i>Toxocara</i> spp., <i>Trichuris</i> spp., <i>Ascaris</i> spp., <i>Ancylostoma</i> spp., <i>Cystoisospora</i> spp.	Blaszkowska et al., 2013
Chennai (India)	Parques Públicos	Método Flutuação em Nitrato de sódio (NaNO ₃). (Dunsmore et al., 1984, adapt. por Mandarin Pereira et a., 2010).	<i>Toxocara</i> spp.	Thomas e Jeyathilakan, 2014
Flandres (Belgica)	<i>Playgrounds</i> e jardins de infância	Flutuação em sacarose	<i>Toxocara</i> spp.	Vanhee et al., 2015
Hanover (Alemanha)	<i>Playgrounds</i>	Centrifugo Flutuação (Kleine et al., 2016)	<i>Toxocara</i> spp.	Kleine et al., 2017
Dschang (Camarões)	Escolas	Centrifugo-flutuação em sacarose.	<i>Ascaris</i> spp., <i>Trichuris</i> spp., <i>Capillaria</i> spp., <i>Cooperia</i> spp e ancilostomatídeos.	Nkouayep et al., 2017
Lisboa, (Portugal)	Parques públicos e <i>playgrounds</i>	Técnica de centrifugação modificada e sedimentação.	<i>Toxocara</i> spp.	Otero et al., 2018

Em áreas urbanas, esses ambientes constituem locais de intensa circulação de cães, gatos e animais selvagens, sendo estes, reservatórios de doenças zoonóticas especialmente as helmintoses intestinais (Szwabe e Blaszkowska, 2017; Simonato et al., 2019). Os ovos de helmintos eliminados através das fezes dos animais completam o embrionamento no ambiente e, podem ser transmitidos diretamente ao ser humano mediante ingestão via fecal oral, ou ainda, no caso das larvas, através da penetração ativa (Jourdan et al., 2018).

Em um estudo de revisão conduzido por Fakhri et al., (2018) acerca da contaminação e distribuição de *Toxocara* spp. em áreas de recreação em nível mundial, observou-se que as taxas de contaminação nestes locais eram maiores conforme o aumento da longitude geográfica. Além disso, o estudo revelou uma prevalência global de 20%, sendo que o Brasil aparece na segunda posição entre os principais países que realizam esta análise epidemiológica e ambiental.

Sendo assim, a contaminação ambiental de solos por ovos de helmintos - fator de risco para aquisição de diferentes doenças parasitárias - exige medidas eficazes de controle para reduzir a ocorrência de infecções em animais e seres humanos (Otero et al., 2018).

2.5 Métodos de recuperação de ovos de helmintos em diferentes matrizes de solo arenoso.

O panorama global de contaminação ambiental de solos por parasitos em áreas destinadas à recreação indica uma grande variedade de resultados, dificultando a comparação e tornando-a complexa devido a aspectos inerentes a cada pesquisa, como metodologia adotada, variáveis epidemiológicas e ambientais do local de estudo (Otero et al., 2018; Fakhri et al., 2018).

Desta forma, detectar e quantificar ovos de helmintos em amostras ambientais representa um grande desafio: mundialmente vários métodos empregados para a recuperação de ovos a partir de amostras de solo foram descritos, no entanto, não existe um método padrão ou ISO validado para essa detecção e, a sensibilidade do método empregado frequentemente não é avaliada (Quadro 3) (Collender et al., 2015; Cranston et al., 2016).

A detecção ambiental de ovos de HTS em solos requer métodos que apresentem boa sensibilidade de detecção e que apresentem baixo custo, visando sua aplicabilidade especialmente para países em desenvolvimento, cujas taxas de prevalência de helmintoses são tipicamente maiores, devido à carência de saneamento ambiental e também por serem áreas endêmicas (Smith, 1999; Amoah et al., 2017).

Os métodos adequados para tal detecção envolvem etapas chaves que são determinantes para o isolamento e concentração de formas parasitárias em amostras de solo: homogeneização, dissociação química, filtração, sedimentação e flutuação (Smith, 1999; Collender et al., 2015; Amoah et al., 2017).

Quadro 3: Estudos em que se aferiu a sensibilidade de detecção de ovos de helmintos para avaliação da contaminação de diferentes tipos de solo.

Tipo de solo	Organismo modelo	Método	Sol. de Dissociação	Sol. Flutuação / Densidade	Eficiência de Recuperação	Referência
Argiloso	<i>Toxocara canis</i>	Flutuação	Água destilada ou hidróxido de sódio.	Sulfato de Zinco (1,20)	67,5%	Dada, 1979
NE	<i>Toxocara canis</i>	Flutuação	Tween 80	Sulfato de Magnésio (1,27)	82%	Quinn et al., 1980
Areia	<i>Ascaris</i> sp., <i>Trichuris</i> sp., <i>Toxocara</i> spp., <i>Ancylostoma</i> spp.	Flutuação	Detergente de uso doméstico	Carbonato de sódio (1,35)	80%	Silva et al., 1991
Areia	<i>Toxocara canis</i>	Centrífugo Flutuação	Hidróxido de sódio	Dicromato de sódio (1,35)	62,5%	Nunes et al., 1994
Arenoso					38%	
Lodo					13,9%	
Argiloso					7,5%	
Arenoso	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Flutuação	Alvejante (20%)	Nitrato de sódio (1,30)	24,3%	Ajala e Asaolu, 1995
Argiloso					25%	
Argila					15,3%	

Continua

NE	<i>Toxocara canis</i>	Centrifugo flutuação	-	Sulfato de magnésio (1,28)	64,9%	Zemner et al., 2002
	<i>Trichuris ovis</i>					
	<i>Heterakis gallinarum</i>					
	<i>Eimeria mulardi</i>					
NE	<i>Toxocara</i>	Flutuação	Detergente aniônico ácido - Quix® (pH 4,6)	Sulfato de Zinco (1,38)	50,9%	Sievers et al., 2007
NE	-	Centrifugo flutuação	Tween 80	Sacarose (1,20)	-	Horiuchi et al., 2016
11 tipos de solo	<i>Ascaris suum</i>	Centrifugo Flutuação	Água destilada	Sulfato de Zinco (1,20)	28,2%*	Cranston et al., 2016

NE = não estabelecido * Taxa média de recuperação do método quando aplicado nos 11 tipos de solo avaliados.

A etapa de homogeneização permite que os ovos sejam encontrados de maneira proporcional na amostra em processamento, sendo esta aprimorada quando se incorpora a solução de dissociação, que incluem os detergentes aniônicos - agem sobre a estrutura da parede dos ovos – desagregando-os das partículas que serão concentradas para posterior recuperação (Oge e Oge, 2000; Bowman et al., 2003). Da mesma forma, as etapas de sedimentação e flutuação são cruciais para a concentração e o isolamento de ovos, sendo a eficiência de recuperação otimizada com o uso de centrífuga, dependendo do tipo e composição do solo analisado.

O monitoramento ambiental de areias de praia é um campo a ser explorado: poucos estudos verificaram a ocorrência de ovos de helmintos nestes locais, sendo rara a padronização de metodologia para esse tipo de solo (Quadro 3) (Dunsmore et al., 1984; Silva et al., 1991). Em contrapartida, o conhecimento acerca da epidemiologia ambiental de helmintoses em áreas públicas como parques e creches é mais difundido, visto que mais estudos foram conduzidos em escala mundial, inclusive estimando a eficiência de recuperação do método adotado (Quadro 3).

Além disso, é relevante questionar a utilização de métodos adaptados da rotina clínica para a detecção de ovos de helmintos em amostras ambientais complexas como diferentes tipos e texturas de solos, sujeitos a uma ampla variedade de contaminantes e, a ausência de etapa de eluição empregando solução extratora de ovos quando comparado à detecção dos mesmos em amostras clínicas (fezes).

2.6 Helmintos Transmitidos pelo Solo

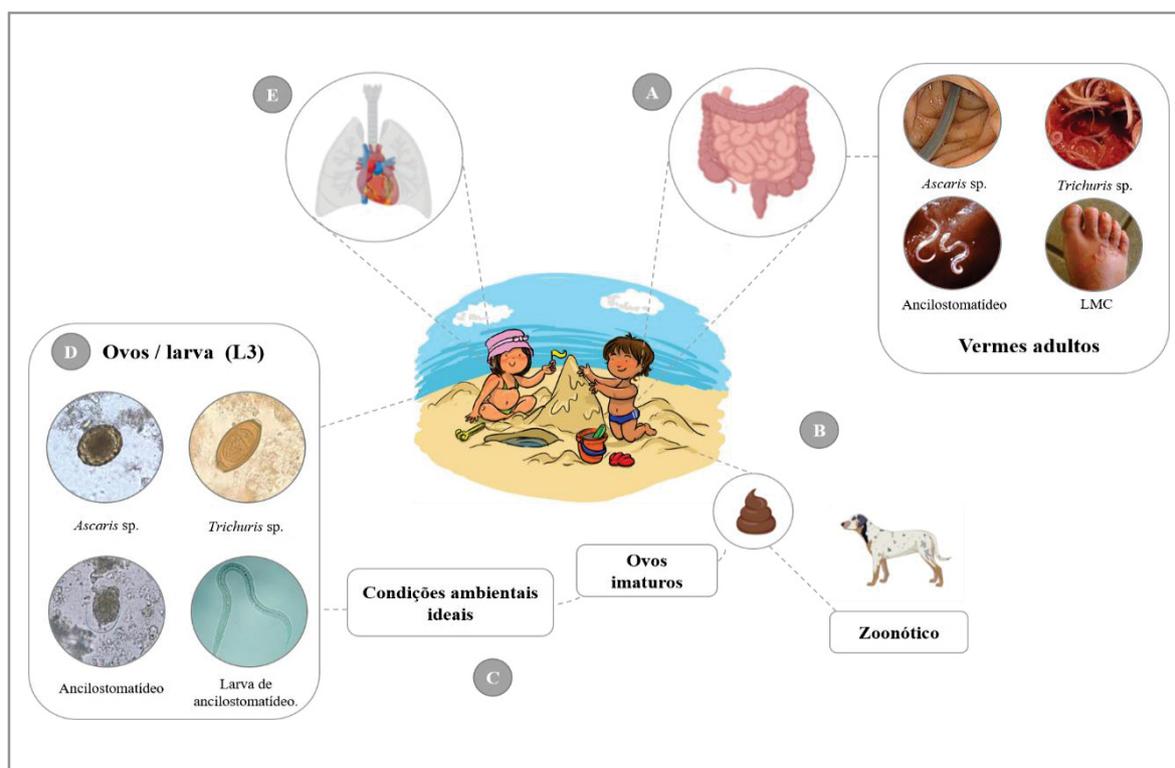
Os Helmintos Transmitidos pelo Solo (HTS) compõe um grupo de nematóides intestinais que inclui espécies parasitas de seres humanos: *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Strongyloides stercoralis* e ancilostomatídeos (*Necator americanus*, *Ancylostoma duodenale* e *Ancylostoma ceylanicum*) e, helmintoses de caráter zoonótico como larva *migrans* cutânea (*Ancylostoma caninum*, *Ancylostoma braziliense*) e larva *migrans* visceral / ocular tendo como agentes etiológicos *Toxocara canis* e *Toxocara cati* (Hotez et al., 2007; Fialho et al., 2016).

São responsáveis por uma carga significativa de morbimortalidade em quase ¼ da população humana - aproximadamente 1.45 bilhão de pessoas estão infectadas (Pullan et al., 2014). Estes parasitos ocasionam anualmente 135 mil óbitos, sendo a morbidade associada a estas infecções elevada - 1,9 milhão de perda de anos de vida ajustados por incapacidade (*Disability Adjusted Life Years* - DALY) (Ojha et al., 2014; Mokdad et al., 2019; Kim et al., 2019).

As infecções por HTS são endêmicas em pelo menos 120 países, sendo mais prevalentes em regiões tropicais e subtropicais em desenvolvimento (Pullan et al., 2014). A ausência de saneamento ambiental, higiene pessoal e condições socioeconômicas são determinantes para a disseminação e maior risco de aquisição dessas doenças (Darlan et al., 2019). Diante disso, estão incluídas na lista das Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) da Organização Mundial da Saúde, que impactam desproporcionalmente a população mais pobre do mundo (Hotez et al., 2007; Hotez et al., 2020).

As condições ambientais (temperatura, umidade e pH) são cruciais para sobrevivência e transmissão do estágio infeccioso (ovo / larva) e progressão do ciclo de vida desses parasitos (Brooker et al., 2006; Jourdan et al., 2018) (Figura 3). Dessa forma, esses aspectos devem ser considerados em inquéritos epidemiológicos, bem como o comportamento humano e aspectos socioeconômicos na dinâmica das transmissões parasitárias, uma vez que são determinantes na distribuição, prevalência e intensidade de infecção (Weaver et al., 2010; Videnova, 2019).

Figura 3: Ciclo de vida dos Helmintos Transmitidos pelo Solo (HTS).



Fonte: A autora (2020) – Imagens – Ovos e Larva – CDC, 2020; vermes adultos – Jourdan et al., 2018.

Nota: (A) Vermes adultos residem no intestino do hospedeiro, onde as fêmeas realizam a oviposição; (B) Cerca de 3.000 a 200.000 ovos imaturos são eliminados diariamente através das fezes dependendo da espécie do parasito; (C) para o embrionamento desses ovos são necessárias condições ideais de temperatura e umidade: as larvas de *Ascaris* sp. e *Trichuris* sp. realizam mudas dentro do ovo, mas não eclodem evoluindo até L3, enquanto em ancilostomatídeos eclodem e amadurecem até larvas (L3) e penetram a pele humana; (D) Ao serem ingeridas, as larvas L3 presentes nos ovos férteis, eclodem no intestino delgado: larvas de *Trichuris* seguem para o intestino grosso realizando mudas durante o trajeto, onde se diferenciam em vermes adultos se fixando à mucosa intestinal, enquanto as larvas de *Ascaris* sp. *Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus* realizam o ciclo de Looss podendo retornar para o intestino delgado onde se tornam adultos (E).

Muitas vezes as infecções por helmintos são assintomáticas e causam maior taxa de morbidade do que mortalidade (Brooker, 2010). A intensidade da patogenia está associada à imunidade, ao estado nutricional e a carga parasitária que o indivíduo alberga, sendo que as manifestações clínicas são dependentes da fase do ciclo de vida em que o helminto em questão se encontra: migração das fases larvais e o parasitismo do trato gastrointestinal por vermes adultos (Bethony et al., 2006; Jourdan et al., 2018).

As infecções de intensidade moderada a alta acarretam em transtornos nutricionais: anemia, desnutrição e redução na absorção de nutrientes, além de inflamação crônica, obstrução intestinal e gastroenterite (Jourdan et al., 2018; Bundy et al., 2020), comprometendo o desenvolvimento infantil devido ao déficit físico e cognitivo e, o desempenho e produtividade de indivíduos parasitados (Gall et al., 2017; Pabalan et al., 2018).

As alterações imunológicas decorrentes do parasitismo por helmintos intestinais influenciam na suscetibilidade a outros patógenos negligenciados que se sobrepõe em regiões endêmicas (Mabbott, 2018). A coinfeção entre helmintos e outros patógenos gera ônus para o hospedeiro, uma vez que o quadro clínico do indivíduo parasitado se torna exacerbado, agravando importantes doenças como malária, HIV e tuberculose (Fincham et al., 2003; Terefe et al., 2019). Este fato também é evidenciado em mulheres grávidas com anemia severa devido à coinfeção por *Plasmodium* spp. e ancilostomatídeos, que pode ser reduzida com o tratamento quimioterápico materno após o primeiro trimestre de gestação (Ojurongbe et al., 2018; Babamale et al., 2018).

A Organização Mundial da Saúde atua em programas globais de intervenção para acelerar a prevenção, controle e erradicação de HTS, sendo a principal estratégia adotada a quimioterapia preventiva em larga escala, conhecida também por tratamento em massa contra parasitoses intestinais (OMS, 2012). Mundialmente, cerca de 882

milhões de crianças em idade escolar vivem em regiões endêmicas, desta forma o plano estratégico da organização pretende tratar com quimioterapia pelo menos 75% deste grupo de risco até 2020 (Plano Estratégico de helmintíases transmitidas pelo solo 2011 – 2020; Freeman et al., 2019).

Embora as estimativas globais indiquem um declínio gradual nas prevalências de HTS e o uso de medicamentos seja promissor, as diretrizes de desparasitização por si só não têm sido suficientes para a eliminação dessas doenças parasitárias (Becker et al., 2018; Oliveira et al., 2020). A principal limitação dos programas de erradicação é o efeito temporário do controle, uma vez que não interrompe o ciclo de transmissão. Além disso, a capacidade das formas parasitárias (ovo / larva) sobreviverem por longos períodos no ambiente, propicia novas oportunidades de reinfecção após a quimioterapia (Hawdon, 2014; Campbell et al., 2016; Freeman et al., 2019).

Uma alternativa para resolver essa lacuna consiste na abordagem integrada com a melhoria de infraestrutura e componentes comportamentais (saneamento, higiene e educação em saúde), conhecida como (WASH - *Water, Sanitation and Hygiene*), fundamental no controle e eliminação de doenças negligenciadas como os HTS (Steinbaum et al., 2019). Mundialmente, cerca de 829.000 mortes são atribuíveis a ausência de WASH, reforçando a importância desse tipo de investimento especialmente para saúde pública (Prüss-Ustün et al., 2019).

O acesso ao saneamento básico adequado em conjunto com a desparasitização foi apontado como fator chave para redução da prevalência dessas infecções a médio e longo prazo em países desenvolvidos como Estados Unidos da América e Japão, sendo a adoção destes modelos, considerados ideais para a redução e controle de helmintoses intestinais em países em desenvolvimento (Hong et al., 2006; Ziegelbauer et al., 2012; Yu Hung et al., 2019).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Padronizar metodologias para recuperação de ovos de helmintos em diferentes matrizes de solo arenoso (praias, parques e caixas de areia) mediante ensaios de contaminação artificial utilizando como modelo ovos de *Ascaris suum*.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar o monitoramento da contaminação por ovos de helmintos em areias das principais praias do litoral do Paraná durante dois anos, mediante emprego da metodologia previamente padronizada.

- Detectar e quantificar a concentração de indicadores bacteriológicos de contaminação fecal (*Escherichia coli* e *Enterococcus* sp.) nas principais praias destinadas à recreação humana do Estado durante dois anos.

- Compilar, analisar e fornecer dados das condições microbiológicas e parasitológicas das areias de praias do litoral Paranaense ao órgão ambiental competente como subsídio para proposição de legislação estadual de balneabilidade.

- Verificar se caixas de areia destinadas à recreação infantil de parques públicos e Centros Municipais de Educação Infantil (CMEI) de Curitiba apresentam contaminação por ovos de helmintos.

- Realizar atividade de intervenção no ambiente escolar através de ações educativas para funcionários e estudantes dos CMEI participantes do estudo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento do estudo

Para determinar a ocorrência natural de ovos de helmintos em solos de áreas públicas destinadas à recreação humana foram selecionadas três áreas: praias do litoral paranaense, parques públicos e Centros Municipais de Educação Infantil da capital do estado. O estudo foi dividido em duas etapas: **etapa 1** - padronização de metodologias visando à detecção de ovos de helmintos transmitidos pelo solo (HTS) em diferentes matrizes arenosas; **etapa 2**: monitoramento ambiental da contaminação por ovos de HTS como descrito abaixo (Fluxograma 1):

Fluxograma 1: Delineamento experimental do estudo.



4.2 Etapa 1: Experimentos de contaminação artificial em diferentes matrizes arenosas

4.2.1 Análise granulométrica de cada tipo de solo

Previamente aos ensaios controle, as amostras coletadas nas áreas de estudo foram classificadas utilizando a análise granulométrica de solo. As matrizes de solo arenoso provenientes das três áreas de recreação diferiram em suas composições granulométricas e foram determinantes para o delineamento dos ensaios de contaminação artificial. As análises foram realizadas pelo Laboratório de Física do Solo, do Departamento de Solos e Engenharia Agrícola da UFPR.

As análises revelaram que o solo do litoral é composto majoritariamente por areia, sobretudo a areia grossa logo optou-se por um método que melhor se adequou a essa característica para recuperação de ovos. As amostras de solo provenientes das caixas de areia de Parques públicos e CMEIs de Curitiba (áreas 2 e 3) apresentam em sua composição concentrações de argila, silte e areia total equivalentes (Tabela 3), diferindo apenas na porção de areia grossa em relação a areia fina. Essas características granulométricas também foram consideradas e exigiram adaptações ao protocolo para recuperação de ovos nestas áreas devido à sua composição granulométrica diferir do solo da área 1 (areia de praia).

Tabela 3: Laudo da análise granulométrica do solo das três áreas selecionadas para o estudo.

Área	Argila (g / kg ⁻¹)	Silte (g / kg ⁻¹)	Areia Total (g / kg ⁻¹)	Areia Grossa (g / kg ⁻¹)	Areia Fina (g / kg ⁻¹)
1 – Praia	13	0	988	530	458
2 – Parque	38	13	950	621	329
3 – CMEI	38	13	950	490	460

Fonte: Departamento de solo e Engenharia Agrícola, UFPR.

Nota: Dimensões: Argila ($\leq 2\mu\text{m}$); Silte (50 a $2\mu\text{m}$); Areia fina (200 a $50\mu\text{m}$); Areia Grossa (200 a $2000\mu\text{m}$).

4.2.2 Esterilização das amostras de solo

Com a finalidade de garantir resultados fidedignos, as amostras de solo foram previamente esterilizadas em autoclave, com vapor fluente por uma hora e um ensaio controle negativo piloto foi aplicado utilizando a flutuação em sacarose ($d = 1,24 \text{ g / cm}^3$) adaptado e modificado de Boni (2012) em quatro réplicas de 5 g cada, para verificar a ausência de ovos de HTS no material antes de cada um dos ensaios de contaminação artificial. Os recipientes contendo as amostras de areia esterilizadas permaneceram fechados, sendo abertos apenas para realização dos experimentos.

4.2.3 Obtenção e preparo da suspensão de ovos de *Ascaris suum*

Para os ensaios de contaminação artificial, ovos de *Ascaris suum* foram utilizados como modelo. As fêmeas do verme foram obtidas de suínos da cidade de Pomerode - SC, região endêmica para ascaridiose suína e, armazenadas em solução de formalina 3%. Posteriormente, as fêmeas adultas foram dissecadas sob estereomicroscópio seguindo o protocolo baseado em Jensen et al. (2009), reservando os últimos dois centímetros da bifurcação do útero, onde estão contidos os ovos férteis (com presença de camada mamilonada) (Figura 4A).

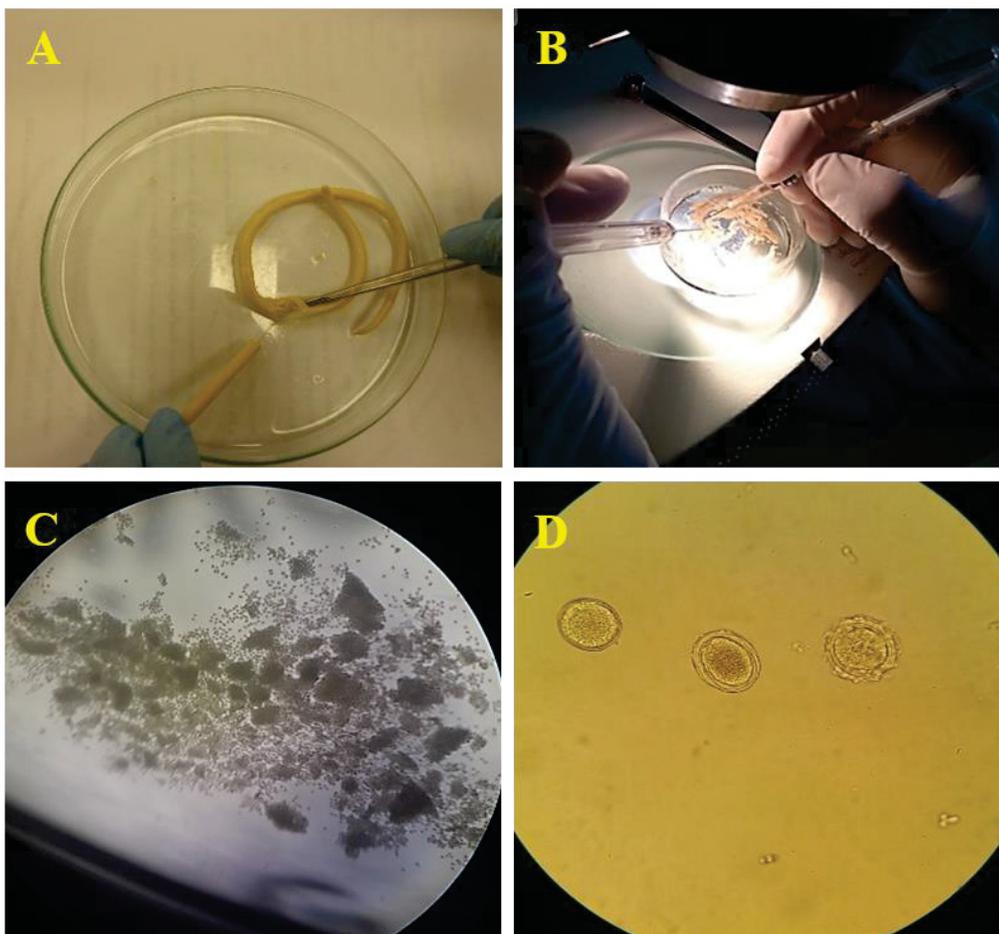
Em uma placa de Petri contendo água deionizada e Tween 80 (0,1%), fragmentos do útero foram pressionados com um bastão de vidro para liberação dos ovos. Os fragmentos remanescentes de tecido junto à suspensão foram peneirados e transferidos para um tubo tipo Falcon e, em seguida, a suspensão foi concentrada mediante centrifugação a $1250 \times g$ por 5 minutos. Foram necessárias sucessivas lavagens e centrifugações para obtenção de uma suspensão purificada visando a redução de compactação de ovos (grumos) (Figura 4B). Em seguida, o sobrenadante foi

descartado, resultando em um *pellet* de dois mL. O sedimento foi transferido para um tubo *ependorf* e gotas de formalina a 10% foram adicionadas à solução, sendo essa armazenada a 4 °C até a sua utilização.

Para determinar a concentração média de ovos presentes na suspensão purificada, foi realizada a contagem de 10 alíquotas de 1 μ L da solução. Para isso, previamente a cada contagem, o material foi agitado por dois minutos em vórtex e o tubo invertido três vezes, de modo a obter uma distribuição homogênea de ovos.

A média resultante da enumeração do número de ovos foi calculada e a suspensão estoque (Figura 4C), utilizada em todos os ensaios de contaminação artificial para estimativa da eficiência de recuperação de ovos de cada protocolo.

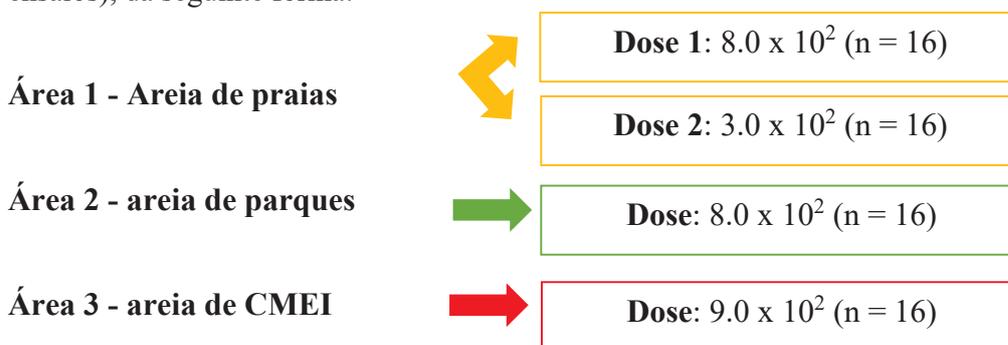
Figura 4: Dissecção do útero de fêmea de *Ascaris suum* para obtenção dos ovos para a fase de padronização (A, B); Ovos dispersos na placa de Petri observados em estereoscópico em aumento de (10X) (C); Suspensão de ovos purificados (D).



Fonte: A autora, 2019.

4.2.4 Protocolos empregados para determinar a eficiência de recuperação de ovos em areias de praias, parques e CMEI.

Um número conhecido de ovos foi inoculado em amostras esterilizadas. Para padronização dos métodos propostos, 64 protocolos foram analisados em triplicata (192 ensaios), da seguinte forma:

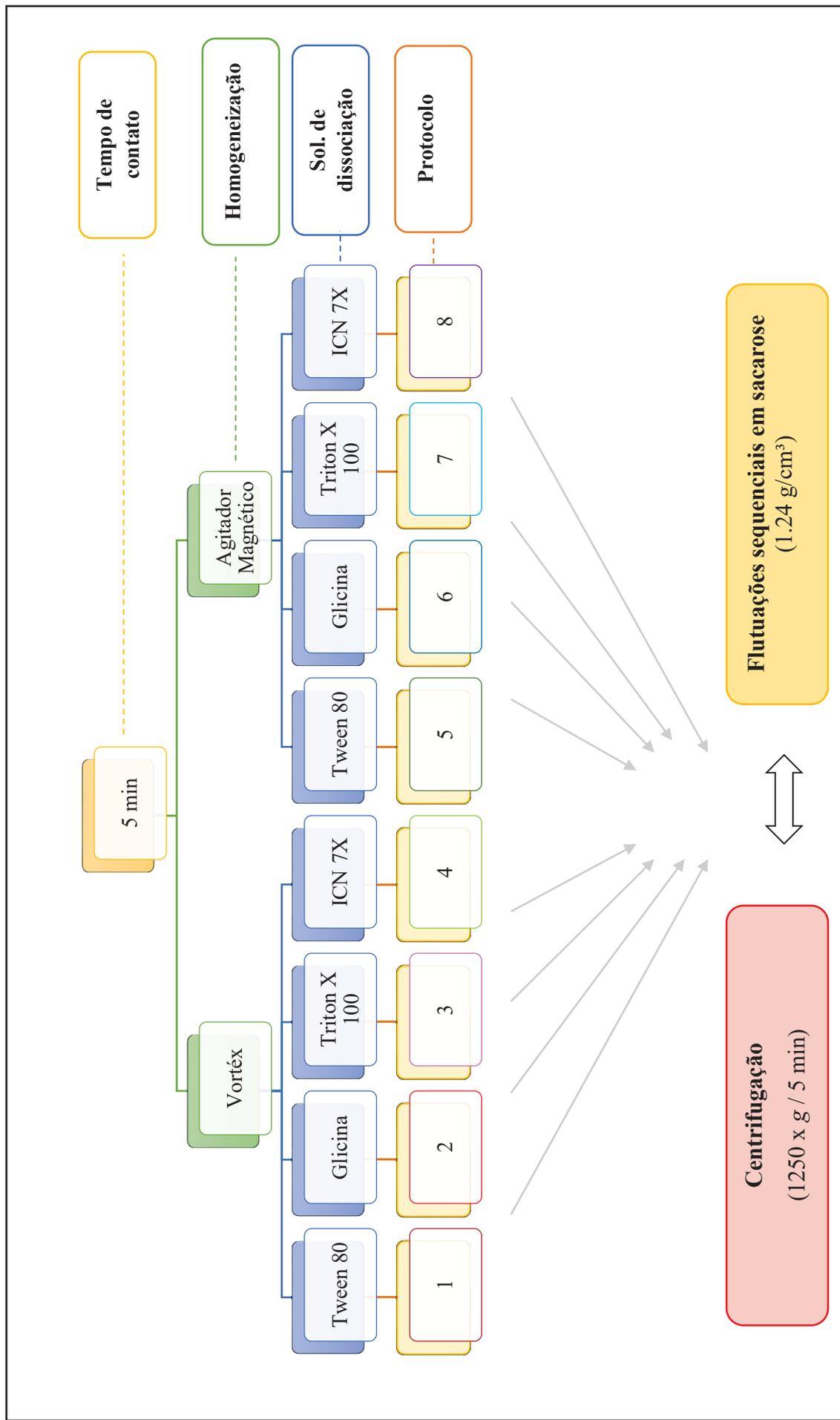


A execução dos ensaios controle para as três áreas arenosas foi feita separadamente. A padronização do método iniciou-se pela área 1 (areia de praias), seguidas das áreas 2 e 3 respectivamente. Os protocolos empregados nas três áreas de estudo tiveram como etapa comum as seguintes variáveis (Fluxogramas 2 e 3) para comparação da eficiência de recuperação:

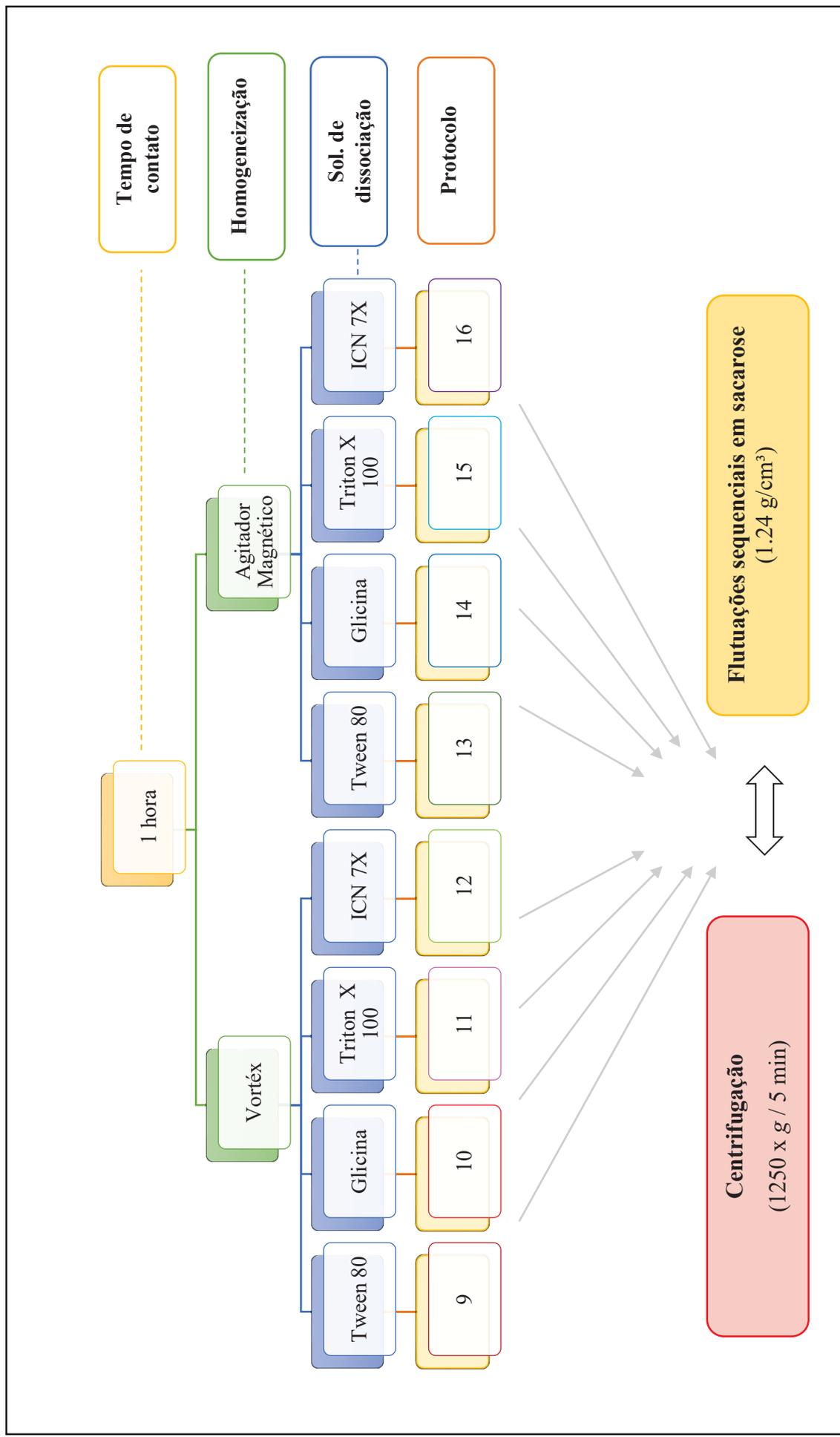
- 1) **Homogeneização** - Agitador do tipo vórtex ou agitador magnético;
- 2) **Solução de dissociação** - Glicina 1M pH 5,5, Tween[™] 80 (0,1%), Triton[™] X-100 (0,1%) e ICN 7X[®] (0,1%);
- 3) **Tempo de contato dos ovos com o solo** - 5 minutos ou 1 hora.

Na etapa final de todos os protocolos o material foi centrifugado a $1250 \times g$ por 5 minutos e a solução de sacarose ($d = 1,24 \text{ cm}^3$) foi adotada nas etapas de flutuação para a área 1 (Fluxograma 4) e centrífugo-flutuação para as áreas 2 e 3 (Fluxograma 5).

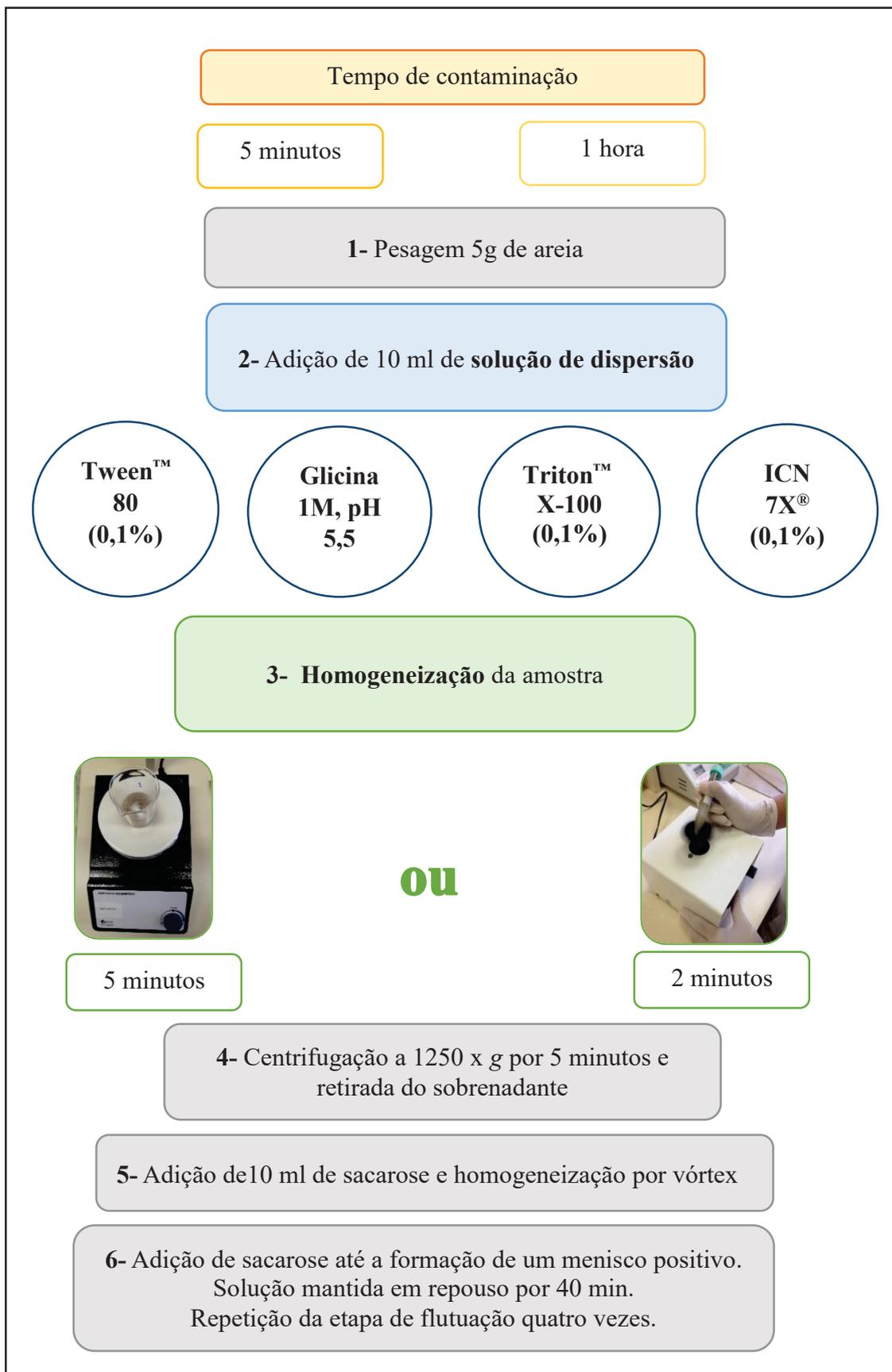
Fluxograma 2: Variáveis empregadas para padronização do protocolo de detecção de ovos de helmintos em diferentes matrizes arenosas



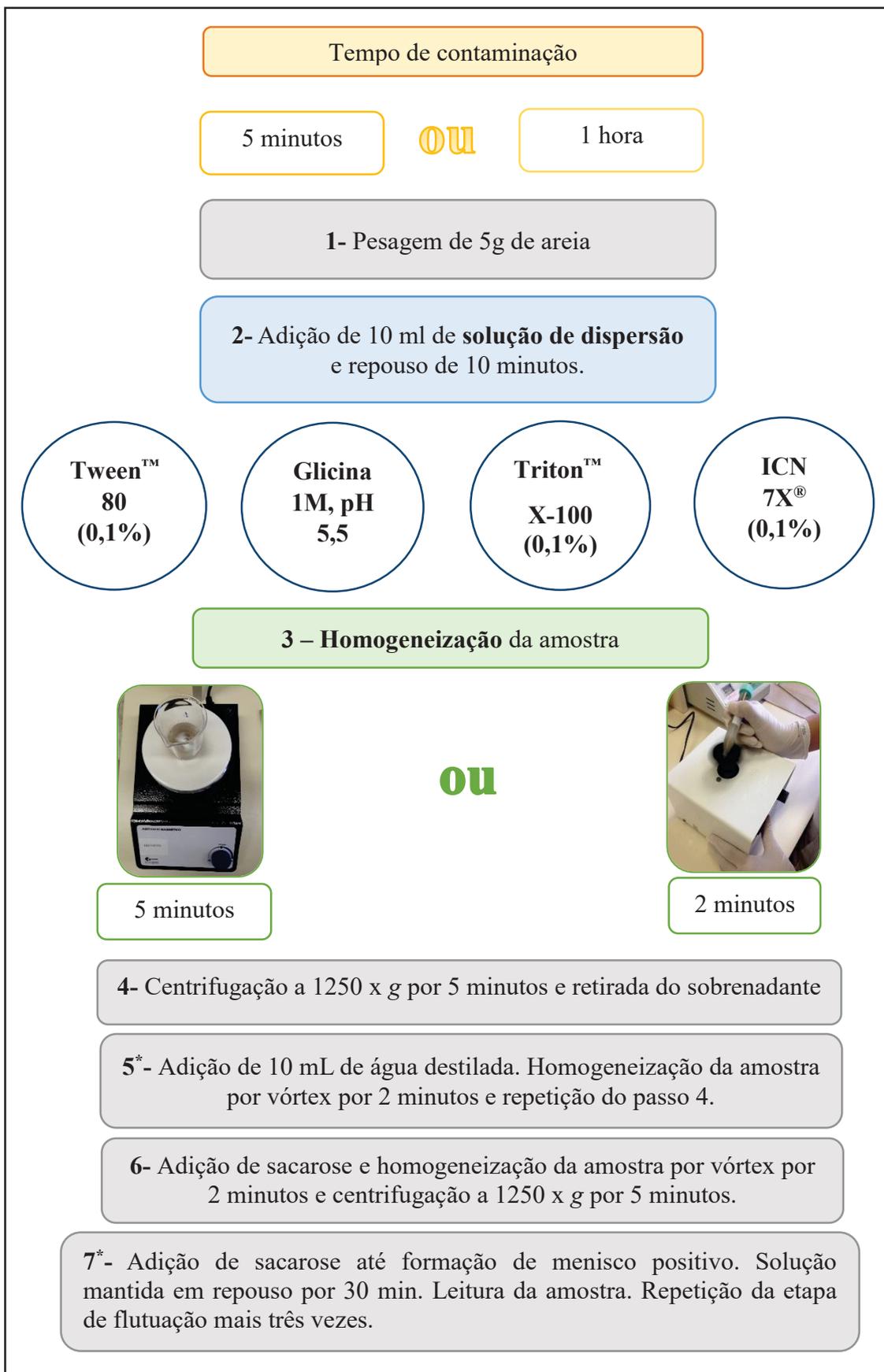
Fluxograma 3: Variáveis empregadas para padronização do protocolo de detecção de ovos de helmintos em diferentes matrizes arenosa.



Fluxograma 4: Etapas e variáveis empregadas para recuperação de ovos de HTS a partir de 32 protocolos analisados em areias de praias do Paraná contaminadas artificialmente.



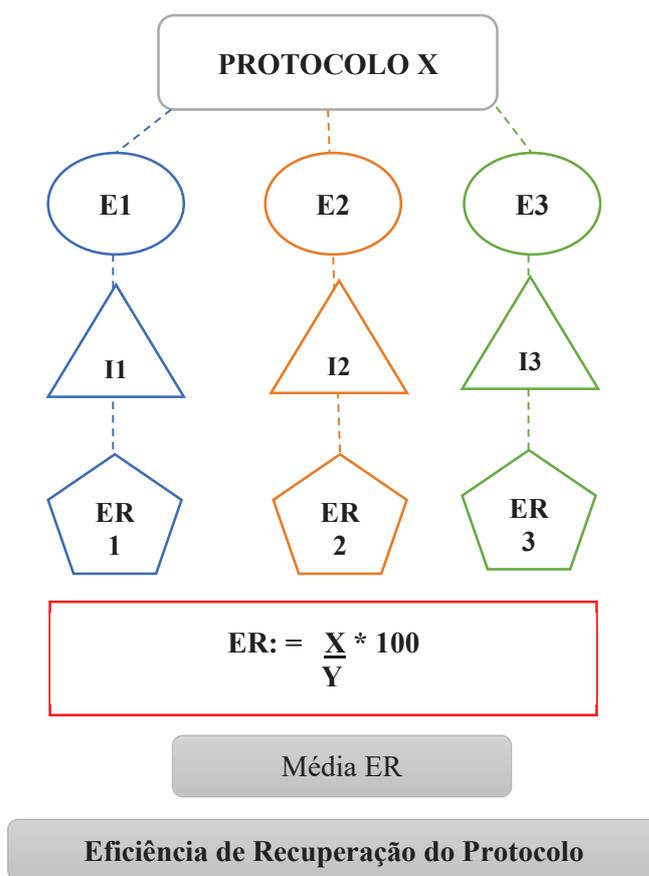
Fluxograma 5: Etapas e variáveis empregadas para recuperação de ovos de HTS a partir de 32 protocolos analisados em areias de parques e CMEI de Curitiba contaminadas artificialmente.



Nota: *Modificações inseridas nos protocolos de recuperação de ovos nos ensaios das áreas 2 e 3 devido ao ensaio piloto, utilizando a metodologia padronizada para a área 1 ter apresentado desempenho muito inferior para estas áreas com diferentes composições granulométricas e tipos de areia.

A definição do melhor protocolo para cada área foi baseada na maior taxa obtida de eficiência de recuperação (ER) dos ovos (Fluxograma 6). Após a padronização, cada método escolhido foi empregado no monitoramento da contaminação ambiental por ovos de helmintos nas três áreas de recreação selecionadas.

Fluxograma 6: Eficiência de recuperação de cada protocolo.



Nota: E: Ensaio em triplicata (1,2,3); I: Inóculo (1, 2, 3); ER: Eficiência de Recuperação; X = nº de ovos recuperados; Y = nº de ovos semeados.

Fonte: adaptado de Jaromin-Glen et al., 2017

4.3 Análise estatística

Para a comparação entre as médias de eficiência de recuperação de ovos em ensaios de contaminação artificial (etapa 1) mediante aplicação dos diferentes protocolos realizados em triplicata, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Para a comparação entre médias - duas a duas - o teste de Student-Newman-Keuls foi aplicado. Para ambos os testes, foi adotado um nível de significância de $p < 0,05$. Na segunda etapa de monitoramento da ocorrência de ovos de helmintos em amostras naturais adotou-se a estatística descritiva para análise do conjunto de dados obtidos.

4.4 Etapa 2: Monitoramento da ocorrência natural de ovos de helmintos em solos de diferentes áreas de recreação do litoral e capital do Paraná.

4.4.1 Monitoramento de praias do estado – Área 1.

Foram selecionados três pontos de coleta de comum acordo com Instituto Ambiental do Paraná (IAP), parceiro no presente estudo (Anexo 1) localizados nos municípios de Guaratuba (Ponto 1), Balneário de Caiobá (Ponto 2) e Matinhos (Ponto 3) (Quadro 4) (Figura 5).

Quadro 4: Características geográficas dos pontos de coleta de praias do Paraná eleitas para o monitoramento da qualidade sanitária do litoral durante dois anos.

Pontos de Coleta	Coordenadas Geográficas		Observação
	Latitude	Longitude	
Guaratuba (P1)	25°53'53.51" S	48°33'55.07" O	Direita do Rio Brejatuba
Caiobá (P2)	25°50'14.29" S	48°32'14.18" O	Esquerda do Canal de Caiobá
Matinhos (P3)	25°48'46.03" S	48°31'56.62" O	Esquerda do Rio Matinhos

Figura 5: Pontos de coleta selecionados para o monitoramento da qualidade sanitária do litoral paranaense.



Fonte: A autora, 2019.

As coletas de areia de praias foram realizadas mensalmente por um período de dois anos, (Janeiro / 2017 a Dezembro / 2018) concomitantemente para pesquisa de ovos de helmintos e bactérias indicadoras de contaminação fecal. Desta forma, a metodologia de coleta do IAP foi adotada no presente estudo, que delimita 50 m² (10 m x 5 m) de areia de praia. No perímetro estabelecido, nove subamostras de material composto pela camada superficial (profundidade de 5 cm) - totalizando 1 kg de areia foram coletados em cada praia (Figura 6).

As amostras (n = 72) no total foram acondicionadas em sacos plásticos de primeiro uso e colocadas em caixas isotérmicas a 4 °C e transportadas para o Laboratório de Parasitologia Ambiental da Universidade Federal do Paraná onde foi realizada a pesquisa de ovos de helmintos.

Figura 6: Modelo de área demarcada para coleta de amostras de areia.



Fonte: A autora, 2019.

4.4.2 Análise de amostras fecais

Durante o período de monitoramento do litoral, as amostras de fezes de animais (Figuras 7 A, B e C) não ressecadas observadas na orla da praia foram coletadas (Figura 7D) e armazenadas em sacos plásticos individuais esterilizados e transportadas em isopor refrigerado até o Laboratório de Parasitologia Clínica da UFPR onde foram examinadas utilizando as seguintes técnicas coproparasitológicas convencionais: método de sedimentação espontânea (Hoffman, Pons e Janer, 1934) e método de centrifugo flutuação em solução saturada de sulfato de Zinco (Faust et al., 1939).

Figura 7: Animais locais circulando nas praias no período de monitoramento do litoral (A, B, C) e fezes de animais encontradas nas areias das praias (setas) (D).



Fonte: A autora, 2019.

4.4.3 Análise microbiológica

A pesquisa de bactérias indicadoras de contaminação fecal ocorreu em parceria com o Laboratório de Microbiologia do IAP, e com o LACEN (Laboratório Central do Estado) - Unidade de Fronteira de Foz do Iguaçu seguindo os critérios preconizados por *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (AWWA, 2012; Eugene et al., 2012) – Anexo B.

Considerando a inexistência de preconização por legislação nacional para a pesquisa de bactérias indicadoras de contaminação fecal em areias de praias, no presente estudo optou-se por realizar enumeração de *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp. Todas as amostras foram acondicionadas em sacos esterilizados, e transportados em condições refrigeradas para o laboratório de parasitologia ambiental. A pesquisa dos indicadores iniciou-se em até 24 horas após a coleta e foi determinada pela estimativa do Número Mais Provável (NMP / 100 g) através da técnica de tubos múltiplos e do substrato definido (Colilert[®] e Enterolert[®] - Idexx, São Paulo, Brasil).

A densidade de bactérias indicadoras de contaminação fecal (coletas de todo o ano 2017 até a 5ª coleta de 2018) foi determinada pela técnica de tubos múltiplos, através do número mais provável (NMP). Para determinação de *E. coli* utilizou-se o meio de cultura caldo Fluorocult[®] LMX Merck - substrato fluorogênico MUG (4-metilumbeliferil- β -D-glicuronídeo) e para quantificação de enterococos o caldo Chromocult[®] Merck - substrato cromogênico X-GLU (5-Bromo-4-cloro-3 indolyl- β -D-glicopiranosídeo).

As concentrações de *Escherichia coli* foram determinadas com o auxílio de uma lâmpada ultravioleta de comprimento de onda 366 nm que evidenciou a fluorescência azul decorrente da ação da enzima β -glucoronidase, presente em *E. coli* sobre o substrato do meio MUG (4-metilumbeliferil- β -D-glicuronídeo) indicando positividade

da amostra. Para enterococos, foram considerados positivos tubos com coloração azul esverdeada, pois a quebra do substrato X-GLU realizada pela enzima β -D-glucosidase, caracteriza o gênero. Para ambas as bactérias, o resultado foi verificado na tabela NMP correspondente.

A quantificação de bactérias indicadoras de contaminação fecal (*E. coli* e enterococos) em areias de praia coletadas a partir de agosto / 2018 foi determinada pelo método do substrato definido (Colilert[®] e Enterolert[®] - Idexx, São Paulo, Brasil). Para esta metodologia, o princípio da técnica dos tubos múltiplos é substituído por 97 cavidades contidas em uma cartela estéril, e os resultados expressos em NMP para cada indicador eventualmente presente na amostra, sendo os resultados expressos e calculados por uma tabela padrão pela combinação de cavidades positivas.

Para isso, homogeneizou-se 25 g de areia em 225 mL de água estéril. Em seguida, o meio de cultura foi inoculado e diluído na amostra. Após a dissociação transferiu-se o conteúdo resultante para uma cartela estéril, selada e incubada em uma estufa bacteriológica a 35° C por 24 horas (Colilert[®] - Idexx, São Paulo, Brasil). Posteriormente, a concentração de *E. coli* foi determinada pela contabilização dos poços positivos com fluorescência (Luz UV - 366 nm), decorrentes do metabolismo do substrato MUG pela enzima β -glucuronidase (Figura 8).

Para quantificação do número mais provável de enterococos seguiu-se os passos iniciais supracitados, com adição do meio de cultura Enterolert[®] à amostra, e incubação da cartela a 41° C por 24 horas. Após esse período, a presença deste gênero foi indicada pela degradação do nutriente indicador (4-metil-lumbeliferil β -D-Glucosida) pela enzima β -D-glucosidase (Enterolert[®] - Idexx, São Paulo, Brasil). O número de poços positivos foi contado e a estimativa de bactérias contabilizada mediante tabela padrão de NMP / 100 mL.

Figura 8: Determinação da concentração de bactérias indicadoras de contaminação fecal em areias de praia do litoral paranaense: Método substrato definido: Colilert e Enterolert.



Fonte: A autora, 2019.

4.4.4 Monitoramento de HTS em parques e caixas de areia de CMEI destinadas à recreação em Curitiba, Paraná– áreas 2 e 3.

Curitiba, capital do Estado do Paraná possui clima subtropical (temperatura média: 21 °C / verão e 15 °C / inverno) com pluviosidade média de 1.500 mm/ano. A cidade é reconhecida nacionalmente pelo alto índice de áreas verdes: cerca de 30 bosques e parques, que aliam as funções de preservação ambiental, esporte e lazer (Prefeitura de Curitiba, 2020).

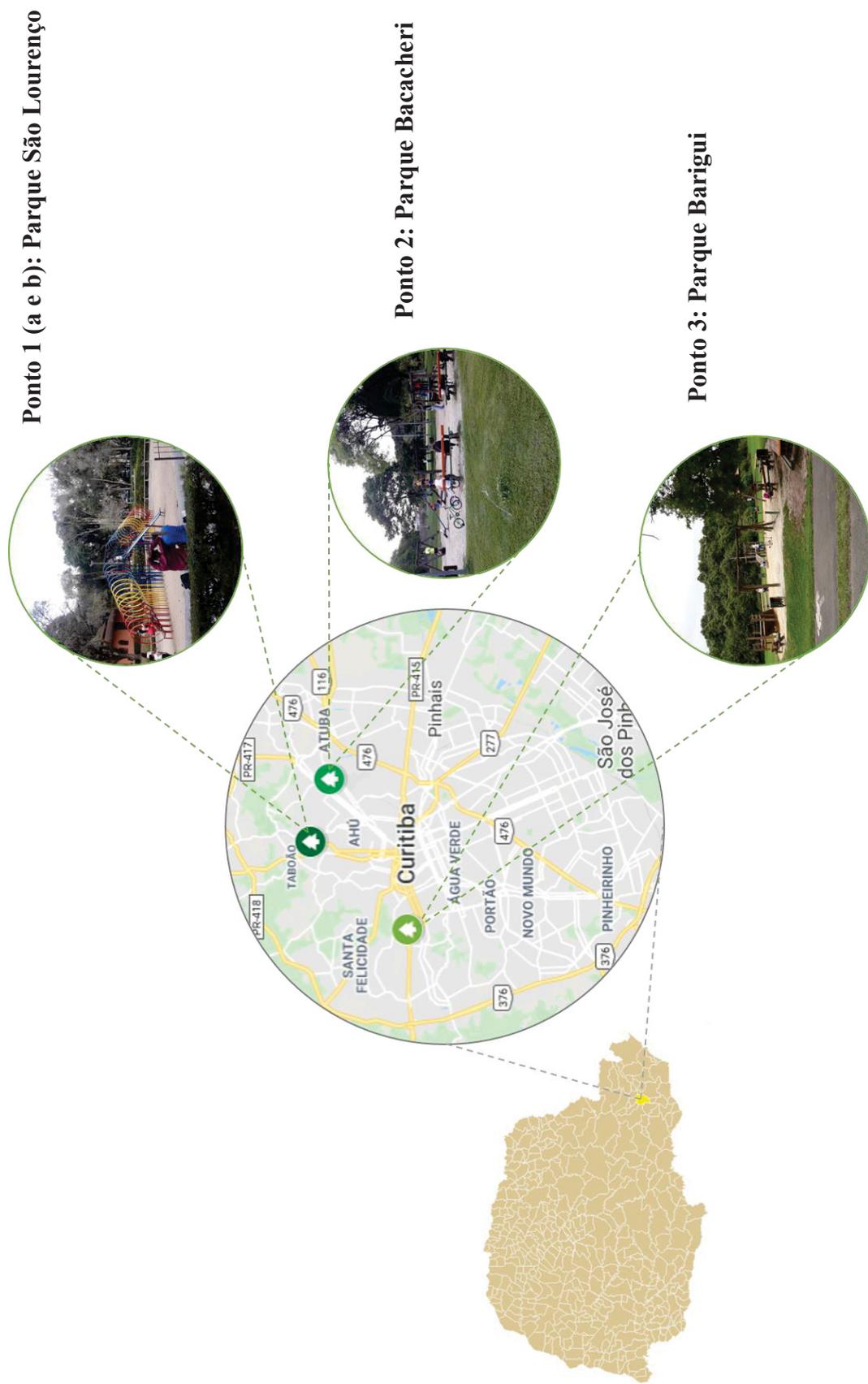
A cidade dispõe de 17 parques públicos de diferentes dimensões que recebem um grande número de pessoas de todas as regiões. Para o monitoramento, foram selecionados espaços destinados a passeio de animais, com alto número de visitantes e que apresentassem caixas de areia com *playgrounds* frequentados por crianças como: Parque São Lourenço (dois pontos de coleta – a e b), Parque Bacacheri e Parque Barigui descritos (Quadro 5) (Figura 9).

Quadro 5: Características geográficas dos pontos de coleta dos Parques Públicos da cidade de Curitiba monitorados no presente estudo.

Área 2: Parques Públicos	Pontos de coleta	Coordenadas Geográficas		Referência
		Latitude	Longitude	
	P1 (a)	25° 38'172" S	49° 26'69.2" O	<i>Playground</i> entrada do parque.
	P1 (b)			<i>Playground</i> à direita.
	P2	25°23'24.5"S	49°13'48.5"O	<i>Playground</i> único
	P3	25°25'34.52" S	49°18'27.03" O	<i>Playground</i> único

Nota: Os pontos P1 (a) e (b) estão localizados no mesmo parque (P1).

Figura 9: Parques públicos de Curitiba selecionados para o monitoramento da ocorrência de helmintos em caixas de areia.



Fonte: A autora, 2019.

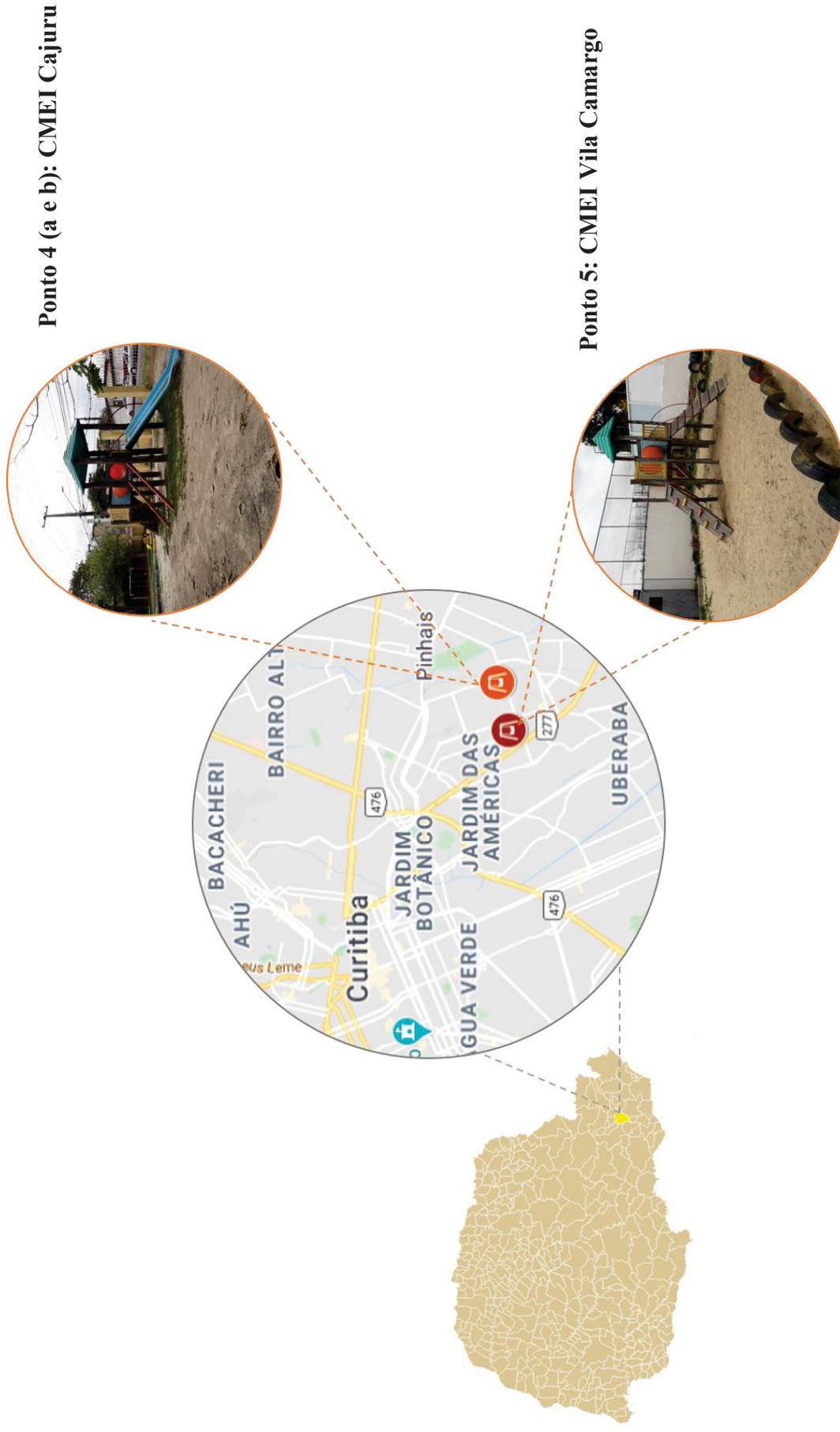
A cidade de Curitiba conta com mais de 200 Centros Municipais de Educação Infantil (CMEI) distribuídos e administrados pelas suas respectivas regionais e, atendem mais de 30.000 alunos de idade entre 0 a 5 anos. Os CMEI localizados na regional do bairro Cajuru foram selecionados para este estudo após o processo de aprovação pela Secretaria de Educação do Município de Curitiba (Anexo B).

As caixas de areia dos CMEI analisados pelo método padronizado na etapa 1 do estudo estão descritos abaixo (Quadro 6) (Figura 10).

Quadro 6: Características geográficas dos pontos de coleta dos Centros municipais de Educação Infantil de Curitiba

	Pontos de coleta	<u>Coordenadas Geográficas</u>		Referência
		Latitude	Longitude	
Área 3: CMEI	P4 (a)	25°45'928"S	49°20'218"O	Playground entrada do CMEI.
	P4 (b)			Caixa de areia dos fundos.
	P5	25°46'198"S	49°21'394"O	Playground único.

Nota: Os pontos P4 (a) e (b) estão localizados no mesmo parque (P4).



O monitoramento da contaminação de caixas de areia destinadas a recreação ocorreu mensalmente durante 10 meses, somando 70 amostras: 30 provenientes dos CMEI e 40 de Parques Públicos. Uma área de 4 m² foi delimitada próximo a cada *playground* e 9 subamostras foram colhidas na camada superficial numa profundidade de 5 cm, totalizando cerca de 1 kg de areia. As amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas a 4 °C e transportadas para o Laboratório de Parasitologia Ambiental da Universidade Federal do Paraná, para posterior pesquisa de ovos de helmintos (Figura 11).

Figura 11: Modelo de área demarcada para coleta de amostras de areia.



Fonte: A autora, 2019.

4.4.5 Intervenção educativa em saúde escolar

Atividades educativas em saúde foram realizadas com estudantes na faixa etária de três a cinco anos das turmas do maternal III ao Pré I e II. A intervenção educativa iniciou-se com uma atividade lúdica utilizando personagens da turma da Mônica, os quais foram relacionados a hábitos de higiene ou alimentares, com ênfase nas formas de infecção fecal – oral. Além disso, utilizou-se como estratégia a representação da dispersão de ovos através do *Glitter* e o ciclo de vida dos helmintos com auxílio de um modelo de corpo humano e vermes adultos. Por fim, representou-se a lavagem correta das mãos utilizando tinta guache.

Para os alunos do pré foi aplicada a atividade “Caça as Parasitoses”, onde as principais fontes de infecção do ambiente escolar (parque de areia, horta, banheiro e trocadores) foram identificadas e sinalizadas através de placas de riscos. Ao final da atividade os alunos foram nomeados “Guardiões das Parasitoses”, e ficaram responsáveis por alertar os demais alunos sobre os cuidados de higiene no ambiente escolar.

5. RESULTADOS

5.1 Experimentos de contaminação artificial em diferentes matrizes arenosas

5.1.1 Avaliação da eficiência de recuperação de ovos de helmintos em areia de praia (área 1).

As médias das taxas de eficiência de recuperação de ovos entre os 32 protocolos analisados variaram de 4,3% a 41,7% nas areias da área 1 (Tabelas 4 e 5).

Dentre todos os ensaios, o protocolo que apresentou o maior índice de eficiência de recuperação foi o de número 10 – tempo de contato de 1 hora e homogeneização da amostra com solução de dispersão Glicina (1M, pH 5,5) em aparelho vórtex tanto para a dose um quanto para a dois (Tabelas 4 e 5). Para a dose 1 (8×10^2) a eficiência média de recuperação foi de 41,7 % e para a dose 2 (8×10^2) de 30,8 %. Portanto, esse foi o método eleito para o monitoramento da contaminação ambiental por ovos de HTS em areias do litoral do Paraná (etapa 2) devido a aplicabilidade e eficiência de recuperação (Fluxograma 7).

Ao homogeneizar as amostras contaminadas com o aminoácido Glicina como solução de dissociação mediante o uso do aparelho vórtex, independentemente do tempo de contato, as taxas de recuperação de ovos dos protocolos foram otimizadas, quando comparado às outras três soluções de dissociação empregadas (Tabelas 4 e 5).

As amostras contaminadas com a dose 1 sob tempo de contato de cinco minutos e submetidas à homogeneização por vórtex com diferentes soluções - protocolos 1, 2, 3 e 4 (Tabela 4), também apresentaram melhor desempenho e diferença significativa ao utilizar Glicina 1M (protocolo 2) quando comparado às soluções de Tween 80 e Triton X-100 ($p = 0,0111$). Entretanto, a solução de ICN 7X apresentou desempenho similar à Glicina para recuperação de ovos.

Ao reduzir o número de ovos inoculados (dose 2) para contaminação das amostras, esses mesmos protocolos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre as médias de taxas de recuperação de ovos ($p = 0,0594$). Entretanto, o protocolo dois que empregou a homogeneização de Glicina em vórtex, apresentou a maior eficiência de recuperação de ovos entre as quatro soluções de dispersão analisadas (Tabela 5).

Para todos os ensaios, os menores índices de recuperação foram observados em protocolos que incluíam a homogeneização com agitador magnético e emprego das quatro soluções de dissociação ou detergentes. Apesar da utilização deste tipo de homogeneização mostrar-se inferior à utilização do vórtex para todas as soluções, as maiores eficiências de recuperação foram obtidas ao utilizar a solução de Glicina 1M, pH 5,5, tanto para a dose 1 como para a dose 2 e independentemente do tempo de contato (Tabelas 4 e 5).

As amostras de areia contaminadas artificialmente (dose 1), sob tempo de contato de 1h e homogeneizadas com diferentes soluções em agitador magnético, não apresentaram diferença significativa de recuperação de ovos entre os protocolos 13, 14, 15 e 16 (Tabela 4) ($p = 0,1771$). No entanto, ao reduzir a concentração de ovos (dose 2) para avaliação dos mesmos protocolos (Tabela 5), o protocolo 14 homogeneizado com Glicina, apresentou desempenho superior aos demais ($p = 0,0165$).

Para os protocolos 5, 6, 7 e 8 para as doses 1 e 2 onde a areia contaminada foi mantida sob o tempo de contato de 5 min (Tabelas 4 e 5) observou-se diferença significativa nas taxas de recuperação de ovos ($p = 0,0184$) e ($p = 0,0001$) respectivamente, sendo as maiores taxas observadas ao utilizar o aminoácido Glicina como solução de dissociação – protocolo 6.

Tabela 4: Eficiência de recuperação (ER) de ovos de helmintos em areia de praia contaminada artificialmente (dose 1) mediante aplicação de 16 protocolos com a metodologia de flutuação em sacarose ($d = 1,24 \text{ g / cm}^3$).

Protocolo	Tempo de contato	Solução de Dissociação	Homogeneização	1	2	3	ER do Protocolo (%)
1	5 minutos	Tween™ 80	Vórtex	9,4	13,8	6,5	$9,9 \pm 3,7^a$
2		Glicina 1M		15,1	17,0	14,0	$15,4 \pm 1,5^b$
3		Triton™ X-100		6,8	7,2	9,2	$7,7 \pm 1,3^a$
4		ICN 7X®		15,9	12,8	14,8	$14,5 \pm 1,5^b$
P-Valor = 0,0111							
5	5 minutos	Tween™ 80	Agitador	4,9	4,1	6,47	$5,2 \pm 1,2^a$
6		Glicina 1M		7,8	7,0	12,0	$8,9 \pm 2,7^b$
7		Triton™ X-100		4,6	4,7	4,2	$4,5 \pm 0,3^a$
8		ICN 7X®		3,6	4,4	5,0	$4,3 \pm 0,7^a$
P-Valor = 0,0184							
9	1 hora	Tween™ 80	Vórtex	6,1	8,5	10,5	$8,4 \pm 2,2^a$
10		Glicina 1M		45,5	44,4	35,0	$41,7 \pm 5,8^b$
11		Triton™ X-100		8,2	10,6	8,9	$9,2 \pm 1,2^a$
12		ICN 7X®		8,4	7,7	7,9	$8,0 \pm 0,4^a$
P-Valor = 0,0131							
13	1 hora	Tween™ 80	Agitador	3,9	6,2	5,0	$5,0 \pm 1,2^a$
14		Glicina 1M		6,0	11,2	10,4	$9,2 \pm 2,8^a$
15		Triton™ X-100		5,5	6,9	7,3	$6,6 \pm 0,9^a$
16		ICN 7X®		4,0	8,0	6,9	$6,3 \pm 2,0^a$
P-Valor = 0,1771							

Legenda: Eficiência de Recuperação de cada Protocolo (ER) - Dose 1 = 8×10^2

Nota: Médias com letras iguais, na mesma coluna não apresentaram diferenças significativas ($p \leq 0,05$).

Tabela 5: Eficiência de recuperação (ER) de ovos de helmintos em areia de praia contaminada artificialmente (dose 2) mediante aplicação de 16 protocolos com a metodologia de flutuação em sacarose ($d = 1,24 \text{ g/cm}^3$).

Protocolo	Tempo de contato	Solução de Dissociação	Homogeneização	1	2	3	ER do Protocolo (%)
1		Tween™ 80		7,0	6,4	10,5	$8,0 \pm 2,2^a$
2		Glicina 1M	Vórtex	21,3	12,6	13,4	$15,8 \pm 4,8^a$
3		Triton™ X-100		9,9	12,6	11,1	$11,2 \pm 1,3^a$
4		ICN 7X®		10,8	8,5	10,5	$10,0 \pm 1,3^a$
P- Valor = 0,0594							
5		Tween™ 80		7,6	5,8	4,7	$6,0 \pm 1,5^a$
6		Glicina 1M	Agitador	8,2	9,6	9,1	$9,0 \pm 0,7^b$
7		Triton™ X-100	Magnético	4,4	4,1	5,8	$4,8 \pm 0,9^a$
8		ICN 7X®		4,7	7,3	6,4	$6,1 \pm 1,3^a$
P- Valor = 0,0001							
9		Tween™ 80		14,9	12,3	11,7	$13,0 \pm 1,7^a$
10		Glicina 1M	Vórtex	33,9	28,4	30,1	$30,8 \pm 2,8^b$
11		Triton™ X-100		6,4	11,4	7,0	$8,3 \pm 2,7^a$
12		ICN 7X®		15,8	14,6	13,4	$14,6 \pm 1,2^a$
P- Valor = 0,0001							
13	1 hora	Tween™ 80		6,7	9,1	7,9	$7,9 \pm 1,2^a$
14		Glicina 1M	Agitador	10,5	11,4	14,3	$12,1 \pm 2,0^b$
15		Triton™ X-100	Magnético	8,2	9,9	7,3	$8,5 \pm 1,3^a$
16		ICN 7X®		8,8	6,7	7,3	$7,6 \pm 1,0^a$
P- Valor = 0,0165							

Legenda: Eficiência de Recuperação do Protocolo (ER) - Dose 2 = 3×10^2

Nota: Médias com letras iguais, na mesma coluna não apresentaram diferenças significativas ($p \leq 0,05$).

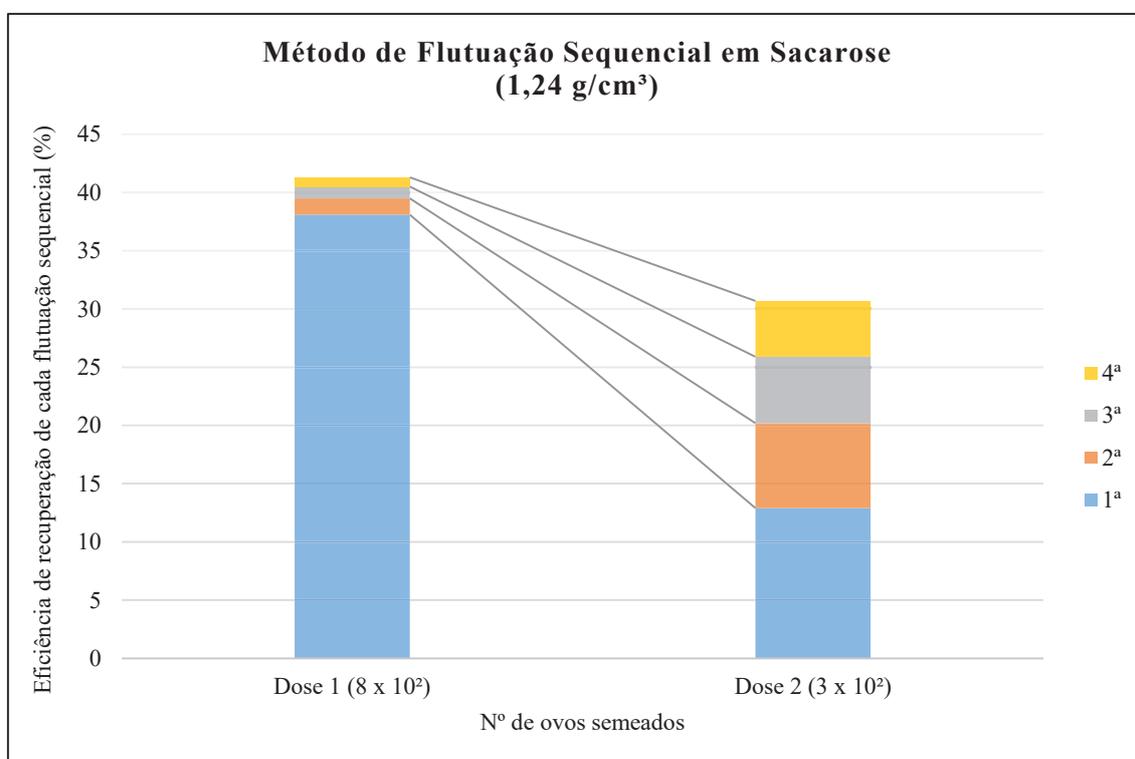
Fluxograma 7: Metodologia escolhida após a padronização detecção de ovos de helmintos em areia de praia (área 1) a partir do protocolo 10 que apresentou a maior eficiência de recuperação de ovos em amostras de areia contaminadas artificialmente.



Fonte: A autora, 2019.

Com relação à flutuação sequencial em sacarose, observou-se um maior número de ovos recuperados na primeira flutuação em 75% ($n = 72 / 96$) ensaios. Para o protocolo (10) que apresentou a maior sensibilidade a recuperação de ovos por flutuação, variou conforme o número de ovos semeados (30,7 % e 41,7 %). Para a dose 1, a maioria dos ovos foram recuperados na primeira flutuação (38,4 %) enquanto que com uma dose menor (dose 2) recuperou-se apenas 12,9% dos ovos na primeira leitura e maior concentração de ovos nas flutuações sequenciais (Figura 12) (Tabela 6).

Figura 12: Representação gráfica das taxas de recuperação de ovos de *Ascaris suum* por flutuação sequencial (%) referente ao protocolo 10.



Fonte: A autora, 2019.

Nota: Dose 1 = 8×10^2 e Dose 2 = 3×10^2

Tabela 6: Comparação da recuperação de ovos por cada flutuação sequencial de acordo com as doses utilizadas (D1 e D2) no protocolo 10

Nº de ovos semeados (n)	Ensaio	Número de ovos recuperados por flutuação								Total (N)	Eficiência de recuperação do protocolo (%)
		1 (N)	1 (%)	2 (N)	2 (%)	3 (N)	3 (%)	4 (N)	4 (%)		
D1	1	348	42,5	12	1,4	8	1	5	0,6	373	45,5
	2	347	42,4	7	0,85	6	0,7	4	0,5	364	44,4
	3	247	30,2	17	2	12	1,5	11	1,3	287	35
Média de ovos recuperados / flutuação (%)		38,4		1,4		1		0,8		41,7	
D2	1	42	12,3	30	8,8	18	5,2	26	7,6	116	33,9
	2	44	12,9	18	5,2	25	7,3	10	2,9	97	28,3
	3	46	13,5	27	7,9	16	4,7	14	4	103	30,1
Média de ovos recuperados / flutuação (%)		12,9		7,3		5,7		4,8		30,7	

Legenda: D1: dose 1 – 8 x 10² - D2: dose 2 – 3 x 10²

5.1.2 Avaliação da eficiência de recuperação de ovos de helmintos em areia de parques e caixas de areia de CMEI em Curitiba (áreas 2 e 3).

Dentre os protocolos, o que apresentou a maior eficiência de recuperação de ovos foi o de número 11 – tempo de contato de 1 hora, homogeneização com aparelho vórtex e detergente aniônico Triton™ X-100 (0,1%) como solução de dissociação, tanto para solos arenosos de Parques Públicos (área 2) como de CMEI (área 3), resultando em taxas de recuperação de 29,6% e 27,3% respectivamente (Tabelas 7 e 8). Desta forma, este foi o método aplicado na segunda etapa do estudo de monitoramento da ocorrência de ovos de HTS em Parques Públicos e CMEI de Curitiba (Fluxograma 8).

As taxas médias de recuperação de ovos dos protocolos propostos para área de recreação dois (parques públicos) variaram de 12,6 % a 29,6 % (Tabela 7). Os protocolos 9, 10, 11 e 12 que incluíam a homogeneização de diferentes soluções mediante o uso de vórtex e tempo de contato de 1 hora apresentaram os maiores índices de recuperação, seguidos dos protocolos 1, 2, 3 e 4 onde o vórtex também foi aplicado, porém com menor tempo de contato (5 minutos) do inóculo com a areia. Entretanto, para os oito protocolos mencionados anteriormente - onde as maiores eficiências de recuperação foram obtidas ao utilizar a solução de Triton X -100 - não apresentaram diferença significativa entre as médias de recuperação de ovos ($p = 0,7540$) e ($p = 0,2955$) respectivamente (Tabela 7).

As menores taxas de recuperação de ovos também foram observadas ao homogeneizar as amostras de solo de parques mediante o uso do agitador magnético. Entretanto, apresentaram diferença significativa entre as taxas de recuperação obtidas, sendo que independentemente do tempo de contato (5 minutos ou 1 hora) a solução de dissociação mais eficiente foi Triton™ X-100 (0,1%).

Tabela 7: Eficiência de recuperação (ER) de ovos de helmintos em solos arenosos de parques (área 2) contaminado artificialmente mediante aplicação de 16 protocolos com a metodologia de centrifugo-flutuação em sacarose ($d = 1,24 \text{ g / cm}^3$).

Protocolo	Tempo de contato	Solução de dissociação	Homogeneização	1	2	3	ER ensaios (%)	ER Protocolos (%)
1	5 minutos	Tween™ 80	Vórtex	18,6	19,8	31,2		23,2 ± 6,9 ^a
2		Glicina 1M		13,0	23,7	27,0		21,2 ± 7,3 ^a
3		Triton™ X-100		28,4	31,4	26,8		28,9 ± 2,3 ^a
4		ICN 7X®		24,9	16,2	18,4		19,8 ± 4,5 ^a
P- Valor =				0,2955				
5	5 minutos	Tween™ 80	Agitador	13,4	13,6	15,0		14,0 ± 0,8 ^a
6		Glicina 1M		15,0	11,8	10,9		12,6 ± 2,1 ^a
7		Triton™ X-100		23,9	19,6	15,7		19,7 ± 4,1 ^b
8		ICN 7X®		14,9	13,4	12,6		13,6 ± 1,1 ^a
P- Valor =				0,0205				
9	1 hora	Tween™ 80	Vórtex	23,4	25,6	35,2		28,1 ± 6,2 ^a
10		Glicina 1M		29,8	27,3	23,2		26,7 ± 3,3 ^a
11		Triton™ X-100		32,2	26,5	30,1		29,6 ± 2,9 ^a
12		ICN 7X®		22,5	30,3	23,8		25,5 ± 4,2 ^a
P- Valor =				0,7540				
13	1 hora	Tween™ 80	Agitador	15,0	14,8	17,0		15,6 ± 1,2 ^a
14		Glicina 1M		15,2	12,1	12,5		13,3 ± 1,7 ^a
15		Triton™ X-100		21,9	18,5	23,7		21,3 ± 2,6 ^b
16		ICN 7X®		16,6	22,5	16,8		18,6 ± 3,4 ^a
P- Valor =				0,0192				

Legenda: Eficiência de Recuperação do Protocolo (ER) - Dose = 8×10^2

Nota: Médias com letras iguais, na mesma coluna não apresentaram diferenças significativas ($p \leq 0,05$).

Tabela 8: Eficiência de recuperação (ER) de ovos de helmintos em solo arenoso de CMEI (área 3) contaminado artificialmente mediante aplicação de 16 protocolos com a metodologia de centrifugo-flutuação em sacarose ($d = 1,24 \text{ g/cm}^3$).

Protocolo	Tempo de contato	Solução de dissociação	Homogeneização	1	2	3	ER do protocolo (%)	
Vórtex								
1	5 minutos	Tween™ 80	P- Valor =	19,4	14,3	17,4	17,0 ± 2,5 ^a	
2		Glicina 1M		19,6	20,1	17,0	18,9 ± 1,7 ^a	
3		Triton™ X-100		25,2	28,3	24,4	26,0 ± 2,1^b	
4		ICN 7X®		20,7	18,8	17,7	19,1 ± 1,5 ^a	
0,0037								
5	5 minutos	Tween™ 80	Agitador	12,5	16,0	17,7	15,4 ± 2,6 ^a	
6		Glicina 1M		Magnético	18,1	14,3	15,0	15,8 ± 2,0 ^a
7		Triton™ X-100			14,5	17,4	16,7	16,2 ± 1,5 ^a
8		ICN 7X®			15,9	14,5	14,6	15,0 ± 0,8 ^a
0,9124								
Vórtex								
9	1 hora	Tween™ 80	P- Valor =	20,5	23,2	17,7	20,5 ± 2,7 ^a	
10		Glicina 1M		27,8	25,5	24,0	25,8 ± 1,9 ^a	
11		Triton™ X-100		27,6	24,7	29,8	27,4 ± 2,5^b	
12		ICN 7X®		23,5	19,2	21,7	21,5 ± 2,1 ^a	
0,0140								
Agitador								
13	1 hora	Tween™ 80	P- Valor =	20,0	17,1	14,1	17,1 ± 2,9 ^a	
14		Glicina 1M		Magnético	12,7	11,8	14,8	13,1 ± 1,6 ^a
15		Triton™ X-100			20,5	21,3	14,4	18,8 ± 3,8 ^a
16		ICN 7X®			20,7	12,2	18,7	17,0 ± 4,4 ^a
0,3643								

Legenda: Eficiência de Recuperação do Protocolo (ER) - Dose = 8×10^2

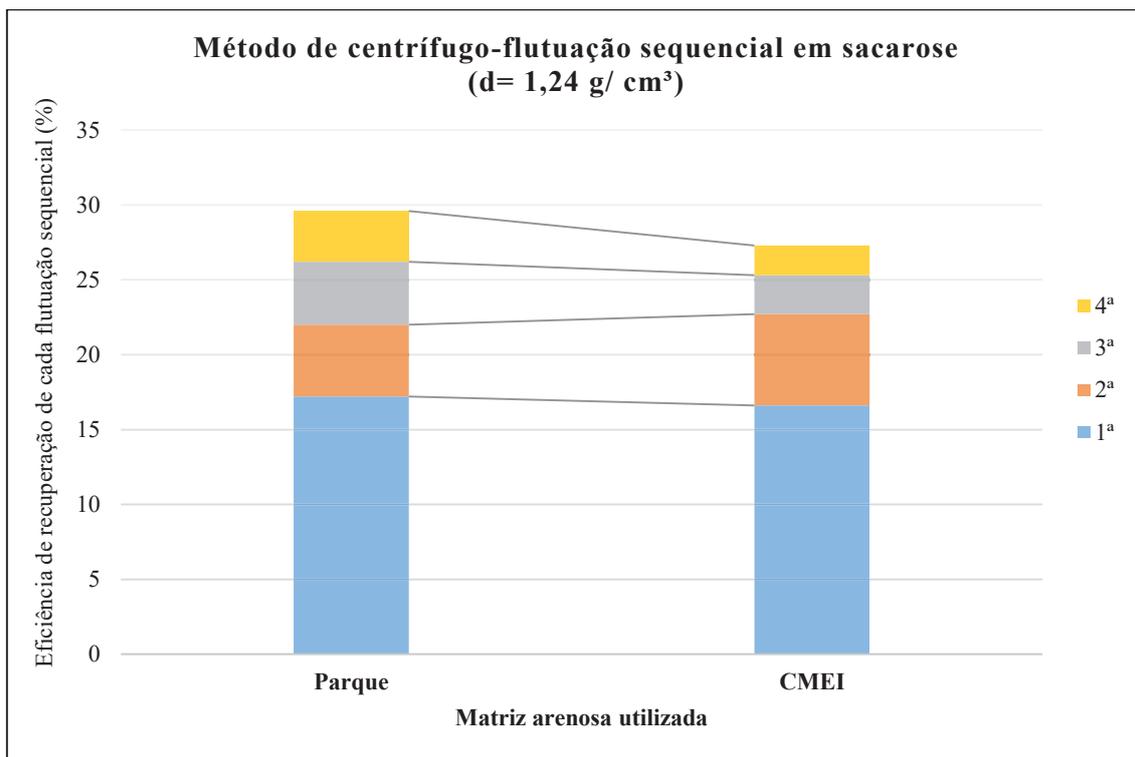
Nota: Médias com letras iguais, na mesma coluna não apresentaram diferenças significativas ($p \leq 0,05$).

A eficiência média de recuperação de ovos do solo proveniente do CMEI (área 3) variou de 13,1 % a 27,4% (Tabela 8). Assim como na área 2, as maiores taxas de recuperação para as areias da área 3, foram obtidas empregando a homogeneização das quatro soluções em vórtex, porém, com diferenças significativas entre as soluções de Triton™ X - 100 (0,1%) para as demais. As médias obtidas nos protocolos 1, 2, 3, e 4 tempo de contato 5 minutos, variaram de 17 % a 26,0 % ($p = 0,003$), enquanto para os protocolos 9, 10, 11 e 12 com maior tempo de contato resultaram em índices de 20,5 % a 27,4 % ($p = 0,014$) (Tabela 8).

Os protocolos que incluíam o agitador magnético na variável homogeneização apresentaram novamente as menores taxas de recuperação de ovos, porém sem diferença significativa (Tabela 8).

A centrífugo-flutuação seguida de outras três flutuações resultou na recuperação de um maior número de ovos na primeira flutuação, em 86,4 % ($n = 83 / 96$) dos ensaios. Para o protocolo (11) que exibiu os maiores índices de recuperação de ovos (29,6 % e 27,3%) nas amostras de solo das áreas 2 e 3 respectivamente, a maioria dos ovos foram recuperados na primeira flutuação (17,2 e 16,6%) e os demais nas flutuações sequenciais (Figura 13) (Tabela 9).

Figura 13: Representação gráfica das taxas de recuperação de ovos de *Ascaris suum* por centrífugo-flutuação seguida de flutuações sequenciais (%) referente ao protocolo 11.



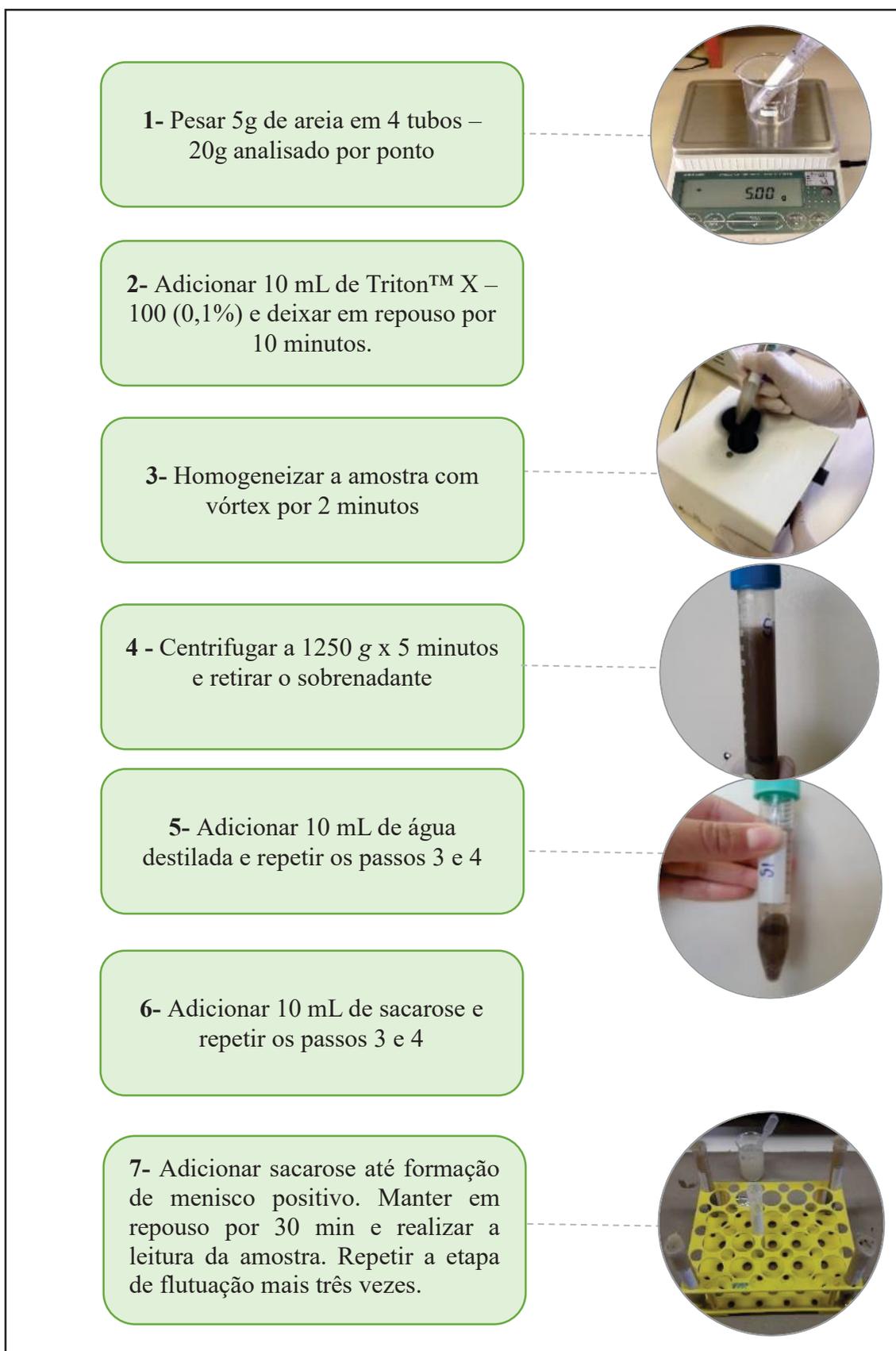
Fonte: A autora, 2019.

Tabela 9: Comparação da recuperação de ovos por cada flutuação sequencial de acordo com a matriz arenosa utilizada no protocolo 11.

Nº de ovos semeados (N)	Ensaio	Número de ovos recuperados por flutuação								Total (N)	Eficiência de recuperação do protocolo (%)
		1*	2	3	4	Total	1*	2	3		
Área 2	1	(N) 206	(%) 23,2	(N) 43	(%) 4,8	(N) 20	(%) 2,3	(N) 17	(%) 1,9	286	32,2
	2	(N) 76	(%) 8,6	(N) 58	(%) 6,5	(N) 58	(%) 6,5	(N) 43	(%) 4,8	235	26,4
	3	(N) 175	(%) 19,7	(N) 28	(%) 3,2	(N) 33	(%) 3,7	(N) 31	(%) 3,5	267	30,1
Média de ovos recuperados / Flutuação (%)			17,2		4,8		4,2		3,4		29,6
Área 3	1	(N) 157	(%) 16	(N) 74	(%) 7,5	(N) 19	(%) 1,9	(N) 22	(%) 2,2	272	27,6
	2	(N) 162	(%) 16,4	(N) 41	(%) 4,2	(N) 28	(%) 2,8	(N) 12	(%) 1,2	243	24,6
	3	(N) 171	(%) 17,4	(N) 63	(%) 6,4	(N) 32	(%) 3,2	(N) 27	(%) 2,7	293	29,7
Média de ovos recuperados / Flutuação (%)			16,6		6,1		2,6		2		27,3

Nota: * Centrifugo flutuação seguida de três flutuações sequenciais

Fluxograma 8: Método de centrifugo-flutuação seguida de flutuação sequencial escolhido padronizado para detecção de ovos de helmintos em areia de áreas de recreação de centros urbanos (área 2 e 3).



5.2 Ocorrência natural de ovos de helmintos em areias do litoral do Paraná

O método padronizado foi utilizado para avaliação da ocorrência de ovos de helmintos em areias das principais praias do litoral paranaense em condições naturais de contaminação durante dois anos. A contaminação por ovos de HTS foi detectada em todas as praias durante o período de estudo. Em 24 meses de monitoramento, de três pontos referentes às três principais praias do Paraná (Guaratuba, Caiobá e Matinhos) pelo menos um gênero de helminto foi detectado em 25% dos meses de amostragem. Quando considerados os dois anos de monitoramento, 12,5% de todas as amostras apresentaram contaminação por pelo menos um gênero de helminto ($n = 9 / 72$). No primeiro ano de monitoramento evidenciou-se menor contaminação de praias por HTS 8,3 % ($n = 3 / 36$). No segundo ano de monitoramento, observou-se um aumento de 50,0% nas taxas de contaminação, sendo a presença de HTS evidenciada em 6 das 36 amostras analisadas (16,6%) (Tabela 10).

A praia de Caiobá (Ponto 2) se apresentou como a mais contaminada durante os dois anos de monitoramento 20,8 % ($n = 5 / 24$) amostras positivas. No primeiro ano, foram detectados ovos de HTS em 16,6% ($n = 2 / 12$) das amostras de areia, já no segundo ano, verificou-se maior impacto de contaminação fecal e ocorrência de helmintos em 25% ($n = 3 / 12$) amostras.

A contaminação por ovos de HTS esteve presente em 8,33% ($n = 2 / 24$) das areias coletadas em Guaratuba (Ponto 1). Nesse ponto não foram detectados ovos no primeiro ano (2017) de monitoramento. No segundo ano (2018) a contaminação foi verificada em 16,6% das amostras ($n = 2 / 12$).

No ponto 3 (Matinhos) foram detectados ovos em 8,3 % (n = 2 / 24) das amostras coletadas durante o monitoramento. No primeiro ano a taxa de positividade foi de 8,3% (n = 1 / 12), esse índice se repetiu no ano seguinte (2018).

Em relação aos HTS uma maior frequência de ovos da família Ancylostomatidae foi detectada - 55,5 % (n = 5) das amostras, seguido de *Ascaris* spp. em 33,3 % (n = 3) e *Trichuris* spp. em 11,1 % (n = 1). Além disso, também foram detectadas larvas de nematoides nas amostras de solo arenoso de diferentes praias (Figura 14).

A ocorrência de ovos de HTS nas praias foi maior durante o outono: 44,4% (n = 4) amostras foram positivas nessa estação. As amostras de areia coletadas durante o verão apresentaram 33,3 % de positividade (n = 3), já na primavera observou-se um índice de contaminação de 22 % (n = 2) amostras de areia. Nenhum ovo de HTS foi detectado nos meses de inverno.

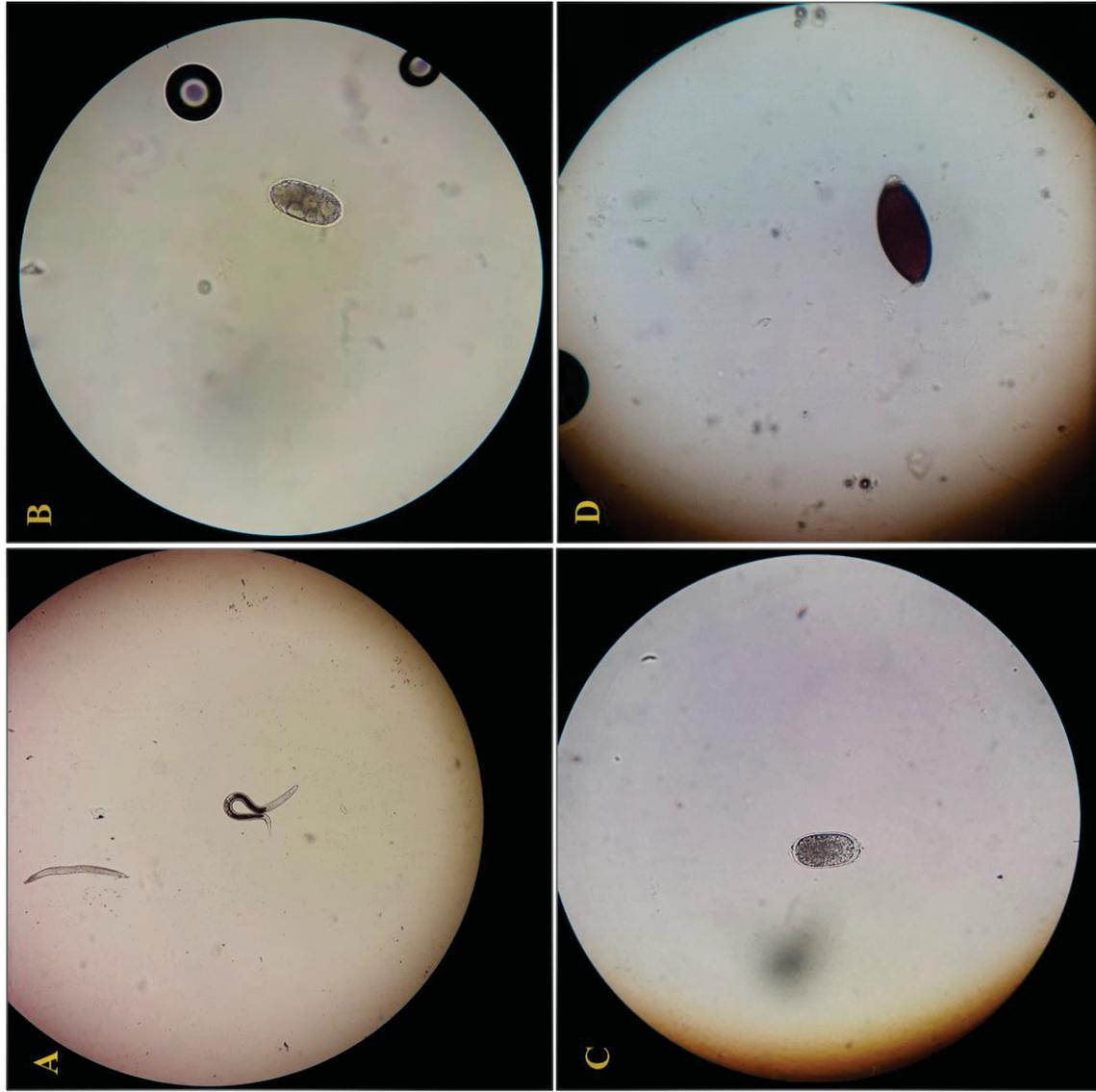
Tabela 10: Ocorrência de ovos de helmintos em dois anos de monitoramento da contaminação de areias de praias do litoral paranaense.

Área 1	Período	Amostra		Parasito encontrado				Estação do Ano			
		N	N (+)	(%)	<i>Ascaris</i> spp.	Família Ancylostomatidae	<i>Trichuris</i> spp.	Verão	Outono	Inverno	Primavera
P1	2017	12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	2018	12	2	16,6	ND	2	ND	ND	2	ND	ND
	Total	24	2	8,3	ND	2	ND	ND	2	ND	ND
P2	2017	12	2	16,6	2	ND	ND	1	ND	ND	1
	2018	12	3	25	1	2	ND	1	2	ND	ND
	Total	24	5	20,8	3	2	ND	2	2	ND	1
P3	2017	12	1	8,3	ND	ND	1	ND	ND	ND	1
	2018	12	1	8,3	ND	1	ND	1	1	ND	ND
	Total	24	2	8,3	ND	1	1	1	1	ND	1

Legenda: N = número de amostras coletadas; N (+) = Número de amostras que apresentaram positividade; (%) = valor em porcentagem;

Pontos de coleta: Guaratuba (P1); Caiobá (P2); Matinhos (P3). ND – Não detectado

Figura 14: Formas parasitárias observadas em amostras de areia provenientes do litoral Paranaense: Larva de nematódeo (A); Ovos da família Ancylostomatidae (B, C); Ovo de *Trichuris* sp em estágio embrionário. (D) sob o aumento de 400 X.



Fonte: A autora, 2019.

5.3 Análise microbiológica das areias de praia do litoral do Paraná

Durante o monitoramento da concentração de bactérias indicadoras de contaminação fecal (*Escherichia coli* e *Enterococcus* spp.) nas areias do litoral paranaense, observou-se grandes variações para *E. coli* com valores mínimos de 180 e máximos de 35.000 NMP / 100 g, e para *Enterococcus* spp., variou de 180 a 54.000 NMP / 100 g (Tabela 11).

A praia de Guaratuba (Ponto 1) apresentou as menores densidades de indicadores, especialmente no segundo ano. No ano de 2017, os valores de *E. coli* variaram de 180 a 3.300 NMP / 100 g, - média anual de 717 NMP/ 100g, e as concentrações de *Enterococcus* variaram de 180 a 17.000 NMP / 100 g – média anual de 4,157 NMP/ 100g. No segundo ano (2018), menores concentrações foram detectadas: *E. coli* valores de 1 a 2.200 NMP / 100 g (média de 337) e *Enterococcus* de 1 a 2.700 NMP / 100 g (média anual de 498).

A praia de Caiobá (Ponto 2) exibiu as maiores concentrações de *Enterococcus* entre todas as praias no primeiro ano, variando de 180 a 54.000 NMP/ 100 g (média de 8.616) e no segundo ano esse índice também reduziu - 1 a 13.000 NMP / 100 g (média de 1.229). Em relação a *E. coli* as taxas variaram de 180 a 24.000 NMP/ 100 g (média de 3.703) no primeiro ano, e de 25,3 a 11.000 NMP/ 100 no ano seguinte (média de 1.183). No ano de 2017, as maiores densidades de *E. coli* foram observadas no Ponto 3, onde os índices variaram de 180 a 35.000 NMP / 100 g (média de 3.963) e no segundo ano, de 180 a 3.300 NMP / 100 g (média de 768). Em relação a *Enterococcus* spp. apresentou uma variação de 180 a 35.000 NMP / 100 g no primeiro ano (média de 5.535) e 1 a 22.000 NMP / 100 g no segundo (média de 3.476).

Tabela 11: Densidade média de indicadores microbiológicos em NMP / 100 g de contaminação fecal (*E. coli* e *Enterococcus*) em áreas de praia do litoral

Período	Verão			Outono			Inverno			Primavera		
	<i>E. coli</i>	<i>Enterococcus</i>										
P1	Janeiro	2.300	17.000	Abril	180	180	Julho	180	4.900	Outubro	NR	NR
	Fevereiro	3.300	4.900	Maió	1.300	780	Agosto	180	200	Novembro	180	7.900
	Março	450	780	Junho	180	450	Setembro	180	4.900	Dezembro	180	7.900
Média/estação	2.016	7.560	553	470	180	3.333	180	3.333	200	120	5.266	NR
P2	Janeiro	1.700	7.900	Abril	7.900	35.000	Julho	200	200	Outubro	NR	NR
	Fevereiro	1.300	780	Maió	24.000	54.000	Agosto	180	180	Novembro	3.300	180
	Março	2.200	180	Junho	3.300	4.600	Setembro	180	180	Dezembro	180	200
Média/estação	1.733	2.953	11.733	31.200	186	186	180	450	180	1.160	126	NR
P3	Janeiro	780	24.000	Abril	180	200	Julho	180	450	Outubro	NR	NR
	Fevereiro	180	2.700	Maió	7.900	2.300	Agosto	180	450	Novembro	35.000	35.000
	Março	1.700	780	Junho	1.100	180	Setembro	180	180	Dezembro	180	13.000
Média/estação	886	9.160	3.060	893	180	360	180	360	11.726	16.000	16.000	16.000
P1	Janeiro	NR	NR	Abril	2.200	2.700	Julho	NR	NR	Outubro	7,4	2
	Fevereiro	400	1.700	Maió	450	780	Agosto	7,3	1	Novembro	114	1
	Março	780	780	Junho	NR	NR	Setembro	1	13	Dezembro	84,9	1
Média/estação	393	826	883	1.160	2.7	4.6	2.7	4.6	68,7	1,3	1,3	1,3
P2	Janeiro	NR	NR	Abril	200	780	Julho	NR	NR	Outubro	56,3	1
	Fevereiro	11.000	180	Maió	450	780	Agosto	117	4	Novembro	80,5	1
	Março	2.200	13.000	Junho	NR	NR	Setembro	77	4,5	Dezembro	25,3	1
Média/estação	4.400	4.393	216	520	64.3	2.8	64.3	2.8	54	1	1	1
P3	Janeiro	NR	NR	Abril	2.200	22.000	Julho	NR	NR	Outubro	16	4,5
	Fevereiro	200	14.000	Maió	200	4900	Agosto	43	4,5	Novembro	1986	1
	Março	3.300	680	Junho	NR	NR	Setembro	44	130	Dezembro	1227	1
Média/estação	1.166	4.893	800	8.966	29	44.8	29	44.8	1.093	2,1	2,1	2,1

Legenda: Pontos de coleta: Guaratuba (P1); Caiobá (P2); Matinhos (P3); NR = não realizada.

5.4 Ocorrência de ovos de helmintos em amostras fecais coletadas nas praias do litoral do Paraná.

Durante o monitoramento das condições sanitárias do litoral do Paraná, foram coletadas 19 amostras de fezes de animais ao longo da faixa de areia de praia, sendo 18 oriundas da praia de Matinhos (Ponto 3) e uma de Caiobá (Ponto 2). Observou-se um percentual de positividade de 63,1 % (n = 12) amostras para ovos de HTS. Todas as amostras fecais que apresentaram ovos foram coletadas no Ponto 3 (Figura 15).

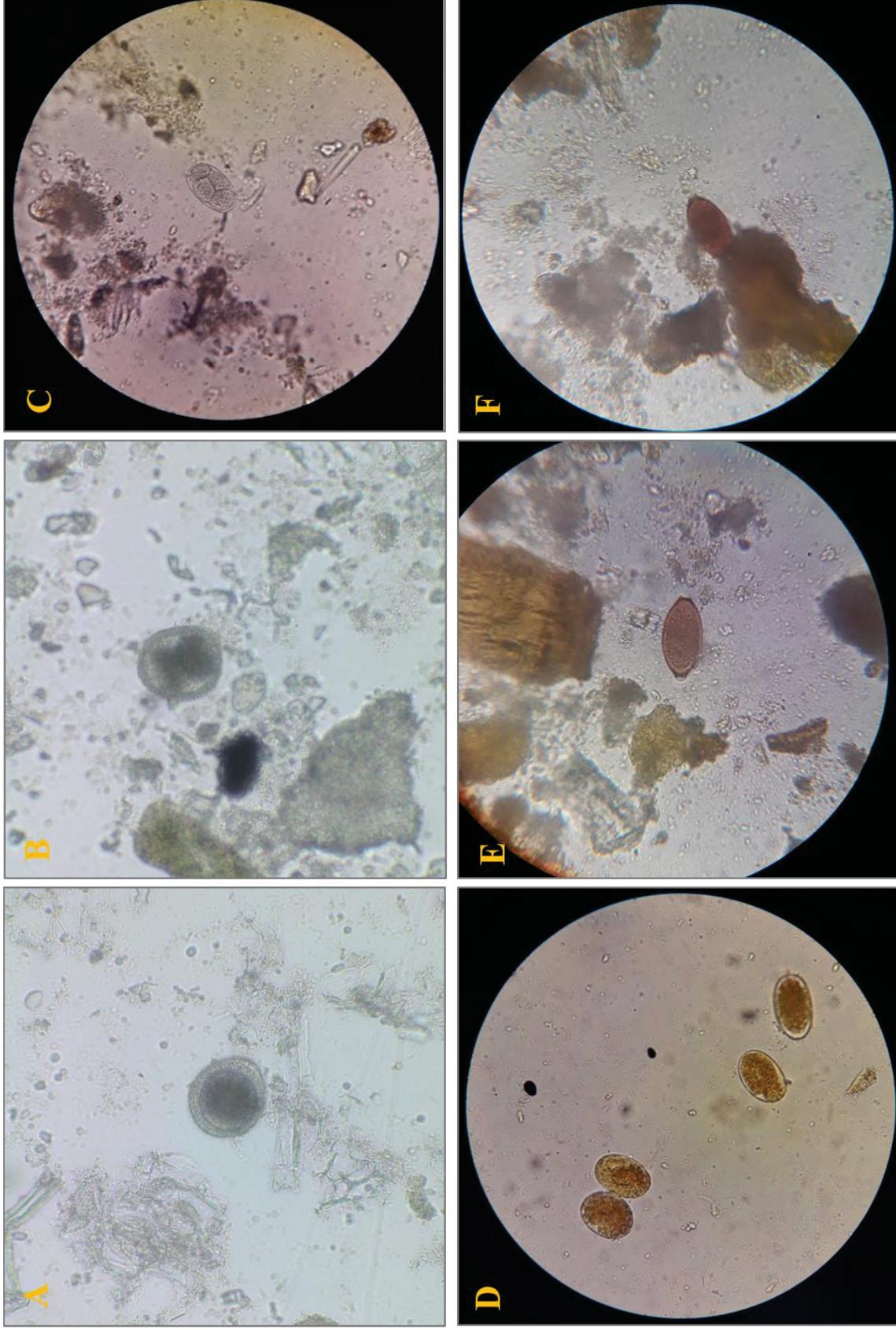
Os ovos de HTS detectados com maior frequência foram os da família Ancylostomatidae em 91,6% (n = 11) das amostras positivas, enquanto *Toxocara* spp., e *Trichuris* spp., ocorrem em igual proporção 8,33% (n = 1), cada (Figura 16). Além disso, observou-se contaminação por mais de um helminto em 8,33% (n = 1) das amostras positivas.

Figura 15: A orla da praia de Matinhos como peridomicílio (B) e a presença constante de animais nestes ambientes (A).



Fonte: A autora, 2019.

Figura 16: Ovos encontrados nas fezes de animais: Ovos de *Toxocara* sp., (A, B); Ovos da família Ancylostomatidae (C, D); Ovos de *Trichouris* sp. (E, F) sob aumento de 400 X.



5.5 Contaminação ambiental das áreas de recreação infantil (área 2 - Parques Públicos e área 3 - CMEIs)

O método padronizado na primeira etapa do estudo foi utilizado no monitoramento de ovos de HTS em caixas de areia de Parques Públicos e CMEI de Curitiba por um período de 10 meses. Todos os pontos de coletas apresentaram positividade, resultando num percentual geral de contaminação de 55,7% (n = 39 / 70) das áreas (2 e 3).

Nos parques públicos (área 2), foram observados ovos de helmintos em 45% das amostras de areia (n = 18 / 40). O ponto com maior taxa de contaminação foi o P1 (a e b) composto por dois *playgrounds* analisados separadamente, os quais apresentaram taxas de contaminação equivalentes de 60% (n = 6). Os parasitos detectados com maior frequência foram da família Ancylostomatidae, seguido de *Ascaris* spp., e *Trichuris* spp., além de larvas de nematóides de vida livre não contabilizadas (Tabela 12).

Tabela 12: Positividade das amostras de solo de parques públicos de Curitiba.

Área 2	Amostra			Parasito observado		
	N	N (+)	(%)	<i>Ascaris</i> sp.	Família Ancylostomatidae	<i>Trichuris</i> spp.
Ponto 1 (a)	10	6	60	0	6	*1
Ponto 1 (b)	10	6	60	0	6	0
Ponto 2	10	2	20	0	2	0
Ponto 3	10	4	40	4	0	0
Total	40	18	45	4	14	1

Legenda: N = número total de amostras; N (+) = número de amostras positivas; (%) valor descritos em porcentagem. Pontos de coleta: Parque São Lourenço (P1 – playground a e b); Parque Bacacheri (P2); Parque Barigui (P3). *Na mesma amostra foi detectado poliparasitismo.

Em relação a ocorrência de ovos de HTS presentes nas areias das áreas de recreação, as maiores taxas de contaminação foram detectadas na área 3 (caixa de areia dos CMEI de Curitiba), onde 70% (n = 21 / 30) das amostras apresentaram positividade. O ponto 4 composto por duas caixas de areia, apresentou os maiores índices de contaminação, sendo evidenciado ovos de HTS em 100% (n = 10) das amostras coletadas no Ponto 4a e em 90% (n = 9) do Ponto 4b. A taxa de ocorrência de ovos de helmintos no ponto 5 foi menor: 20 % (n = 2) das amostras coletas (Tabela 13).

Em relação aos gêneros dos ovos de helmintos detectados, a análise parasitológica revelou que àqueles pertencentes à família Ancylostomatidae foram os mais prevalentes, seguido de *Ascaris* spp., nas amostras positivas. Uma alta ocorrência de ovos de *Ascaris* foi observada no ponto 4, sobretudo no ponto 4 a.

Tabela 13: Positividade das amostras de solo CMEIs de Curitiba.

Área 3	Amostra			Parasito detectado*	
	N	N (+)	(%)	<i>Ascaris</i> spp.	Família Ancylostomatidae
Ponto 4 (a)	10	10	100	9	9
Ponto 4 (b)	10	9	90	6	8
Ponto 5	10	2	20	1	1
Total	30	21	70	16	18

Legenda: N = número total de amostras; N (+) = número de amostras positivas; (%) valor descritos em porcentagem. Pontos de coleta: CMEI Cajuru (P4 – playground a e b); CMEI Vila Camargo (P5). *Na mesma amostra pode ocorrer mais de um gênero de HTS.

Figura 17: Formas parasitárias detectadas em amostras de areia provenientes de Parques Públicos e CMEI de Curitiba: Ovo de *Ascaris* spp. (A, B); Ovo da família Ancylostomatidae (C); Ovo de *Trichuris* spp. aumento 100 X (D) sob o aumento de 400 X (A, B, C).

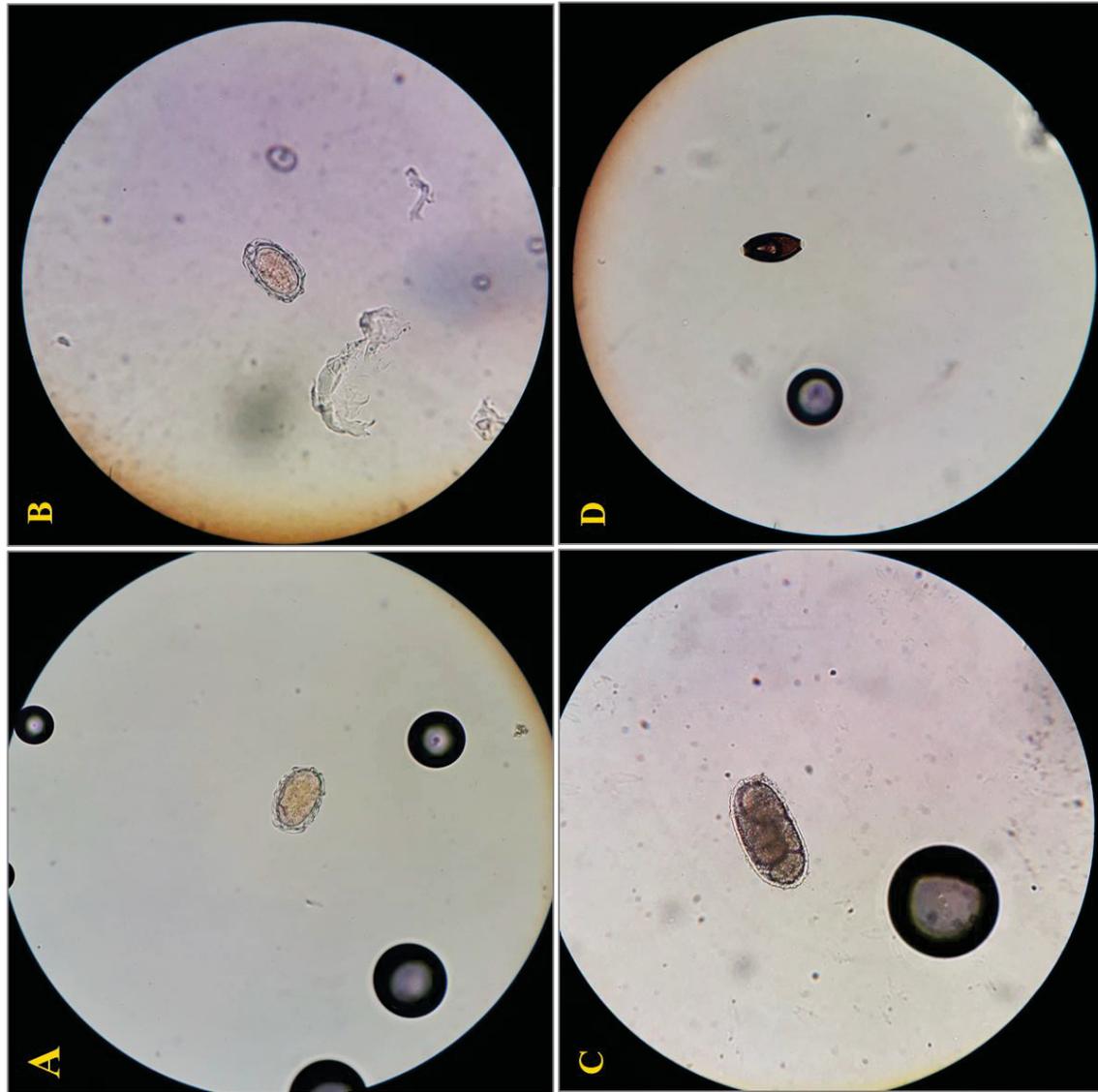
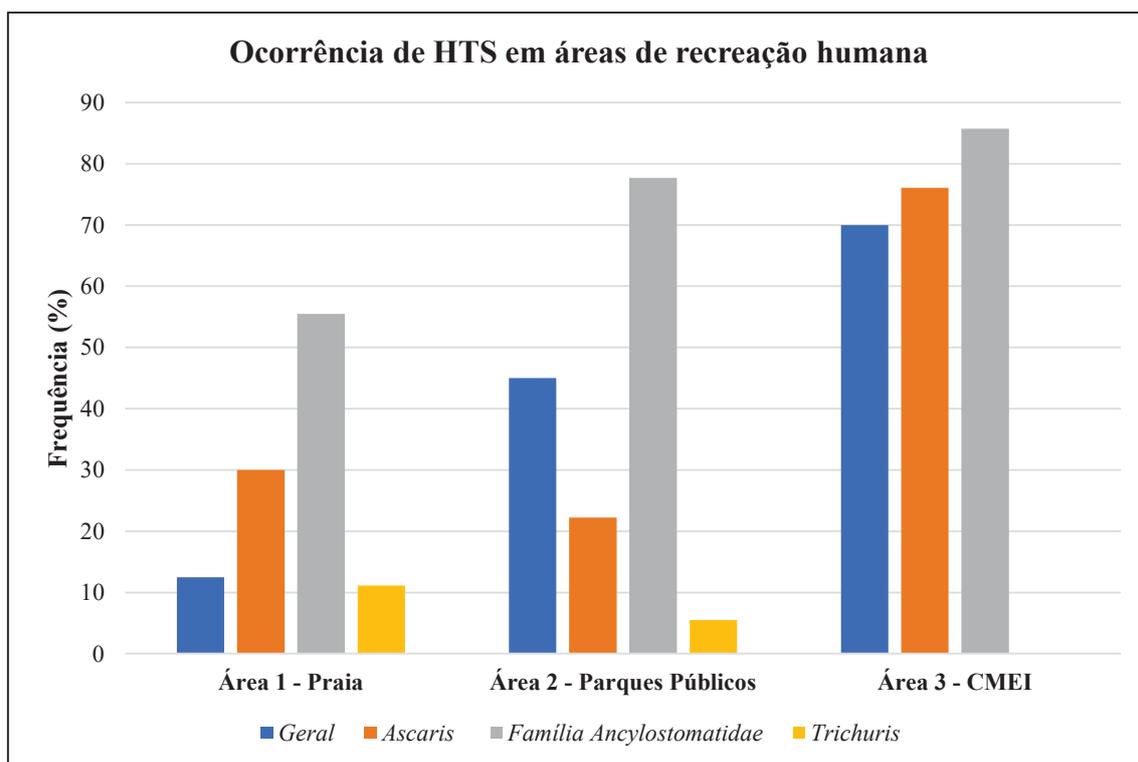


Foto: A autora, 2019.

Em todos os pontos de coleta das áreas de recreação infantil (área 1- Praia, área 2 – Parques Públicos e área 3 – CMEIs de Curitiba) selecionados observou-se alguma forma parasitária. Do total de 142 amostras coletadas nas três áreas de recreação (1, 2, 3) a contaminação esteve presente em 33,8 % (n = 48) amostras.

Entre todas as áreas, os parasitos mais frequentemente identificados foram: ovos da família Ancylostomatidae (77 %), seguido de ovos de *Ascaris* spp. (47,9 %) e de *Trichuris* spp. (4,1 %) (Figura 18).

Figura 18: Gráfico do panorama geral da ocorrência de ovos de helmintos encontrados nas áreas públicas destinadas à recreação: 1, 2 e 3 (Praias do litoral Paranaense, Parques Públicos e CMEIs de Curitiba).



5.6 Ações educativas em saúde para educação infantil – creche como ambiente de transmissão de parasitos.

As taxas significativas de contaminação por ovos de HTS evidenciadas nas caixas de areia dos CMEI reforçaram a necessidade de uma intervenção educativa em saúde no ambiente escolar, como instrumento de prevenção a parasitoses na infância. Diante do papel das creches como fontes de transmissão de parasitos em crianças em idade escolar, as atividades visaram informar e educar os escolares e funcionários acerca dos hábitos de higiene e o papel da lavagem das mãos no controle das infecções, com ênfase na rota fecal - oral (Figura 19).

A atividade teve ampla adesão dos alunos e bom reflexo no cotidiano escolar, gerando mudanças positivas nos hábitos de higiene dos escolares, que se sentiram motivados e responsabilizadas em relação à prevenção de parasitoses intestinais no ambiente do CMEI. As professoras que estavam familiarizadas com o assunto aprovaram a abordagem e recordaram os conhecimentos a respeito das parasitoses.

Figura 19: Ação de Educação em saúde para alunos da Educação Infantil: Explicação lúdica sobre doenças causadas por HTS (A, B); Atividade de lavagem correta das mãos (C); Alunos participando da atividade “Caça as Parasitoses”; (D) Orientação passada aos alunos sobre o risco de se infectar com ovos de helmintos nas caixas de areia (E); Finalização das atividades: recebimento de medalha “guardião das parasitoses”.



Fotos: A autora, 2019.

6. DISCUSSÃO

6.1 Padronização de metodologias para detecção de ovos de helmintos em diferentes matrizes arenosas.

A identificação de formas parasitárias em matrizes ambientais é uma etapa crítica para determinação dos riscos potenciais de infecção e controle de doenças parasitárias intestinais (Smith, 1999). Neste contexto, o presente estudo representa uma importante contribuição para a análise da contaminação ambiental de diferentes matrizes de solo arenoso por ovos de Helmintos Transmitidos pelo Solo (HTS) em áreas de recreação, visto que, a padronização de protocolos foi avaliada mediante ensaios de contaminação artificial, considerando que o solo é um elo relevante na dinâmica de transmissão dos HTS.

As áreas de recreação como *playgrounds* e areia de praia apresentam diferentes composições arenosas: sabe-se que a textura e a profundidade desse tipo de solo podem fornecer condições ideais para o desenvolvimento de formas parasitárias no ambiente (Wang et al., 2011). A característica geológica de solos arenosos possibilita a retenção de água, fornecendo aeração e umidade para o embrionamento dos ovos, além disso, por serem menos compactos, permitem que as larvas migrem verticalmente, facilitando a disseminação de agentes etiológicos como os causadores de Larva *Migrans* Cutânea (Paller et al., 2014; Etewa et al., 2016).

De acordo com Landa Cansigno et al., (2013) a retenção de organismos é afetada pelo componente mineral do solo (argila, areia) presente na matriz em análise. Ao avaliar o potencial hidrofóbico dos ovos de *Ascaris suum*, Capizzi e Schwartzbrod, (2001), observaram que os ovos suspensos na fase líquida da amostra migram em direção a matéria orgânica não polar do solo, resultando na adesão a superfície silicosa

da areia ou na fração orgânica por interações hidrofóbicas. Além disso, alterações nas cargas superficiais desses ovos podem modificar as propriedades supracitadas.

Previamente ao monitoramento ambiental da ocorrência de ovos de HTS em áreas de recreação (Litoral, Parques Públicos e CMEI), um planejamento estratégico foi proposto, considerando as particularidades de cada ponto de coleta, desde a etapa de amostragem, composição de cada solo e o método utilizado para identificação das formas parasitárias. Alguns estudos recomendam a análise granulométrica das matrizes arenosas a serem avaliadas (Nunes et al.,1994). Desta forma, no presente estudo, tal aferição foi realizada em cada matriz arenosa previamente à realização dos ensaios de contaminação artificial para determinar a metodologia ideal a ser padronizada para a detecção de ovos de HTS nessas áreas.

As matrizes arenosas utilizadas como modelo em nossos ensaios foram compostas predominantemente por areia grossa (200 a 2000 μm). A análise granulométrica evidenciou uma pequena proporção de argila ($\leq 2 \mu\text{m}$) e a ausência de silte na composição total da areia de praia. Enquanto que para o solo dos CMEI e Parques Públicos diferiram na distribuição da areia total, (grossa / fina - 200 a 50 μm) e apresentaram uma maior proporção de silte (50 a 2 μm) e argila, ocorrendo de forma equivalente nas duas matrizes (Sistema Brasileiro de Classificação de Solos – Embrapa, 2013).

Os métodos de detecção adotados na rotina clínica são amplamente empregados para a pesquisa de ovos de helmintos em amostras ambientais, sobretudo em areia de praia (Quadro 1). A ausência de etapas como o emprego da dissociação nestes métodos convencionais parasitológicos dificulta a visualização e identificação dos ovos, podendo gerar diagnósticos errôneos ou falso-negativos, subestimando assim o real grau de contaminação dessas matrizes (Collender et al., 2015).

A forte ligação exibida pelos ovos de HTS a partículas presentes no solo reforça a necessidade de uma metodologia robusta para o isolamento e detecção de ovos de helmintos (Smith, 1999). Neste contexto, Amoah et al., (2017) indicam a inclusão de soluções extratoras adequadas, bem como procedimentos de purificação e concentração combinados, que poderão resultar em análises mais fidedignas acerca da contaminação ambiental por HTS.

Estudos de validação de técnicas abordam diferentes estratégias para determinar a eficiência de extração de ovos em amostras ambientais. No que concerne aos solos, a eficácia das técnicas é afetada pela sua composição heterogênea da matriz em análise, além de outros fatores como capacidade de aderência dos ovos as partículas. Portanto, diferenças nas propriedades físico-químicas das superfícies dos ovos podem exigir ajustes nos métodos, sobretudo na escolha de materiais e reagentes adequados (Ajala et al., 1995; Cranston et al., 2016; Kleine et al., 2016). Diante disso, no presente estudo, foi determinada a eficiência de recuperação de ovos de HTS mediante análise de variáveis consideradas críticas para extração de ovos, como: homogeneização, dissociação química e flutuação.

As etapas de homogeneização e aplicação da solução de dispersão são essenciais para otimização da eficiência da metodologia, visto que durante essa fase ocorre a desagregação dos ovos das partículas de solo (Collender et al., 2015; Amoah et al., 2017). No presente estudo o emprego do aparelho vórtex resultou em melhor aplicabilidade e maiores taxas de recuperação nos diferentes tipos de solo, em comparação a homogeneização sob agitador magnético.

A homogeneização utilizando agitador magnético resultou em menor recuperação de ovos em ambas metodologias propostas para as três áreas arenosas

analisadas. Esse fato também pode ser atribuído à etapa de transferência do material do béquer para o tubo Falcon, onde pode haver a perda de ovos ou ainda a aderência dos mesmos ao vidro do recipiente ou ao imã (Apêndice A 1).

Com o intuito de minimizar estas perdas durante o processamento das amostras, algumas etapas chaves da metodologia foram adaptadas. A velocidade de centrifugação (1.250 g x 5 minutos) foi determinada após avaliação da presença ou não de ovos no sobrenadante, retirado após cinco minutos de sedimentação. Além disso, em conformidade a recomendações de alguns autores, os materiais foram previamente tratados com solução de Tween 80[®] 0,1%, para reduzir a aderência dos ovos nas paredes de tubos ou vidros (Kleine et al., (2016). Mesmo assim, as menores taxas de recuperação de ovos foram verificadas em protocolos em que se utilizou a homogeneização por agitador magnético, independente da solução de dispersão utilizada.

A solução de dissociação empregada pode alterar a aderência dos ovos, sendo que os surfactantes são utilizados como agentes dispersantes e responsáveis pela quebra de ligações físico-químicas entre as partículas e a superfície dos ovos (Loh e Israf, 1998; Amoah et al., 2017). As soluções mais comumente utilizadas em amostras ambientais (solos, lodos e hortaliças) para recuperação de ovos são Tween[™] 80, Triton[™] X - 100 e ICN 7X[®] sob diferentes concentrações. Entretanto, Gaspard et al. (1996), pontuam que para garantir a integridade dos ovos deve ser utilizada soluções que apresentem baixas concentrações de cada um dos reagentes. Tendo isso em vista, optou-se pela padronização da concentração de 0,1% para todas as soluções.

A etapa de dissociação química foi determinante para a recuperação de ovos em nossos ensaios, assim como relatado por Steinbaum et al. (2017), a eficiência de

recuperação dos protocolos foi aperfeiçoada com o uso dessas soluções. Alguns estudos relatam o detergente ICN 7X[®] como o mais eficiente para uso em amostras ambientais, como análise das mãos e bio-sólidos (Jeandron et al., 2014; Steinbaum et al., 2017; Ravindran et al., 2019).

Entretanto, nossos resultados em areia de praia se mostraram mais promissores ao utilizar glicina (1M, pH 5,5). Além de proporcionar maiores recuperações, o uso do aminoácido como líquido extrator, facilitou a visualização ao microscópio por não formar bolhas como as outras soluções (Apêndice 2 B). O ácido aminoacético (1M, pH 5,5) apresenta características apolares e, tem sido empregado como líquido de lavagem na etapa de dissociação de formas parasitárias em amostras de hortaliças e framboesas, por alterar a aderência dos organismos pela redução da tensão superficial da solução aquosa (Cook et al., 2006; Lalonde e Gajadhar, 2016; Matosinhos et al., 2016).

Já nos ensaios com solo de parques e CMEI com maior composição de argila e silte obteve-se maiores recuperações ao utilizar o surfactante aniônico Triton[™] X-100. A dificuldade de visualização trazida pelas bolhas foi contornada com a adição de uma etapa de enxágue com água destilada e posterior centrifugação. Além disso, a combinação de centrífugo-flutuação a flutuação sequencial, adotada nestas matrizes auxiliou na purificação da amostra e no impacto trazido pela argila e silte, como descrito por Kazacos (1983) proporcionando maior recuperação de ovos.

Usualmente, a etapa de flutuação é realizada com soluções de sacarose ou de sais metálicos, com densidades superiores aos ovos de helmintos, para que haja separação das partículas mais pesadas do solo. Tendo isso em vista e a gravidade específica do modelo de HTS utilizado em nossos ensaios (*Ascaris suum* - 1,13 g/cm³), adotou-se como solução de flutuação a sacarose – densidade de 1,24 g/cm³.

Em adição, David e Lindquist (1982) reforçam que soluções que apresentam altas densidades, podem distorcer a morfologia dos ovos ou ainda favorecer a flutuação de detritos, afetando a leitura da amostra e, destacam que a densidade de 1,25 g/cm³ propicia a detecção de grande parte de ovos de diferentes gêneros de HTS, como observado no presente estudo: em condições naturais de contaminação foi possível detectar os ovos da família Ancylostomatidae, *Ascaris* sp., e *Trichuris* spp., utilizando o método padronizado.

Todavia, Quin et al., (1980) ressaltam que as propriedades físico-químicas da solução, são tão importantes quanto a densidade adotada no método. O sulfato de zinco (ZnSO₄) é amplamente utilizado em métodos de detecção de ovos de helmintos em amostras ambientais, no entanto, o manuseio do sal e da solução exige cuidados, visto que o zinco (Zn) por ser tóxico e necessitar de descarte seguro (Steinbaum et al., 2017). Santarém et al., 2009 obteve as melhores taxas de recuperação de ovos ao utilizar soluções de (ZnSO₄) com densidade de 1,20 g/cm³, no entanto, assim como em nossos ensaios pilotos, observou a rápida cristalização da amostra, impedindo ou inviabilizando a visualização dos ovos.

Ao avaliar a ação de sete soluções de flutuação com gravidades específicas variando de 1,20 g/cm³ a 1,35 g/cm³, De Ybáñez et al. (2001) obtiveram as melhores taxas de recuperação utilizando sacarose (1,27 g/cm³). No presente estudo, optou-se pelo uso de sacarose pelo custo benefício e ausência de risco do produto. Deve-se mencionar que alguns autores ressaltam que é necessário adicionar antimicrobianos à solução, visto que o crescimento bacteriano é favorecido com a utilização de solução de sacarose (Collender et al., 2015).

A sacarose é um produto viscoso, por esta razão, Kazacos (1993), indica que o tempo de flutuação para soluções com essa característica, seja de no mínimo 20

minutos. Tendo isso em vista, no presente estudo padronizou-se o tempo de 40 minutos para flutuação e 30 minutos para os ensaios que incluíam centrífugo-flutuação, seguida de flutuações sequenciais.

Embora sejam pouco adotadas, as flutuações sequenciais são indicadas para promover maior recuperação de ovos presos entre as partículas, como relatado por Quinn et al. (1980) que obtiveram um adicional de 10 a 20% de recuperação de ovos. A mesma situação foi observada por Zenner et al. (2002) ao adotar sucessivas centrifugações em sua metodologia e, determinando o limiar de detecção em 4 lâminas. Outros autores observaram que pelo menos 3 lâminas devem ser efetuadas para melhor eficiência de recuperação dos ovos (Xavier et al., 2010).

No presente estudo, se adotou a flutuação sequencial com quatro leituras a cada 30 (área 2 e 3) e 40 (área 1) minutos, totalizando 16 lâminas por amostra analisada em condição natural de contaminação, representando um incremento na recuperação de ovos em ambas as metodologias padronizadas. Durante os ensaios de contaminação artificial, observou-se um maior número de ovos na primeira flutuação e um adicional de 3,3 % a 17, 8% de detecção de ovos nas flutuações sequenciais seguintes. Esse fato pode ser determinante em condições naturais de contaminação, onde a concentração de ovos presente no solo é menor e, portanto, mais desafiadora.

Os métodos convencionais de microscopia exigem experiência por parte do laboratorista na leitura e revisão das lâminas de amostras ambientais (Amoah et al., 2018), devendo distinguir os diferentes tipos de ovos, possíveis alterações ambientais e diferenciá-los de detritos, artefatos ou outros organismos interferentes presentes no ambiente. Outro desafio desse tipo de análise consiste no pequeno número de estudos que forneçam orientações, como por exemplo, pranchas para a identificação correta de ovos de HTS no solo e amostras ambientais (Steinbaum et al., 2017).

As técnicas moleculares podem auxiliar neste tipo de análise, uma vez que estes métodos apresentam boa sensibilidade de detecção. Contudo, demandam financiamento e capacitação técnica, muitas vezes apresentando custo proibitivo para adoção na análise de rotina de amostras ambientais (solos) em áreas endêmicas de países em desenvolvimento (Collender et al., 2015; Steinbaum et al., 2017).

Entre as proposições indicadas para o monitoramento ambiental da qualidade das praias, métodos acessíveis, realizados em larga escala, que fornecem resultados em curto período de tempo, e passíveis de adoção na rotina de agências ambientais são os mais indicados (Solo Gabriele et al., 2016). Os métodos padronizados no presente estudo exibiram boa sensibilidade quando consideradas as taxas de recuperação obtidas em experimentos controle nas diferentes matrizes arenosas e boa aplicabilidade, visto que também foram capazes de recuperar ovos em situação natural de contaminação em todas as áreas arenosas analisadas. Além disso, envolvem materiais de baixo custo, equipamentos básicos de laboratório e curto tempo de execução.

Vale ressaltar que a recuperação de ovos de HTS a partir de amostras de solo representa um grande desafio visto que inexistente um padrão ou metodologia preconizada por agências de proteção ambientais para averiguar o controle de qualidade analítica acerca de sua detecção em solos, ou mesmo uma ISO validada. Portanto, os dados apresentados são relevantes no âmbito do setor ambiental, uma vez que poderão ser replicados pelo setor público e privados. Estes resultados foram discutidos e repassados ao IAP, onde a metodologia, assim como os resultados referentes à contaminação ambiental por HTS, poderá preencher uma lacuna ao atender a recomendação do artigo 8º, presente na resolução CONAMA nº 274 / 2000 que indica futuras padronizações para avaliação das condições parasitológicas da areia de praia.

6.2 Monitoramento da qualidade sanitária do litoral paranaense

A orla da praia propicia aos banhistas uma série de experiências recreativas à beira mar. Estudos que avaliam os efeitos à saúde derivados da exposição a areia de praia têm demonstrado cada vez mais, seu papel significativo na dispersão de organismos potencialmente patogênicos (Phillips et al., 2011; Heaney et al., 2014). Conhecer os riscos potenciais relativos à aquisição e/ou eventual contato com patógenos nas praias é essencial para o gerenciamento da orla e para o aconselhamento dos banhistas, visando a adoção de medidas profiláticas (Steffen, 2017; Hitch, 2019).

O presente estudo é o primeiro a monitorar a ocorrência de ovos de helmintos em areias de praias do litoral do Paraná por um período de dois anos. Em todas as praias monitoradas foi observada a presença de algum gênero de HTS e, a frequência de contaminação nos três pontos analisados foi de 12,5 %. A literatura descreve diferentes níveis de contaminação por HTS em areia de praia, que variam de 0% a 83,7%. Entretanto, realizar a comparação dos resultados pode ser um processo complexo uma vez que cada estudo adota uma estratégia metodológica e as condições socioambientais e sanitárias das praias apresentam diferenças significativas (Dunsmore et al., 1984; Neto et al., 2017). A contaminação do solo por ovos de HTS em praças e parques públicos de centros urbanos é amplamente abordada, no entanto, os estudos em areia de praia ainda permanecem limitados e escassos (Rocha et al., 2011; Shah et al., 2011).

Características inerentes a esses locais adicionam dificuldade ao monitoramento e confirmação da contaminação por HTS e outros patógenos, resultando muitas vezes, em menores taxas de contaminação. Entre estas, destacam-se o ambiente aberto, o que expõe os ovos presentes na areia diretamente a intempéries ambientais, tornando-os suscetíveis a ação do sol, vento, maré e salinidade (Matesco et al., 2006). Além disso, um dos grandes desafios desse tipo de análise, verificado também em nosso

estudo, consiste na dispersão ambiental dos ovos na amostragem, uma vez que a orla marítima apresenta uma grande extensão - 15 km na praia de Guaratuba (Ponto 1) e 19 km em Matinhos (Ponto 2 e Ponto 3). Ressalte-se que apenas um quadrante, posicionado sempre no mesmo local da praia, foi monitorado e que, apenas 20g / praia foram analisados mensalmente.

A dispersão e prevalência de ovos na areia da praia são influenciadas pelas condições sazonais e climáticas, onde fatores como ventos, precipitação e temperatura são apontados como os mais relevantes relacionados com a ocorrência de HTS (Paquet-Durant et al., 2007). No presente estudo, 44 % das amostras positivas para ovos de helmintos foram detectados durante o outono. Nessa mesma estação para o primeiro ano de monitoramento (2017) foram detectados os maiores índices de contaminação por *Enterococcus* spp. De acordo com o SIMEPAR (Sistema de Tecnologia e Monitoramento Ambiental do Paraná), no litoral paranaense essa estação é marcada por temperaturas que variam de 15 a 26 °C e pela redução das chuvas. Esses fatores podem justificar as maiores contaminações verificadas nesta estação do ano pela redução da dessecação dos ovos promovida por exposição constante à radiação solar e do seu carreamento e lavagem pela chuva para a água do mar (Dunsmore et al., 1984; Mizgajska, 1997).

Poucos estudos avaliaram a sazonalidade da ocorrência de ovos de helmintos em areia de praia: autores relatam maiores frequências de contaminação durante o inverno e associaram a positividade das amostras às características climáticas da estação (Matesco et al., 2006; Amaral et al., 2015). No entanto, associações entre a ocorrência de HTS e períodos chuvosos, maré alta e sazonalidade, ainda não estão bem esclarecidas devido à escassez de dados na literatura em areia de praia. Rocha et al. (2011) apontam maior

contaminação após períodos chuvosos e Manjarrez-Paba et al., (2017) a estações de maior atividade turística, ou períodos pós feriados.

Em relação aos indicadores bacteriológicos de contaminação fecal, os relatórios da qualidade das praias litorâneas emitidos pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB, 2020) descrevem aumento de sua densidade durante a alta temporada, e que em algumas regiões, a areia seca apresenta-se mais contaminada que a água do mar. Entretanto, também não há uma consistência de dados na literatura sobre a distribuição de organismos em areia e sua relação com o teor de umidade (Whitman et al., 2014; Solo Gabriele., 2016).

Os resultados obtidos na análise microbiológica das areias de praias do presente estudo, evidenciaram altas densidades de *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp. em alguns meses de amostragem denotando má qualidade sanitária. Assim como para HTS, inexistente uma legislação nacional que indique a pesquisa de indicadores bacteriológicos de contaminação fecal em amostras de areia, representando outra importante limitação em saúde pública, especialmente quando se considera que os frequentadores de áreas costeiras passam a maior parte do tempo na areia da praia (De Florio-Barker et al., 2018).

A qualidade microbiológica da areia está intimamente relacionada à condição sanitária das praias, sendo o processo de contaminação por bactérias indicadoras, dinâmico e sua concentração variável e alterada muitas vezes devido ao acúmulo de microrganismos em algas marinhas, detritos plásticos e até mesmo bioaerossóis (Keswani et al., 2016; Weiskerger et al., 2019). Além disso, a formação de biofilmes em areia de praia, também fornece proteção à uma diversidade de espécies de patógenos presentes nestes locais (Byappanahalli et al., 2009; Sabino et al., 2014).

O gênero *Enterococcus* apresentou as maiores concentrações nas areias das praias paranaenses neste estudo; isso pode estar relacionado à sua tolerância a condições extremas, como a salinidade e temperatura. Esse grupo apresenta adaptabilidade a diferentes ambientes, sendo que um dos principais fatores limitantes à sua sobrevivência e persistência ambiental, relaciona-se à frequência e intensidade de exposição à luz solar (UV) (Halliday e Gast, 2011).

A frequência de radiação solar e o período de marés afetam diretamente os níveis microbianos, tanto na areia quanto na água do mar. Isso por que, a praia apresenta diferentes zonas com dinâmicas características que podem ou não favorecer o crescimento microbiano. Zonas entre marés, onde as interações entre a água e areia são mais fortes, permitem constante troca de material particulado, contribuindo para que patógenos acumulados na areia sejam liberados para coluna de água, impactando diretamente a qualidade da água (Phillips et al., 2011; Pinto et al., 2011).

Os eventos de maré alta (enchente) no litoral do Paraná apresentam-se com ondas que atingem casas e comércios, causando grandes inundações e estragos nas cidades (Apêndice B 1). Durante o monitoramento foi possível observar os efeitos da mudança no nível do mar sobre a conformação da areia da praia, sobretudo na praia de Guaratuba (Ponto 1), onde a faixa de areia é menor, e, portanto, sofre maior impacto. Esse fato pode estar associado as baixas concentrações de bactérias encontradas neste ponto de coleta, uma vez que podem ser carreadas para o mar (Phillips et al., 2011; Weiskerger et al., 2019).

A ocorrência de um indicador biológico de contaminação fecal humana, como ovos de *Ascaris* spp. evidencia a emissão de efluentes e a presença de fezes humanas diretamente na areia de praia (Rocha et al., 2011). É importante mencionar que embora os municípios incluídos no estudo apresentem índices de saneamento superiores a

demais cidades costeiras brasileiras (Figura 1 – Tabela 2), é recorrente a presença de línguas negras ao longo da faixa de areia. Outro fator a se considerar é a localização dos pontos de coleta, próximos a rios e canais que desembocam na areia da praia e seguem para o mar, sendo este um fator de risco para os banhistas que ali circulam (Apêndice B 2).

Um estudo realizado por Seguí et al., (2018) na baía de Paranaguá, região que inclui um conjunto de ilhas e compõe a área rural do litoral paranaense, caracterizou a prevalência de parasitos intestinais em habitantes autóctones da região. Entre a população analisada, verificou-se que 46,1% apresentava pelo menos um parasito intestinal, observando preponderância de protozoários (42%) em relação ao parasitismo por helmintos (10%).

A diarreia é uma manifestação comum de doenças infecciosas intestinais e tem sido associada a viagens a países em desenvolvimento, sendo este um dos indicadores de saúde e ambiente (Steffen, 2017). Dados relativos ao município de Guaratuba indicam que cerca de 35 habitantes são hospitalizados em decorrência da diarreia por ano (IBGE, 2010). No entanto, esses valores são subnotificados, uma vez que muitas dessas infecções, inclusive por enteroparasitoses, costumam receber tratamentos caseiros, e muitas vezes são autolimitantes e, portanto, sem necessitar de internação, não sendo computadas em estatísticas oficiais em secretarias de saúde (Façanha e Pinheiro, 2005)

A contaminação ambiental da areia de praia é associada a diversas infecções parasitárias, sobretudo as dermatoses causadas por ancilostomatídeos (*Larva Migrans Cutânea*), apresentando relevância em saúde pública, especialmente para turistas que regressam de regiões costeiras tropicais e subtropicais endêmicas, jogadores de futebol e

vôlei de praia, surfistas, trabalhadores rurais e crianças que costumam brincar na areia (Veraldi e Persico, 2006; Wilson et al., 2014; Sow et al., 2017).

Em nossas análises, os ovos da família Ancylostomatidae foram os HTS mais prevalentes, ocorrendo em 55,5 % das amostras positivas de areia. A ocorrência de parasitos zoonóticos reforça o papel das fezes de animais como fator relevante das condições sanitárias do litoral, bem como o risco potencial de aquisição destas parasitoses, especialmente em crianças (Amaral et al., 2015).

As amostras de fezes presentes em areia podem conter milhares de formas parasitárias, onde a movimentação constante e a ação mecânica do pisoteio por pessoas e animais favorece a desintegração do material fecal e mistura com a areia. Aliado a este fato, as variáveis ambientais (chuva, vento e maré) e o transporte por vetores mecânicos, ampliam a dispersão dos ovos pela orla da praia (Mizgajska, 1997; Matesco et al., 2006).

No presente estudo, as amostras de fezes foram encontradas principalmente na areia da praia de Matinhos (Ponto 3); somente uma amostra foi adquirida em Caiobá (Ponto 2), sendo detectado um percentual de 63,1% (n = 12) amostras positivas para ovos de HTS, entre eles, *Toxocara* spp., *Trichuris* spp. e da família Ancylostomatidae. A maior ocorrência de fezes de animais na praia de Matinhos está relacionada à presença de residências na faixa de areia e, portanto, a orla da praia funciona como um peridomicílio de livre circulação para os animais domésticos que habitam estes locais.

O diagnóstico parasitológico e a identificação de ovos nas fezes, bem como a análise morfométrica de ovos do gênero *Trichuris* pode sugerir seu respectivo hospedeiro (Garcia-Sanchez et al., 2019). O tamanho dos ovos é utilizado como condição para indicar a origem da infecção: *Trichuris vulpis* que tem os canídeos como

principais hospedeiros, tem sido isolado de amostras fecais humanas, sugerindo potencial transmissão zoonótica (Areekul et al., 2010; Márquez Navarro et al., 2012).

A prevalência de formas parasitárias em amostras fecais presentes em areia de praias tem sido utilizada para determinar as condições sanitárias do litoral de forma indireta ou complementar (Scaini et al., 2003; Bricarello et al., 2018). Estudos como estes exibiram frequências de contaminação que variou de 43,2% a 86% de parasitos em amostras fecais e, apontam alta prevalência de ancilostomatídeos que corroboram com nossos resultados. Além disso, no presente estudo foi demonstrado o risco potencial de aquisição de outras helmintoses de caráter zoonótico como Larva *Migrans* Visceral (LMV) provocada por *Toxocara* spp. especialmente para crianças que ficam na faixa de areia por um longo período (Scaini et al 2003; Blazius et al 2006; Bricarello et al 2018).

A ingestão acidental de ovos embrionados de *Toxocara* spp. presentes no ambiente também é responsável por comprometer o sistema nervoso causando distúrbios neurológicos (neurotoxocaríase) ou ainda deficiência visual (Larva *Migrans* Ocular) em virtude do tropismo apresentado pelas larvas do verme no indivíduo infectado (Aziz et al., 2019). Estima-se que aproximadamente 19% da população mundial seja soropositiva para *Toxocara* spp., especialmente em regiões quentes e úmidas que dispõe de características climáticas ideais para manutenção da transmissão (Gamboa, 2005; Rostami et al., 2019). Além disso, esses índices estão ligados a contaminação ambiental e ao contato íntimo com animais (Fajutag et al., 2013).

A taxa de contaminação ambiental por ovos de helmintos também está diretamente relacionada com a frequência em que as fezes são removidas pelos donos de animais domésticos, especialmente os cães (Morgan et al., 2013; Traversa et al., 2014). De fato, a presença de animais e os maus hábitos de seus donos, pode

representar um importante elo de transmissão de doenças zoonóticas, promovendo também a perpetuação de infecções cíclicas entre os animais que ali circulam (Otero et al., 2018; Fakhri et al., 2018; Simonato et al., 2019).

As estratégias de controle de doenças parasitárias de caráter zoonótico incluem a conscientização dos donos de cães e gatos a respeito da desparasitação e coleta de dejetos imediato impedindo o desenvolvimento de larvas filarióides quer seja no solo ou interior dos ovos (Sauda et al., 2019). Além disso, algumas precauções devem ser tomadas ao frequentar áreas endêmicas, praias, parques e quadras esportivas de areia: recomenda-se o uso de calçados e espreguiçadeiras ou similares para evitar o contato direto com o solo contaminado (Sow et al., 2017).

No litoral do Paraná, desde 2017, a SANEPAR tem adotado o revolvimento mecânico da areia de praia como alternativa para higienização da orla. A eficiência do método está associada a exposição dos microrganismos presentes na areia a luz solar, como estratégia de inativação ou mesmo remoção e, tem sido comprovada através de análises microbiológicas realizadas pelo Instituto Ambiental do Paraná. Em relação aos ovos de helmintos, estudos futuros devem ser realizados para verificar se este revolvimento poderia ter ação sobre este tipo de contaminação, considerando que a parte mais profunda da areia garante proteção a intempéries e umidade aos ovos de HTS, favorecendo o desenvolvimento larval (Pedrosa et al., 2014).

O ecossistema da praia constitui um mosaico dinâmico entre água do mar e areia, entretanto, as políticas de gestão costeira são obsoletas, especialmente no tocante a caracterização das condições sanitárias do litoral, visto que ao restringir a pesquisa microbiológica a água do mar, cria-se uma lacuna em saúde pública, uma vez que a

areia representa um potencial reservatório de uma grande variedade de microrganismos, inclusive com potencial patogênico (Shibata et al. 2004; Weiskerger et al., 2019).

Diante da importância da detecção e quantificação de indicadores de contaminação fecal em areias de praias, fica evidente a necessidade de proposição de uma legislação que padronize os limites recomendados para monitoramento da qualidade sanitária da areia. Desta forma, devido à inexistência de uma legislação nacional e internacional, ao comparar os dados obtidos neste estudo aos limites propostos para águas de recreação pela resolução brasileira para qualidade e balneabilidade da água do CONAMA N° 274/00, todos os pontos, em algum momento, foram considerados impróprios para fins recreacionais (Brasil, 2000).

6.3 Ocorrência de ovos de helmintos em solos arenosos de áreas de recreação infantil

A contaminação de áreas de recreação merece atenção, visto que estes locais apresentam intensa circulação de pessoas de todas as idades, sobretudo crianças, atraídas por atividades de lazer. No presente estudo, uma taxa de contaminação por ovos de HTS de 55,7 % (n = 39 amostras positivas) foi evidenciada em caixas de areia de CMEI e Parques Públicos de Curitiba, utilizando o método de detecção padronizado na primeira etapa do estudo.

Na literatura a frequência de contaminação do solo por HTS em áreas públicas, especialmente de áreas urbanas ou rurais, varia de 0% a 70% em todo o mundo. Na Argentina, Bojanich et al., (2015), atrelaram a negatividade de ovos nas amostras analisadas às características ambientais da área estudada, enquanto na Filipinas, Horiuchi et al. (2013) associaram os altos índices de contaminação a variáveis propícias à contaminação, como as condições ambientais e socioeconômicas deficitárias da

população e do saneamento ambiental. A comparação das taxas de prevalências de contaminações para estas áreas arenosas, também pode ser considerada um desafio, por compartilhar as mesmas influências epidemiológicas e metodológicas verificadas em estudos de praias, entretanto, são importantes por revelar os riscos potenciais de aquisição de helmintoses transmitidas pelo solo a que a população está exposta (Fakhri et al., 2018).

Com o aumento da urbanização e da população de animais de companhia, locais públicos emergem como um ambiente de caminhada, socialização e de trânsito livre de animais (Ducan et al., 2020). Ainda que forneçam benefícios, esses ambientes são fontes de disseminação de patógenos tanto para outros animais quanto para o ser humano (Savadelis et al., 2019; Paliy et al., 2019).

Os parques públicos de Curitiba exibiram uma frequência de contaminação por ovos de helmintos de 45%. Ovos da família Ancylostomatidae foram detectados com maior frequência, sendo observados em 77,7 % das amostras positivas (n = 14 / 18). Em virtude da ausência de barreiras, as áreas públicas constituem um potencial local de defecação e livre acesso de animais, sendo recorrente a contaminação por parasitos zoonóticos nestes locais (Pacheco-Ortega et al., 2019). Embora em todas as coletas deste estudo tenha sido visto algum animal nos parques, nenhuma amostra de fezes foi encontrada nas proximidades dos pontos de coleta (caixas de areia de *playgrounds*).

Nos CMEI, as caixas de areia exibiram altos índices de contaminação: taxa de 70 % (n = 21 amostras positivas de 30). No Ponto 4a, 100% das amostras coletadas apresentaram contaminação por ovos de HTS, sobretudo *Ascaris* spp., que esteve presente em 90 % (n = 9) das amostras analisadas. Ao discutir esses dados com a diretora responsável pela instituição, foi relatada a entrada de moradores de rua no

CMEI durante o recesso escolar. Tendo isso em vista, e que *Ascaris lumbricoides* é um indicador de contaminação fecal oriundo de humanos, o uso destas instalações por desabrigados durante as férias de dezembro (2018) justificam as elevadas taxas de contaminação por ovos deste HTS, permitindo inferência de que estes defecaram naquele ambiente.

Poucos estudos avaliaram a prevalência de parasitos intestinais em moradores de rua. No Rio de Janeiro um índice de 63,4% de positividade foi evidenciado, sendo *A. lumbricoides* a espécie mais prevalente entre os parasitos detectados (Gomes et al., 2002). No Peru, Bailey et al. (2013) observaram um percentual de infecção parasitária de 66,3 % em crianças que passam a maior parte do tempo na rua e, apenas retornam aos orfanatos para repouso. Em ambos os estudos as prevalências estiveram atreladas as condições de higiene e ao acesso limitado a infraestrutura básica de saneamento (*WASH*), já que muitos defecam a céu aberto durante o deslocamento, contribuindo assim para contaminação de logradouros públicos.

Esse dado é ainda mais alarmante, quando se constata que a contaminação permaneceu durante os 10 meses de monitoramento nos CMEI analisados no presente estudo. Na primeira coleta (Fevereiro / 2019), observou-se uma alta concentração de ovos de *Ascaris* spp., cerca de 4,25 ovos / g - (85 ovos / 20 g) de areia. No mês de maio ocorreu a troca de areia no ponto 4b e não foram observados ovos de helmintos, no entanto, no mês subsequente, ovos de HTS voltaram a ser identificados. Cabe salientar que os altos níveis de contaminação identificados nas áreas destinadas à recreação em CMEI, são ainda mais preocupantes se considerarmos a população infantil que ali circula diariamente, devido aos seus hábitos higiênicos e sistema imunológico ainda em maturação (Darlan et al., 2019) (Apêndice 2 C).

A intensa interação com a areia durante atividades recreacionais causa o acúmulo de partículas nos pés e nas mãos e está diretamente relacionada à taxa de ingestão de solo e à geofagia (Calabrese et al., 1988). Em virtude do comportamento de levar as mãos frequentemente à boca, as crianças chegam a ingerir em média uma taxa de 40 mg de solo por dia (Tsou et al., 2018). Ao avaliar as propriedades de aderência dos ovos, Kleine et al. (2016) apontam a capacidade de adesão dos ovos a brinquedos de plástico que são amplamente usados em *playgrounds* ou praia.

Estudos de soropidemiologia de *Toxocara* spp. associam as taxas de positividade a contaminação ambiental e ao contato íntimo com animais. Em virtude do contato constante com os cães e atividades recreativas praticadas em ambientes externos como caixas de areia, as crianças compõem o grupo de maior risco de aquisição da toxocaríase humana ou Larva *Migrans* Visceral (Mattia et al., 2012; Fajutag et al., 2013).

Ovos da família Ancylostomatidae ocorreram em 85,7 % (n = 18 / 30) das amostras provenientes das caixas de areia dos CMEI. Os gatos são apontados como os principais responsáveis pela disseminação de parasitos zoonóticos em ambientes fechados, dada a capacidade de entrar nestes ambientes mesmo com barreiras físicas (Araújo et al., 2000). As creches apresentam proteção para entrada de animais, no entanto, os profissionais do CMEI relataram a circulação de cães durante a entrada e saída dos alunos, além disso, durante a coleta foi possível registrar a presença de gatos no muro de um dos pontos de amostragem, sendo estes hospedeiros naturais das respectivas espécies *Ancylostoma braziliense* e *A. caninum* (Apêndice 1 C).

As prevalências de parasitos intestinais em escolares têm sido amplamente avaliadas, resultando em variáveis frequências de infecção: 45% no nordeste do Brasil

(De Amorim Santos et al., 2020), 75 % em Guarapuava / PR (Buschini et al., 2007) e 24,8 % na região metropolitana de Curitiba (Oishi et al., 2019).

Martins-Mello et al., (2017) realizaram um amplo estudo nacional avaliando a taxa de mortalidade registrada nos certificados de óbitos relativa a infecções por HTS de 2000 a 2011, de acordo com dados do Sistema de Informações sobre a Mortalidade do Ministério da Saúde. Dos 853 óbitos atribuídos a HTS, *A. lumbricoides* foi responsável por 827 (97%). Dentre os Estados brasileiros, as maiores taxas de mortalidade por HTS foram evidenciadas no Amazonas, Maranhão, Rio Grande do Norte e no Paraná - o único Estado da Região Sul a apresentar os mesmos índices mais elevados identificados nos estados anteriores - 0.61 a 0.84 de taxa de mortalidade por milhão de habitantes.

Diversas orientações têm sido determinadas para evitar a contaminação da areia especialmente em espaços de recreação infantil, no entanto, esbarram em questões logísticas e burocráticas (Calabrese et al., 1989; Blaszak et al., 2015). No Paraná, a SESA (Secretaria da Saúde do Paraná) dispõe a resolução nº 0162/05, que institui exigências sanitárias padronizadas para os CEIs (Centros de Educação Infantil) do estado. No tópico infraestrutura ambiental, recomenda-se a cobertura da caixa de areia durante o período noturno e manutenção a cada seis meses. Entretanto, as diretorias dos CMEI relatam que essa troca raramente é realizada, uma vez que demanda recursos, muitas vezes limitado.

A troca de areia dos *playgrounds* tem se mostrado insuficiente para o controle da contaminação por ovos de HTS em áreas de recreação. A identificação de fontes pontuais de contaminação deve preceder a troca de areia, para que medidas de controle possam ser adotadas. Além disso, a origem da areia deve ser considerada, dada a possibilidade de contaminação fecal no armazenamento em lojas de materiais de

construção. Desta forma, recomenda-se a detecção de ovos de helmintos no material previamente a troca da caixa de areia (Araújo et al., 2000). A pavimentação dos *playgrounds* ou o revolvimento da areia foram alternativas relatadas pelos responsáveis dos CMEI e recomendadas por autores como Kleine et al., (2017).

Entre as intervenções propostas para o controle ou atenuação de enteropatógenos estão as medidas de higiene e a lavagem regular das mãos, considerada uma medida de saúde pública eficaz e econômica em crianças que frequentam creches. Além disso, a promoção de educação em saúde neste grupo é uma opção interessante, uma vez que estes são agentes de mudança em toda estrutura familiar (Watson et al., 2017).

Os dados acerca da ocorrência de ovos de HTS em matrizes arenosas obtidos no presente estudo demonstram que áreas recreacionais estão sujeitas a diferentes níveis de contaminação antropogênica e zoonótica, e que a oscilação nas frequências de positividade nestes locais se deve a características ambientais e epidemiológicas próprias de cada ambiente (costeiro e urbano). A detecção precisa de ovos de helmintos em amostras ambientais merece atenção visto que são essenciais para determinação dos potenciais riscos de infecção e adoção de estratégias de gestão ambiental, como o monitoramento das condições sanitárias das areias. Além disso, a avaliação da viabilidade dos ovos deve ser adotada em estudos futuros, como informação complementar dos riscos relativos a saúde pública.

7. CONCLUSÕES

1. Os métodos de detecção de ovos de helmintos padronizados neste estudo exibiram boa sensibilidade quando consideradas as taxas de recuperação alcançadas em experimentos controle em diferentes áreas recreativas. Em adição, apresentaram grande aplicabilidade, uma vez que os ovos foram detectados em situação natural de contaminação em todas as áreas arenosas analisadas.
2. As metodologias de investigação de patógenos e rastreamento das fontes de contaminação em áreas arenosas costeiras poderão ser utilizadas pelo Insituto Ambinetal do Paraná / Insituto Água e Terra e, embasar o artigo 8º da Resolução do CONAMA 274/2000 que recomenda aos órgãos ambientais a avaliação das condições parasitológicas e microbiológicas da areia, para futuras padronizações.
3. O monitoramento das areias das principais praias de veraneio do Paraná revelou má qualidade sanitária visto que em todas as praias a contaminação por ovos de HTS ou bactérias indicadoras de contaminação fecal foi detectada. Além disso, este estudo fornece dados importantes ao órgão ambiental competente, visto que somente o monitoramento de bactérias indicadoras é realizado pelo mesmo e, apenas nos meses de verão.
4. A presença de animais especialmente - os domésticos como cães - na orla da praia merece atenção, uma vez que pode representar um risco de aquisição de doenças de carácter zoonótico para a população autóctone e visitante.

5. Reitera-se a necessidade de proposição de uma legislação que contemple a padronização de limites máximos toleráveis e o monitoramento da qualidade da areia de praia, contemplando indicadores bacteriológicos e ovos de HTS visando a qualidade sanitária e a minimização dos riscos à saúde pública.

6. As caixas de areia de parques públicos e CMEI destinadas à recreação na capital paranaense apresentaram expressivas taxas de contaminação por HTS. Estes dados são preocupantes, visto que um grande contingente de população em idade pediátrica frequenta estes locais. Além disso, denotam a importância de adoção de intervenções como medidas de controle da contaminação e a necessidade de instauração de controle de qualidade das areias utilizadas em *playgrounds*, visto que estes espaços estão continuamente sujeitos à contaminação, especialmente de origem biológica.

REFERÊNCIAS

- Ajala, M. O.; Asaolu, S. O. Efficiency of the salt flotation technique in the recovery of *Ascaris lumbricoides* eggs from the soil. **Journal of helminthology**, v. 69, n. 1, p. 1-5, 1995.
- Alm, E. W.; Daniels-Witt, Q. R.; Learman, D. R.; Ryu, H.; Jordan, D.W.; Gehring, T. M.; Domingo, J. S. Potential for gulls to transport bacteria from human waste sites to beaches **Science of the Total Environment**, v. 615, p. 123–130, 2018.
- Amaral, L. S.; Duarte, A. N.; Silva, V. L.; Pinna, L. C. L.; Sotero-Martins, A. Parasitological indicators of contamination at sand of beaches and monitoring by traditional methods and immunoenzymatic assay. **Brazilian Journal of Biosystems Engineering**, v. 9, n. 4, p. 304-311, 2015.
- Amoah, I. D.; Singh, G.; Stenström, T. A.; Reddy, P. Detection and quantification of soil-transmitted helminths in environmental samples: a review of current state-of-the-art and future perspectives. **Acta tropica**, v.169, p.187-201, 2017.
- Amoah, I. D.; Adegoke, A. A.; Stenström, T. A. Soil-transmitted helminth infections associated with wastewater and sludge reuse: a review of current evidence. **Tropical Medicine and International Health**. v. 23, n.7, p. 692–703, 2018.
- Andrade, S.S.; Teodoro, L.M.; Viana, D.J.S.; Canuto-Sales, L.M.; Bahia-de-Oliveira, G.H.; Villas Bôas, S.; Barata, R.A. Intestinal parasites in public transport buses from the city of Diamantina, Minas Gerais, Brazil. **Research and Reports in Tropical Medicine**. v. 8, p. 59 – 63, 2017.
- Araújo, F. R.; Cristina, P. A.; Max R. W.; Alessander, G. Larva *migrans* cutânea em crianças de uma escola em área do Centro-Oeste do Brasil. **Revista de Saúde Pública**. v.34, n.1, p.84 - 85, 2000.
- Areekul, P; Putaporntip, C; Pattanawong, U; Sitthicharoenchai, P; Jongwutiwes, S. *Trichuris vulpis* and *T. trichiura* infections among schoolchildren of a rural community in northwestern Thailand: the possible role of dogs in disease transmission. **Asian Biomedicine**, v.4, n.1, p.49-60, 2010.
- Aziz, A. A; Hassan, A. A; Elmahallawy, E. K; Elshahawy, I. S; Almuzaini, A. M. Prevalence and associated risk factors of *Toxocara* infection in dogs in northern and southern Egypt. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v.17, p.100305, 2019.
- Babamale, O.A.; Ugbomoiko, U.S.; Heukelbach, J. High prevalence of *Plasmodium falciparum* and Soil – Transmitted Helminth co-infections in a periurban community in Kwara State, Nigeria. **Journal of Infection and Public Health**. v.11, p. 48–53, 2018.

Bailey, C; Lopez, S; Camero, A; Taiquiri, C; Arhuay, Y; Moore, D. A. Factors associated with parasitic infection amongst street children in orphanages across Lima, Peru. **Pathogens and global health**, v.107, n.2, p.52-57, 2013.

Becker, S.L.; Liwanag, H.J.; Snyder, J.S.; Akogun, O.; Belizario, V.; Freeman, M.C. Toward the 2020 goal of Soil - Transmitted Helminthiasis control and elimination. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v.12, n. 8, p. 1 – 17, 2018.

Bethony, J.; Brooker, S.; Albonico, M.; Geiger, S.M.; Loukas, A.; Diemert, D.; Hotez, P.J. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. **Lancet** v. 367, p.1521–32, 2006.

Blaszkowska, J; Wojcik, A; Kurnatowski, P; Szwabe K. Geohelminth egg contamination of children's play areas in the city of Lodz (Poland). **Veterinary parasitology**, v. 192, n. 1-3, p. 228-233, 2013.

Blaszkowska, J; Góralaska, K; Wójcik, A; Kurnatowski, P. & Szwabe, K. Presence of *Toxocara* spp. eggs in children's recreation areas with varying degrees of access for animals. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v.22, n; 2015.

Blazius, R. D; Emerick, S; Prophiro, J. S; Romão, P. R. T; Silva, O. S. D. Occurrence of protozoa and helminthes in faecal samples of stray dogs from Itapema City, Santa Catarina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.38, n.1, p.73-74, 2005.

Bogitsh, B.J, Carter, C.E, Oeltmann, T. N. *Clinical Parasitology*, 2nd. Waltham, Elsevier, 2013.

Bojanich, M. V.; Alonso, J. M.; Caraballo, N. A.; Itatí Schöller, M.; López, M. D. L. Á.; García, L. M.; Basualdo, J. Á. Assessment of the presence of *Toxocara* eggs in soils of an arid area in central-western Argentina. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.57, n.1, p.73-76, 2015.

Bojar, H; Kłapeć, T. Contamination of selected recreational areas in Lublin Province, Eastern Poland, by eggs of *Toxocara* spp., *Ancylostoma* spp. and *Trichuris* spp. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**. v.25, n.3, p.460–463, 2018.

Boni de Oliveira, C. M. Determinação de protocolo para detecção de cistos de *Giardia* spp. e ovos de helmintos, em solos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, 2012.

Bowman, D.D.; Little, M.D.; Reimers R.S. Precision and accuracy of an assay for detecting *Ascaris* eggs in various biosolid matrices. **Water Research**. 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.

Bricarello, P. A; Magagnin, E. A; de Oliveira, T; da Silva, A; Lima, L. M. Contamination by parasites of zoonotic importance in fecal samples from Florianópolis Beaches, Santa Catarina State, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.55, n.1, p.1-10, 2018.

Brooker, S.; Clements, A.C.A.; Bundy, D.A.P. Global epidemiology, ecology and control of Soil-Transmitted Helminth infections. **Adv Parasitol.** v.62, p. 221–261, 2006.

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.

Buschini, M. L. T; Pittner, E; Czervinski, T; Moraes, I. D. F; Moreira, M. M; Sanches, H. F; Monteiro, M. C. Spatial distribution of enteroparasites among school children from Guarapuava, State of Paraná, Brazil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.10, n.4, p.568-578, 2007.

Byappanahalli, M. N; Sawdey, R; Ishii, S; Shively, D. A; Ferguson, J. A; Whitman, R. L; Sadowsky, M. J. Seasonal stability of Cladophora-associated *Salmonella* in Lake Michigan watersheds. **Water Research**, v.43, n.3, p.806-814, 2009.

Calabrese, E. J; Pastides, H; Barnes, R; Edwards, C; Kostecki, P. T; Stanek III, E. J; Gilbert, C. E. How much soil do young children ingest: an epidemiologic study. **Petroleum contaminated soils**, v.2, p.363-397, 1989.

Campbell, S.J.; Nery, S.V.; Mc Carthy, J.S.; Gray, D.J.; Magalhães, R.J.S.; Clements, A.C.A. A Critical Appraisal of Control Strategies for Soil-Transmitted Helminths. **Trends in Parasitology**. p.1-11, 2016.

Capizzi, S.; Schwartzbrod, J. Surface properties of *Ascaris suum* eggs: hydrophobic potential and Lewis acid–base interactions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 22, p.99–105, 2001.

Carden, S. M.; Meusemann, R.; Walker, J.; Stawell, R.J.; MacKinnon, J.R.; Smith, D.; Stawell, A.M.; Hall, A.J.H. *Toxocara canis*: egg presence in Melbourne parks and disease incidence in Victoria. **Clinical and Experimental Ophthalmology**, v.31, p.143–146, 2003.

Cassenote, A.J.F.; Neto, J.M.P.; Lima-Catelani, A.R.A.; Ferreira, A.W. Soil contamination by eggs of soil-transmitted helminths with zoonotic potential in the town of Fernandópolis, State of São Paulo, Brazil, between 2007 and 2008. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.44, n.3, p.371-374, 2011.

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Relatório de qualidade das praias litorâneas no Estado de São Paulo, 2019. **São Paulo, CETESB, 2020.**

Childs, J. E. The prevalence of *Toxocara* species ova in backyards and gardens of Baltimore, **Maryland. American journal of public health**, v.75, n.9, p.1092-1094, 1985.

Cholewinski, M; Solarczyk, P; Derda, M; Wojtkowiak-Giera, A; Hadas, E. Presence of potential pathogenic genotypes of free-living amoebae isolated from sandboxes in children's playgrounds. **Folia parasitologica**, v.62, p.1, 2015.

Collender, P. A.; Kirby, A. E.; Addiss, D. G.; Freeman, M. C.; Remais, J. V. Methods for quantification of Soil-Transmitted Helminths in environmental media: current techniques and recent advances. **Trends in parasitology**, v.31, n.12, p.625-639, 2015.

Cook A, N.; Paton, C.A.; Nichols, R.A.B.; Barker, K.; Smith, H.V. Towards standard methods for the detection of *Cryptosporidium parvum* on lettuce and raspberries. Part 1: Development and optimization of methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 109, p. 215-221, 2006.

Cranston, I.; Potgieter, N.; Mathebula, S.; Ensink, J. H. J. Transmission of *Enterobius vermicularis* eggs through hands of school children in rural South Africa. **Acta tropica**, v. 150, p. 94–96, 2015.

Cranston, I; Teoha, P.J; Baker, S. M; Sengupta, M. E; Ensink, J. H. J. Evaluating the efficacy of a centrifugation-flotation method for extracting *Ascaris* ova from soil. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 110, n. 7, p. 400-407, 2016.

Creo, C.; Fraboni, C. Awards for the Sustainable Management of Coastal Tourism Destinations: The Example of the Blue Flag Program. **Journal of Coastal Research**, v. 61, p.378–381, 2011.

Dada, B.J.O. A new technique for the recovery of *Toxocara* eggs from soil. **Journal of Helminthology**, v.53, p.141-144, 1979.

Darlan, D.M.; Winna, M.; Simorangkir, H.AH.; Rozi, M.F.; Arrasyid, N.K.; Panggabean, M. Soil-transmitted helminth and its associated risk factors among school-

aged children. **IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science**, v.305, p. 1-6, 2019.

David, E.D.; Lindquist, W.D. Determination of the specific gravity of certain helminth eggs using sucrose density gradient centrifugation. **The Journal of Parasitology**, vol. 68, n. 5 p. 916-919, 1982.

De Amorim Santos, I. G.; da Conceição Silva, J.; Ramos, R. A.; de Melo, R. G.; da Conceição Gomes, S., Alencar, M. B.; Ramos, R. E. S. Enteroparasitoses e fatores de risco em escolares de uma cidade do Nordeste do Brasil. **PUBVET**, v.14, p.139, 2020.

De Florio-Barker, S.; Arnold, B. F.; Sams, E. A.; Dufour, A. P.; Colford, J. M.; Weisberg, S. B.; Wade, T. J. Child environmental exposures to water and sand at the beach: Findings from studies of over 68,000 subjects at 12 beaches. **Journal of exposure science & environmental epidemiology**, v.28, n.2, p.93-100, 2018.

De Ybáñez, M. R.; Garijo, M.; Goyena, M.; Alonso, F. D. Improved methods for recovering eggs of *Toxocara canis* from soil. **Journal of helminthology**, v.74, n.4, p.349-353, 2000.

Duncan, K. T; Koons, N. R; Litherland, M. A; Little, S. E; Nagamori, Y. Prevalence of intestinal parasites in fecal samples and estimation of parasite contamination from dog parks in central Oklahoma. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v.19, p.100362, 2020.

Dunsmore, J.D.; Thompson, R.C.A.; Bates, I.A. Prevalence and survival of *Toxocara canis* eggs in the urban environment of Perth, Australia. **Veterinary Parasitology**, v.16, p.303—311, 1984.

Esterre, P.; Agis, F. Beach sand nematodes in Guadeloupe: associated public health problems. **Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique et de ses Filiales**, v.78, n.1, p.71-78, 1985.

Eugene, W. R.; Rodger, B. B.; Andrew, D. E.; Lenore, S. C. Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association, Water environment federation, 22nd edn Washington DC, USA, 2012

Espinola, A. M. Desenvolvimento urbano nas áreas turístico residenciais: um estudo sobre o fenômeno das segundas residências nas cidades balneárias do litoral do Paraná. **Anais ENANPUR**, v.15, n.1, 2013.

Esteves, C.J.O. Vulnerabilidade socioambiental na área de ocupação contínua do litoral do Paraná – Brasil. **Ra’e Ga**, v.34, p.214-245, 2015.

Etewa, S.E.; Abdel-Rahman, S.A.; Naglaa, F.; El-Aal, A.; Fathy, G.M.; El-Shafey, M.A.; Ewi, A.M.G. Geohelminths distribution as affected by soil properties, physicochemical factors and climate in Sharkya governorate Egypt. **Journal of parasitic diseases**, v. 40, n. 2, p. 496-504, 2016.

Façanha, M. C e Pinheiro, A. C. Comportamento das doenças diarreicas agudas em serviços de saúde de Fortaleza, Ceará, Brasil, entre 1996 e 2001. **Cadernos de saúde pública**, v.21, p.49-54, 2005.

Fajutag, A. J. M & Paller, V. G. V. *Toxocara* eggs soil contamination and its seroprevalence among public school children in Los Baños, Laguna, Philippines. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v.44, n. 4, p.551, 2011).

Fakhri, Y.; Gasser, R.B.; Rostami, A.; Fan, C.K.; Ghasemi, S.M.; Javanian, M.; Bayani, M.; Armoon, B.; Moradi, B. *Toxocara* eggs in public places worldwide: A systematic review and meta-analysis. **Environmental pollution**, v. 242, p. 1467-1475, 2018.

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, 1939.

Ferreira, P. S.F.; Motta, P. C.; Souza, T. C.; Silva, T. P.; Oliveira, J.F.; Santos, A. S.P. Avaliação preliminar dos efeitos da ineficiência dos serviços de saneamento na saúde pública brasileira. **Revista Internacional de Ciências**, v. 06, n. 02, p. 214-229, 2016.

Fialho, P. M.; Corrêa, C.R. A Systematic Review of Toxocariasis: A Neglected But High-Prevalence Disease in Brazil. **Am J Trop Med Hyg**. v.94, p.1193-1199, 2016.

Fincham, J. E.; Markus, M.B.; Adams, V.J. Could control of Soil-transmitted helminthic infection influence the HIV/AIDS pandemic. **Acta tropica**, v.86, p. 315-333, 2003.

Freeman, M.C.; Akogun, O.; Belizario, V.; Brooker, S.J.; Gyorkos, T. W.; Imtiaz, R.; Krolewiecki, A.; Lee, S.; Matendehero, S.H.; Pullan R. L.; Utzinger, J. Challenges and opportunities for control and elimination of soil-transmitted helminth infection beyond 2020. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 4, p. e0007201, 2019.

Gall, S.; Müller, I.; Walter, C.; Seelig, H.; Steenkamp, L.; Pühse, L.; du Randt, R.; Smith, D.; Adams, L.; Nqweniso, S.; Yap, P.; Ludyga, S.; Steinmann, P.; Utzinger, J.; Gerbe, M. Associations between selective attention and soil-transmitted helminth infections, socioeconomic status, and physical fitness in disadvantaged children in Port

Elizabeth, South Africa: An observational study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.11, n.5, p. e0005573, 2017.

Gamboa, M. I. Effects of temperature and humidity on the development of eggs of *Toxocara canis* under laboratory conditions. **Journal of helminthology**, v.79, n.4, p.327-331, 2005.

García-Sánchez, A. M; Rivero, J; Callejón, R; Zurita, A; Reguera-Gomez, M; Valero, M. A; Cutillas, C. Differentiation of *Trichuris* species using a morphometric approach. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v.9, p.218-223, 2019.

Gaspard, P.; Wiart, J.; Schwartzbrod, J. A method for assessing the viability of nematode eggs in sludge. **Environ. Technol**, v.17, p. 415–420, 1996.

Gomes, T. C; Almeida, M. F; Miura, L. A; Granja, J; Santos, D. V; Oliveira, R. M; Santos, C. S. Intestinal helminthiasis in street population of Rio de Janeiro city. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35, n.5, p.531-532, 2002.

Guerrero D.A.; Arli M.; Rodríguez, N.; Romero, D. Estudio de parásitos geohelminintos en arena de playa "e l palit o", municipio Puerto Cabello, estado Carabobo, Venezuela. **Comunidad Y Salud**, v. 15, n.1, p. 1-8, 2017.

Gurgel, R.Q.; Cardoso, G.S.; Silva, A.M.; Santos, L.N.; Oliveira, R.C.V. Creche: ambiente expositor ou protetor nas infestações por parasitos intestinais em Aracaju, SE. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.38, n.03, p. 267 - 269, 2005.

Gyorkos, T.W.; Kokoskin-Nelson, E.; Maclean, J.D.; Soto, J.C. Parasite contamination of sand and soil from daycare sandboxes and play areas. **Can J Infect Dis**, v. 5, n.1, p.17-20, 1994.

Halliday, E; Gast, R. J. Bacteria in beach sands: an emerging challenge in protecting coastal water quality and bather health. **Environmental science & technology**, v.45, n.2, p.370-379, 2011.

Hawdon, J.M. Controlling Soil-Transmitted Helminths: Time to Think Inside the Box? **Journal of Parasitology**, v.100, n. 02, p. 166-188, 2014.

Heaney, C.D.; Sams, E.; Wing, S.; Marshall, S.; Brenner, K.; Dufour, A.P.; Wade, T. J. Contact with beach sand among beachgoers and risk of illness. **American Journal of Epidemiology**, v.170, p.164–172, 2009.

Heaney, C. D.; Exum, N. G.; Dufour, A. P.; Brenner, K. P.; Haugland, R. A.; Chern, E.; Wade, T. J. Water quality, weather and environmental factors associated with fecal

indicator organism density in beach sand at two recreational marine beaches. **Science of the Total Environment**, v.497, p.440-447, 2014.

Hilles, TA. H.; Al Hindi, A. I.; Abu Safieh, Y.A. Is Gaza sandy shoreline region contaminated with human gastrointestinal parasites? **Jordan Journal of Biological Sciences**, v.6, n.3, p. 205- 210, 2013.

Hitch, G. A review of guidelines / guidance from various countries around the world for the prevention and management of travellers' diarrhoea: A pharmacist's perspective. **Pharmacy**, v.7, n.107, 2019.

Hoffman, W.A.; Pons, J.A.; Janer, J.L. The sedimentation method in schistosomiasis mansoni. **J. Public Health Trop. Med.** v. 9, p. 283 - 291, 1934.

Hohlenwerger M.C.; Almeida M.A.O.; Silva A.; Carvalho S.M.S.; Schilling A.C.; Munhoz A.D. Larvas de ancilostomatídeos em sedimentos de solo de praias de Salvador, Bahia. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.33, n.2, p.111-114, 2011.

Hong, S. T.; Chai, J. Y.; Choi, M. H.; Huh, S.; Rim, H. J.; Lee, S. H. A successful experience of soil-transmitted helminth control in the Republic of Korea. **The Korean journal of parasitology**, v.44, n.3, p.177, 2006.

Horiuchi, S; Paller, V. G. V; Uga, S. Soil contamination by parasite eggs in rural village in the Philippines. **Trop Biomed**, v. 30, n. 3, p. 495-503, 2013.

Hotez, P.J.; Molyneux, D.H.; Fenwick, A.; Kumaresan, J.; Sachs, S.E.; Sachs, J.D.; Savioli, L. Control of Neglected Tropical Diseases, **The New England Journal of medicine**, v. 357, p.1018-27, 2007.

Hotez, P.J; Wilkins, P.P; Toxocariasis: America's most common neglected infection of poverty and a helminthiasis of global importance? **PLOS Neglected Tropical Diseases**. p.3-400, 2009.

Hotez, P.J.; Aksoy, S.; Brindley, P.J.; Kamhawi, S. What constitutes a neglected tropical disease? **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.14, n.1, p. e0008001, 2020.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - Características da população e do dos domicílios: resultado do universo. Censo Demográfico, 2010.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – Cidades e Estados, Censo Demográfico, 2010. Disponível em:

<https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados.html?view=municipio>

Acesso em: 10/09/2019

Instituto Ambiental do Paraná - IAP passa a monitorar qualidade da areia no Litoral, Curitiba, dia 29 de novembro de 2011. Disponível em:

<http://www.iap.pr.gov.br/modules/noticias/article.php?storyid=96&tit=a-href=http://www.iap.pr.gov.br/modules/noticias/article.php?storyid=96IAP-passa-a-monitorar-qualidade-da-areia-no-Litoral-a>

Acesso em: 01/03/2018

Instituto Trata Brasil. Benefícios Econômicos e Sociais da Expansão do Saneamento no Brasil, São Paulo, 2018. Disponível em:

<http://www.tratabrasil.org.br/estudos/estudos-itb/itb/beneficios-economicos-e-sociais-da-expansao-do-saneamento-brasileiro>

Acesso em: 01/06/2018

Instituto Trata Brasil. Serviços de Esgoto Beneficiam cidades turísticas. São Paulo, 2019. Disponível em:

<http://www.tratabrasil.org.br/blog/2019/01/08/servicos-de-esgoto-beneficiam-cidades-turisticas/> Acesso em: 20/09/2019

Isaac, C.; Turay, P. N.; Inegbenosun, C. U.; Ezekiel, S. A.; Adamu, H. O.; Ohiolei, J. A.; Prevalence of soil-transmitted helminths in primary school playgrounds in Edo State, Southern Nigéria. **Helminthologia**, v.56, n.4, p. 282 – 295, 2019.

Jaromin-Gleń, K.; Kłapeć, T.; Łagód, G.; Karamon, J.; Malicki, J.; Skowrońska, A.; Bieganowski, A. Division of methods for counting helminths' eggs and the problem of efficiency of these methods. **Ann Agric Environ Med**, v.24, n.1, p.1-7, 2017.

Jeandron A.; Ensink, J.H.J.; Thamsborg, S.M.; Dalsgaard, A.; Sengupta, M.E. A quantitative assessment method for *Ascaris* eggs on hands. **PLoS ONE**, v.9, n.5, p. e96731, 2014.

Jensen, P.K.M.; Phuc, P.D.; Konradsen, F.; Klank. L.T.; Dalsgaard, A. Survival of *Ascaris* eggs and hygienic quality of human excreta in Vietnamese composting latrines. **Environmental Health**, v. 8, n. 1, p. 57, 2009.

Jourdan, P.M.; Lamberton, P.H.L.; Fenwick, A.; Addiss, D.G. Soil-transmitted helminth infections. **Lancet**, v.391 p.252– 265, 2018.

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.

Keswani, A; Oliver, D.M; Gutierrez, T; Quilliam, R.S. Microbial hitchhikers of marine plastic debris: Human exposure risks at bathing waters and beach environments, **Marine**

Environmental Research, v. 118, p.10-19, 2016.

Kim, M.; Pyo, K.H.; Hwang, Y.S.; Park, K.H.; Hwang, I.G.; Chai, J.Y.; Shin, H.E. Effect of temperature on embryonation of *Ascaris suum* eggs in an environmental chamber. **The Korean journal of parasitology**, v. 50, n. 3, p. 239, 2012.

Kleine, A; Janecek, E; Waindok, P; Strube, C. Flotation and adherence characteristics of *Toxocara canis* and *T. cati* and a reliable method for recovering *Toxocara* eggs from soil. **Veterinary parasitology**, v. 227, p. 35-41, 2016.

Kleine, A; Springer, A; Strube, C. Seasonal variation in the prevalence of *Toxocara* eggs on children's playgrounds in the city of Hanover, Germany. **Parasites & Vectors**, v. 10, p. 1 -8, 2017.

Lalonde, L.F.; Gajadhar, A.A. Optimization and validation of methods for isolation and realtime PCR identification of protozoan oocysts on leafy green vegetables and berry fruits. **Food and Waterborne Parasitology**, v.2, p.1-7, 2016.

Landa-Cansigno, O.; Durán-Álvarez, J.C.; Jiménez-Cisneros, B. Retention of *Escherichia coli*, *Giardia lamblia* cysts and *Ascaris lumbricoides* eggs in agricultural soils irrigated by untreated wastewater. **Journal of Environmental Management**, v.128, p. 22 – 29, 2013.

Langford, B.J.; Schwartz, K.L. Bringing home unwelcome souvenirs: Travel and drug-resistant bacteria. **Can Commun Dis Rep**, v.44, n.11, p.277-282, 2018.

Leal, D. A. G.; Souza, D. S. M.; Caumo, K. S.; Fongaro, G.; Panatieri, L. F.; Durigan, M.; Franco, R. M. B. Genotypic characterization and assessment of infectivity of human waterborne pathogens recovered from oysters and estuarine waters in Brazil. **Water research**, v.137, p.273-280, 2018.

Lescano, S.A.Z.; Chieffi, P.P.; Peres, B.A.; de Mello, E.O.; Velarde, C.N.; Salinas, A.A.; Rojas, C.E. Soil Contamination and Human Infection by *Toxocara* sp. in the Urban Area of Lima, Peru. **Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v.93, n.6, p.733-734, 1998.

Li, J.; Zhang, X. Beach pollution effects on health and productivity in California. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v.16, 1 -12, 2019.

Loh, A.G.; Israf, D.A. Tests on the centrifugal flotation technique and its use in estimating the prevalence of *Toxocara* in soil samples from urban and suburban areas of Malaysia, **Journal of Helminthology**, v.72, p.39-42, 1998.

Mabbott, N.A. The influence of parasite infections on host immunity to co-infection with other pathogens. **Frontiers in Immunology**, v.9, p. 1 - 14, 2018.

Macuhova, K.; Akao, N.; Fujinami, Y.; Kumagai, T.; Ohta, N. Contamination, distribution and pathogenicity of *Toxocara canis* and *T. cati* eggs from sandpits in Tokyo, Japan. **Journal of Helminthology**, v. 87, p. 271–276, 2013.

Manini, M.P.; Marchioro, A.A.; Colli, C.M.; Nishi, L.; Falavigna-Guilherme, A.L. Association between contamination of public squares and seropositivity for *Toxocara* spp. in children. **Veterinary Parasitology**, v.188, p. 48– 52, 2012.

Manjarrez-Paba, G.; Herrera, J.I.B.; Arrunategui, B.P.G. Environmental and health risk by the presence of parasites in the sand of Cartagena beaches. **Beach Management Tools - Concepts, Methodologies and Case Studies, Coastal Research**, v.24, 2017.

Márquez-Navarro, A; García-Bracamontes, G; Álvarez-Fernández, B. E; Ávila-Caballero, L. P; Santos-Aranda, I; Díaz-Chiguer, D. L; Noguera-Torres, B. *Trichuris vulpis* (Froelich, 1789) infection in a child: a case report. **The Korean journal of parasitology**, v.50, n.1, p.69, 2012.

Martins-Melo, F. R; Ramos Jr, A. N; Alencar, C. H; Lima, M. S; Heukelbach, J. Epidemiology of soil-transmitted helminthiases related mortality in Brazil. **Parasitology**, v.144, n.5, p.669, 2017.

Matesco, V.C.; Mentz, M.B; Rott, M.B.; Silveira, C.O. Contaminação sazonal por ovos de helmintos na praia de Ipanema, em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**. v. 35, n. 2, p.135-141, 2006.

Matosinhos, F. C.; Valenzuela, V. C.; Silveira, J. A.; Rabelo, E. M. Standardization of a method for the detection of helminth eggs and larvae in lettuce. **Parasitology Research** v.115, p.1827–1834, 2016.

Mattia, S; Colli, C. M; Adami, C. M; Guilherme, G. F; Nishi, L; Rubinsky-Elefant, G; Falavigna-Guilherme, A. L. Seroprevalence of *Toxocara* infection in children and environmental contamination of urban areas in Paraná State, Brazil. **Journal of helminthology**, v.86, n.4, p.440, 2012.

Milano, A.; Francisca, M.; Oscherov, E. B. Contaminación por parásitos caninos de importancia zoonótica en playas de la ciudad de Corrientes, Argentina. **Parasitología latinoamericana**, v.57, n.3-4, p.119-123, 2002.

Ministério do Turismo. Boletim de Estatísticas Turísticas, Brasil, 2018. Disponível em: <http://www.dadosefatos.turismo.gov.br/boletins.html> Acesso em: 01/11/2019

Ministério do Turismo. Plano de Desenvolvimento Integrado do Turismo Sustentável – Polo Turístico do litoral Paranaense, 2015. Disponível em:

http://www.turismo.gov.br/sites/default/turismo/DPROD/PDITS/PARANA/PDTIS_LIT_ORAL_PARANAENSE.pdf

Acesso em: 01/11/2019.

Mizgajska, H. The role of some environmental factors in the contamination of soil with *Toxocara* spp. and other geohelminth eggs. **Parasitology International**, v.46, n.1, p.67-72, 1997.

Moellering Jr, R. C. Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. **Clinical infectious diseases**, p.1173-1176, 1992.

Mokdad, A. H.; Mensah, G. A.; Krish, V.; Glenn, S. D.; Miller-Petrie, M. K.; Lopez, A. D.; Murray, C. J. Global, regional, national, and subnational big data to inform health equity research: perspectives from the Global Burden of Disease Study 2017. *Ethnicity & disease*, 29(Suppl 1), 159, 2019.

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.

Morgan, E. R; Azam, D; Pegler, K. Quantifying sources of environmental contamination with *Toxocara* spp. eggs. **Veterinary parasitology**, v.193, n.4, p.390-397, 2013.

Moskvina, T. V.; Bartkova, A. D.; Ermolenko, A.V.E. Geohelminths eggs contamination of sandpits in Vladivostok, Russia. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine.** v. 9, n. 12, p.1215 – 1217, 2016.

Neto, J.J.G.; De Farias, J. A. C.; Matos-rocha, T. J. Contaminação de areia por parasitos de importância humana detectados nas praias da orla marítima de Maceió-AL. **Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**, v. 62, n. 2, p. 81-84, 2017.

Nkouayep, V. R.; Tchakounté, B. N.; Wabo Poné, J. Profile of Geohelminth Eggs, Cysts, and Oocysts of Protozoans Contaminating the Soils of Ten Primary Schools in Dschang, West Cameroon. **Journal of parasitology research**, 2017.

Nunes, C. M.; Sinhorini, I. L.; Ogassawara, S. Influence of soil texture in the recovery of *Toxocara canis* eggs by a flotation method. **Veterinary Parasitology**, v. 53, n. 3-4, p. 269-274, 1994.

Odonkor, S.T.; Ampofo, J.K. *Escherichia coli* as an indicator of bacteriological quality of water: an overview. **Microbiology Research**, v.4, n.2, p. 5 – 11, 2013.

Oge H.; Oge, S. Quantitative comparison of various methods for detecting eggs of *Toxocara canis* in samples of sand. **Veterinary Parasitology**, n.92, p.75–79, 2000.

Oishi, C. Y; do Rocio Klisiowicz, D; Seguí, R; Köster, P. C; Carmena, D; Toledo, R; Muñoz-Antoli, C. Reduced prevalence of soil-transmitted helminths and high frequency of protozoan infections in the surrounding urban area of Curitiba, Paraná, Brazil. **Parasite epidemiology and control**, v.7, e00115, 2019.

Ojha, S.C.; Jaide, C.; Jinawath, N.; Rotjanapan, P.; Baral, P. Geohelminths: Public Health Significance. **J Infect Dev Ctries**, v.8, n.1, p. 005-016, 2014.

Ojurongbe, O.; Okorie, P. N.; Opatokun, R. L.; Ojurongbe, T. A.; Mabayoje, V. O.; Olowe, O. A.; Adeyeba, O. A. Prevalence and associated factors of *Plasmodium falciparum* and soil transmitted helminth infections among pregnant women in Osun state, Nigeria. **African health sciences**, v.18, n.3, p.542-551, 2018.

Oliveira-Arbex, A. P.; David, E. B.; Oliveira-Sequeira, T. C. G.; Bittencourt, G. N.; Guimarães, S. Genotyping of *Giardia duodenalis* isolates in asymptomatic children attending daycare centre: evidence of high risk for anthroponotic transmission. **Epidemiology & Infection**, v.144, n.7, p.1418-1428, 2016.

Oliveira, Y. L.; Oliveira, L. M.; Oliveira, Y. L.; Nascimento, A. M.; La Corte, R.; Geraldi, R. M.; Dolabella, S. S. Changes in the epidemiological profile of intestinal parasites after a school-based large-scale treatment for soil-transmitted helminths in a community in northeastern Brazil: Epidemiological profile after large-scale school-based treatment for STH. **Acta tropica**, v.202, p.1 - 5, 2020.

ONU - Organização das Nações Unidas. Agenda 30 para o Desenvolvimento Sustentável: 17 objetivos para transformar o mundo, 2015. Disponível em: <https://nacoesunidas.org/pos2015/agenda2030/> Acesso em: 01/10/2019.

Otero, D.; Alho, A. M.; Nijse, R.; Roelfsema, J.; Overgaaauw, P.; de Carvalho, L. M. Environmental contamination with *Toxocara* spp. eggs in public parks and playground sandpits of Greater Lisbon, Portugal. **Journal of Infection and Public Health**, v. 11, n.1, p. 94-98, 2018.

Pabalan, N.; Singian, E.; Tabangay, L.; Jarjanazi, H.; Boivin, M. J.; Ezeamama, A. E. Soil-transmitted helminth infection, loss of education and cognitive impairment in school-aged children: A systematic review and meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.12, n.1, p. e0005523 2018.

Pacheco-Ortega, G. A; Chan-Pérez, J. I; Ortega-Pacheco, A; Guzmán-Marín, E; Edwards, M; Brown, M. A; Hernández-Cortazar, I. B. Screening of Zoonotic Parasites in Playground Sandboxes of Public Parks from Subtropical Mexico. **Journal of parasitology research**, 2019.

Paliy, A; Sumakova, N; Petrov, R; Shkromada, O; Ulko, L; Paliy, A. Contamination of urbanized territories with eggs of helminths of animals. **Biosystems Diversity**, v.27, n.2, 2019.

Paller, V. G. V.; De Chavez, E. R. C. *Toxocara* (Nematoda: Ascaridida) and other soil-transmitted helminth eggs contaminating soils in selected urban and rural areas in the Philippines. **The Scientific World Journal**, v.2014, 2014.

Paller, V. G. V.; Babia-Abion, S. Soil-transmitted helminth (STH) eggs contaminating soils in selected organic and conventional farms in the Philippines. **Parasite Epidemiology and Control**, v.7, e00119, 2019.

Paquet-Durand, I.; Hernández, J.; Dolz, G.; Zuniga, J. R.; Schnieder, T.; Epe, C. Prevalence of *Toxocara* spp., *Toxascaris leonina* and ancylostomidae in public parks and beaches in different climate zones of Costa Rica. **Acta tropica**, v.104, n.1, p.30-37, 2007.

Pecson, B. M.; Barrios, J. A.; Jiménez, B. E.; Nelson, K. L. The effects of temperature, pH, and ammonia concentration on the inactivation of *Ascaris* eggs in sewage sludge. **Water research**, v. 41, n.13, p. 2893-2902, 2007.

Pedrosa, É. F. N. C.; Cabral, B. L.; de Almeida, P. R. S. F.; Madeira, M. P.; de Carvalho, B. D.; Bastos, K. M. S.; Vale, J. M. Contaminação ambiental por larvas e ovos de helmintos em amostras de areia de praias do município de Fortaleza Ceará. **Journal of Health & Biological Sciences**, v.2, n.1, p.29 – 35, 2014.

Pedroso, R. S.; Siqueira, R. V. Pesquisa de cistos de protozoários, larvas e ovos de helmintos em chupetas. **Jornal de Pediatria**, v.73, n.1, p.21-25, 1997.

Phillips, M. C; Solo-Gabriele, H. M; Piggot, A. M; Klaus, J. S; Zhang, Y. Relationships between sand and water quality at recreational beaches. **Water research**, v.45, n.20, p.6763-6769, 2011.

Pinto, A. B.; Oliveira, A. J. F. C. Diversidade de microrganismos indicadores utilizados na avaliação da contaminação fecal de areias de praias recreacionais marinhas: estado atual do conhecimento e perspectivas. **O Mundo da Saúde**, v.35, n.1, p.105 – 114, 2011.

Prüss-Ustün, A.; Wolf, J./ Bartram, J.; Clasen, T.; Cumming, O.; Freeman, M. C.; Johnston, R. Burden of disease from inadequate water, sanitation and hygiene for selected adverse health outcomes: An updated analysis with a focus on low-and middle-income countries. **International journal of hygiene and environmental health**, v.222, n.5, p.765-777, 2019.

Pullan, R. L.; Smith, J. L.; Jasrasaria, R.; Brooker, S. J. Global numbers of infection and disease burden of soil transmitted helminth infections in 2010. **Parasites & vectors**, v.7, n.1, p. 1- 19, 2014.

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. **Epidemiology & Infection**, v.84, n.1, p.83-89, 1980.

Ravindran, V. B.; Surapaneni, A.; Crosbie, N. D.; Schmidt, J.; Shahsavari, E.; Haleyur, N.; Ball, A. S. A modified approach to recover and enumerate *Ascaris* ova in wastewater and sludge. **PLoS neglected tropical diseases**, v.13, n.2, 2019.

Rio de Janeiro, Resolução SMAC nº 468 de 28 de janeiro de 2010. Dispõe sobre a análise e informações das condições das areias das praias no Município do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://www.rio.rj.gov.br/dlstatic/10112/1458891/DLFE226002.pdf/Resolucao468de28012010.pdf>

Acesso em: 01/08/2018

Robles, M. R.; Camacho, S. G.; del Campo, N. C. *Ancylostoma* spp. on beaches of Elota, Sinaloa, México. **International Journal of Infectious Diseases**, v.14, p.167-168, 2010.

Rocha, S.; Pinto, R. M. F.; Floriano, A. P.; Teixeira, L. H.; Bassili, B.; Martinez, A.; Caseiro, M. M. Environmental analyses of the parasitic profile found in the sandy soil from the Santos municipality beaches, SP, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.53, n.5, p.277-281, 2011.

Sabino, R.; Rodrigues, R.; Costa, I.; Carneiro, C.; Cunha, M., Duarte, A.; Martins, M. D. L. Routine screening of harmful microorganisms in beach sands: implications to public health. **Science of the Total Environment**, v.472, p.1062-1069, 2014.

Sampaio, R. Ocupação das orlas das praias paranaenses pelo uso balneário. **Desenvolvimento e meio ambiente**, v.13, 2006.

Sanchez, P. S.; Agudo, E. G.; Castro, F. G.; Alves, M. N.; Martins, M. T. Evaluation of the sanitary quality of marine recreational waters and sands from beaches of the Sao Paulo State, Brazil. **Water science and technology**, v.18, n.10, p.61-72, 1986.

Santarém, V. A.; Giuffrida, R.; Zanin, G. A. Larva *migrans* cutânea: ocorrência de casos humanos e identificação de larvas de *Ancylostoma* spp em parque público do município de Taciba, São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.37, n.2, p.179-181, 2004.

Santarém, V. A.; Magoti, L. P.; Sichieri, T. D. Influence of variables on centrifuge-flotation technique for recovery of *Toxocara canis* eggs from soil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.51, n.3, p.163-167, 2009.

Santarém, V. A.; Pereira, V. C.; Alegre, B. C. P. Contamination of public parks in Presidente Prudente (São Paulo, Brazil) by *Toxocara* spp. eggs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.21, n.3, p.323-325, 2012.

Santos, N. M.; Silva, V. M. G. D.; Santos, A. B. D.; Souza, T. P. D. Contaminação das praias por parasitos caninos de importância zoonótica na orla da parte alta da cidade de Salvador-Ba, **Revista Ciências Médicas biológicas**, v. 5, n. 1, p. 40-47, 2006.

Santos, P. C.; Lehmann, L. M.; Lorenzi, C.; Hirsch, C.; Telmo, P. L.; Mattos, G. T.; Scaini, C. J. The seropositivity of *Toxocara* spp. antibodies in pregnant women attended at the university hospital in Southern Brazil and the factors associated with infection. **PLoS One**, v.10, n.7, 2015.

São Paulo, LEI nº 14.366, de 15 de março de 2011. Inclui no monitoramento das Praias a análise periódica da qualidade da areia das praias do litoral, dos rios e represas do Estado de São Paulo. Disponível em:

<https://www.al.sp.gov.br/repositorio/legislacao/lei/2011/lei-14366-15.03.2011.html>

Acesso em: 15/03/2018

Sauda, F.; Malandrucchio, L.; De Liberato, C.; Perrucci, S. Gastrointestinal parasites in shelter cats of central Italy. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v.18, 100321, 2019.

Savadelis, M. D.; Evans, C. C.; Mabry, K. H.; LeFavi, L. N.; Klink, B. D.; von Simson, C.; Moorhead, A. R. Canine gastrointestinal nematode transmission potential in municipal dog parks in the southeast United States. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v.18, 100324, 2019.

Scaini, C. J.; Toledo, R. N. D.; Lovatel, R.; Dionello, M. A.; Gatti, F. D. A.; Susin, L.; Signorini, V. R. M. Contaminação ambiental por ovos e larvas de helmintos em fezes de cães na área central do Balneário Cassino, Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n.5, p.617-619, 2003.

Scheuer, L. Sazonalidade do turismo no município de Guaratuba, Paraná, Brasil. **Raega-O Espaço Geográfico em Análise**, v.23, 2011.

Schottler G (1997) Incidence of *Toxocara* ova in beach sand of Warnemunde in 1997. **Gesundheitswesen**, v.60, p.766–767, 1997.

Schuhmann, P.; Skeete, R., Waite, R.; Bangwayo-Skeete, P.; Casey, J.; Oxenford, H. A.; Gill, D. A. Coastal and marine quality and tourists' stated intention to return to Barbados. **Water**, v.11, n.6, p.1265, 2019.

Secretária do Desenvolvimento Sustentável e do Turismo – Paraná Turismo. Turismo em Números (2014 – 2018), Curitiba, Paraná, 2018.

Secretária do Desenvolvimento Sustentável e do Turismo – Paraná Turismo. Paraná Turístico 2026 – Pacto para um destino inteligente, Curitiba, Paraná, 2018.

Seguí, R.; Muñoz-Antoli, C.; Klisiowicz, D. R.; Oishi, C. Y.; Köster, P. C.; de Lucio, A.; Carmena, D. Prevalence of intestinal parasites, with emphasis on the molecular epidemiology of *Giardia duodenalis* and *Blastocystis* sp., in the Paranaguá Bay, Brazil: a community survey. **Parasites & vectors**, v.11, n.1, p.490, 2018.

SEMA - Secretaria de Estado do Meio Ambiente e Recursos Hídricos. Paraná Mar e Costa - Subsídios ao ordenamento das áreas estuarina e costeira do Paraná, Curitiba, 2006.

Shah, A. H.; Abdelzaher, A. M.; Phillips, M.; Hernandez, R.; Solo-Gabriele, H. M.; Kish, J.; Lukasik, J. Indicator microbes correlate with pathogenic bacteria, yeasts and helminthes in sand at a subtropical recreational beach site. **Journal of Applied Microbiology**, v.110, n.6, p.1571-1583, 2011.

Shibata, T.; Solo-Gabriele, H. M.; Fleming, L. E.; Elmir, S. Monitoring marine recreational water quality using multiple microbial indicators in an urban tropical environment. **Water research**, v.38, n.13, p.3119-3131, 2004.

Shibata, T.; Solo-Gabriele, H. M. Quantitative microbial risk assessment of human illness from exposure to marine beach sand. **Environmental science & technology**, v.46, n.5, p.2799-2805, 2012.

Shivoga, W. A.; Moturi, W. N. Geophagia as a risk factor for diarrhoea. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v.3, n.2, p.094-098, 2009.

Sievers, G.; Concha, C.; Gádícke, P. Prueba de una técnica para recuperar huevos de *Toxocara canis* de muestras de tierra. **Parasitología latinoamericana**, v.62, n.1-2, p.61-66, 2007.

Silva, J. P. D.; Marzochi, M. C. D. A.; Santos, E. C. L. D. Avaliação da contaminação experimental de areias de praias por enteroparasitas: pesquisa de ovos de Helminthos. **Cadernos de Saúde Pública**, v.7, n.1, p.90-99, 1991.

Silva, D.A.M.; de Moraes, P.R.; de Abreu, A.L.L.; Carvalho, H.L.A; Oliveira, E. L. P.; Fernandes, F.M. Análise da contaminação por parasitos caninos de importância zoonótica em praias de Vitória (ES), **Revista Científica da FAMINAS**, v. 9, n. 2, p.1-15, 2013.

Silva, Y. S.; da Silva, J. M. S.; Castro, R. C.; Dias, S. D. O.; Carvalho, S. M. S.; da Silva, M. F. Environmental parasitology: soil analysis for geohelminth larvae contamination in Ilhéus, Bahia. **Revista de Patologia Tropical**, v.46, n.3, p.253-262, 2017.

Simonato, G.; Cassini, R.; Morelli, S.; Di Cesare, A.; La Torre, F.; Marcer, F.; di Regalbono, A. F. Contamination of Italian parks with canine helminth eggs and health risk perception of the public. **Preventive Veterinary Medicine**, v.172, p.104788, 2019.

Smith, H. V. Detection of parasites in the environment. **Parasitology**, v.117, n.7, p.113-141, 1999.

SNIS - Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento. Ranking do Saneamento Básico – 100 Maiores Cidades do Brasil, São Paulo, Brasil, 2020. Disponível em: <http://www.tratabrasil.org.br/estudos/estudos-itb/itb/ranking-do-saneamento-2020>
Acesso em: 01/11/2019.

Embrapa Solos. Sistema brasileiro de classificação de solos. Centro Nacional de Pesquisa de Solos: Rio de Janeiro, 2013.

Solo-Gabriele, H. M.; Harwood, V. J.; Kay, D.; Fujioka, R. S.; Sadowsky, M. J.; Whitman, R. L.; Edge, T. A. Beach sand and the potential for infectious disease transmission: observations and recommendations. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v.96, n.1, p.101-120, 2016.

Sotero-Martins, A. Controle da qualidade microbiológica e parasitária em áreas de recreação. **Revista Eletrônica Gestão & Saúde**, v.05, n.03, p.2059-2078, 2014.

Sotero-Martins, A.; Handam, N. B.; Moura, P.; Amaral, L.; Caldas, L.; Carvajal, E. Methods for sanitary inspection of microbiological and parasitary quality of water and sand of recreation areas. **American Journal of Engineering Research (AJER)**, v.6, n.2, p.56-62, 2017.

Sousa, J.O.; Dos Santos, E. O.; Lira, E. M.; Sá, I. C.; Hirsch-Monteiro, C. Análise Parasitológica da Areia das Praias Urbanas de João Pessoa/PB, **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v.18, n.3, p.195-202, 2014.

Sow, D.; Soro, F.; Javelle, E.; Simon, F.; Parola, P.; Gautret, P. Epidemiological profile of cutaneous larva *migrans* in travelers returning to France between 2003 and 2015. **Travel medicine and infectious disease**, v.20, p.61-64, 2017.

Staley, C.; Dunny, G. M.; Sadowsky, M. J. Environmental and animal-associated enterococci. **Advances in applied microbiology**, v. 87, p. 147-186, 2014.

Steffen, R. Epidemiology of travellers' diarrhea. **Journal of travel medicine**, v. 24, p.2-5, 2017.

Steinbaum, L.; Njenga, S. M.; Kihara, J.; Boehm, A. B.; Davis, J.; Null, C.; Pickering, A. J. Soil-transmitted helminth eggs are present in soil at multiple locations within households in rural Kenya. **PLoS One**, v.11, n.6, 2016.

Steinbaum, L.; Kwong, L. H.; Ercumen, A.; Negash, M. S.; Lovely, A. J.; Njenga, S. M.; Nelson, K. L. Detecting and enumerating soil-transmitted helminth eggs in soil: New method development and results from field testing in Kenya and Bangladesh. **PLoS neglected tropical diseases**, v.11, n.4, e0005522, 2017.

Steinbaum, L.; Mboya, J.; Mahoney, R.; Njenga, S. M.; Null, C.; Pickering, A. J. Effect of a sanitation intervention on soil-transmitted helminth prevalence and concentration in household soil: A cluster-randomized controlled trial and risk factor analysis. **PLoS neglected tropical diseases**, v.13, n.2, e0007180, 2019.

Szwabe, K.; Blaszkowska, J. Stray dogs and cats as potential sources of soil contamination with zoonotic parasites. **Ann Agric Environ Med**, v.24, n.1, p.39-43, 2017.

Talukdar, P. K.; Rahman, M.; Rahman, M.; Nabi, A.; Islam, Z.; Hoque, M. M.; Islam, M. A. Antimicrobial resistance, virulence factors and genetic diversity of *Escherichia coli* isolates from household water supply in Dhaka, Bangladesh. **PloS one**, v.8, n.4, 2013.

Terefe, Y.; Ross, K.; Whiley, H. Strongyloidiasis in Ethiopia: systematic review on risk factors, diagnosis, prevalence and clinical outcomes. **Infectious diseases of poverty**, v.8, n.1, p.53, 2019.

Thomas, D.; Jeyathilakan, N. Detection of *Toxocara* eggs in contaminated soil from various public places of Chennai city and detailed correlation with literature. **Journal of parasitic diseases**, v.38, n.2, p.174-180, 2014.

Traversa, D.; di Regalbono, A. F.; Di Cesare, A.; La Torre, F.; Drake, J.; Pietrobelli, M. Environmental contamination by canine geohelminths. **Parasites & Vectors**, v.7, n.1, p.67, 2014.

Tsou, M. C.; Hu, C. Y.; Hsi, H. C.; Hu, H. J.; Özkaynak, H.; Hseu, Z. Y.; Chien, L. C. Soil-to-skin adherence during different activities for children in Taiwan. **Environmental research**, v.167, p.240-247, 2018.

UN – United Nations – The Ocean Conference, New York, USA, 2017. Disponível em: <https://oceanconference.un.org/documents> Acesso em: 01/11/2019.

Vanhee, M.; Dalemans, A. C.; Viaene, J.; Depuydt, L.; Claerebout, E. *Toxocara* in sandpits of public playgrounds and kindergartens in Flanders (Belgium). **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v.1, p.51-54, 2015.

Veraldi, S.; Persico, M. C. Cutaneous larva migrans in a beach soccer player. **Clinical Journal of Sport Medicine**, v.16, n.5, p.430-431, 2006.

Videnova, M. Impact of the environment on development of helminth and protozoan invasive elements and contemporary methods for sanitary-parasitological diagnostics. **Problems of Infectious and Parasitic Diseases**, v.47, n.2, p.18-23, 2019.

Wang, A.; Lin, B.; Sleep, B. E.; Liss, S. N. The impact of biofilm growth on transport of *Escherichia coli* O157: H7 in sand. **Groundwater**, v.49, n.1, p.20-31, 2011.

Weaver, H. J.; Hawdon, J. M.; Hoberg, E. P. Soil-transmitted helminthiases: implications of climate change and human behavior. **Trends in parasitology**, v.26, n.12, p.574-581, 2010.

Weiskerger, C. J., Brandão, J., Ahmed, W., Aslan, A., Avolio, L., Badgley, B. D., ... & Jordao, L. (2019). Impacts of a changing earth on microbial dynamics and human health risks in the continuum between beach water and sand. *Water Research*, 162, 456-470.

Whitman, R. L.; Harwood, V. J.; Edge, T. A.; Nevers, M. B.; Byappanahalli, M.; Vijayavel, K.; Ferguson, D. Microbes in beach sands: integrating environment, ecology and public health. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v.13, n.3, p.329-368, 2014.

WHO - World Health Organization. Guidelines for safe recreational water environments: Coastal and fresh waters, 2003.

WHO - World Health Organization. Soil-transmitted helminthiases: eliminating as public health problem soil-transmitted helminthiases in children: progress report 2001-2010 and strategic plan 2011-2020, 2012.

WHO - World Health Organization. Integrating neglected tropical diseases into global health and development: fourth WHO report on neglected tropical diseases. World Health Organization, 2017.

Wilson, M. E.; Chen, L. H.; Han, P. V.; Keystone, J. S.; Cramer, J. P.; Segurado, A.; Leder, K. Illness in travelers returned from Brazil: the GeoSentinel experience and implications for the 2014 FIFA World Cup and the 2016 Summer Olympics. **Clinical infectious diseases**, v.58, n.10, p.1347-1356, 2014.

Wołyniec, W.; Sulima, M.; Renke, M.; Dębska-Ślizień, A. Parasitic infections associated with unfavourable outcomes in transplant recipients. **Medicina**, v.54, n.2, p.27, 2018.

World Toilet Organization. The consequences of the lack of sanitation and toilet for public health, São Paulo, 2019. Disponível em: <https://www.worldtoilet.org/> acesso em: 01/11/2019.

Xavier, I. R.; Ramos, B. C.; Santarém, V. A. Recovery threshold of *Toxocara canis* eggs from soil. **Veterinary parasitology**, v.167, n.1, p.77-80, 2010.

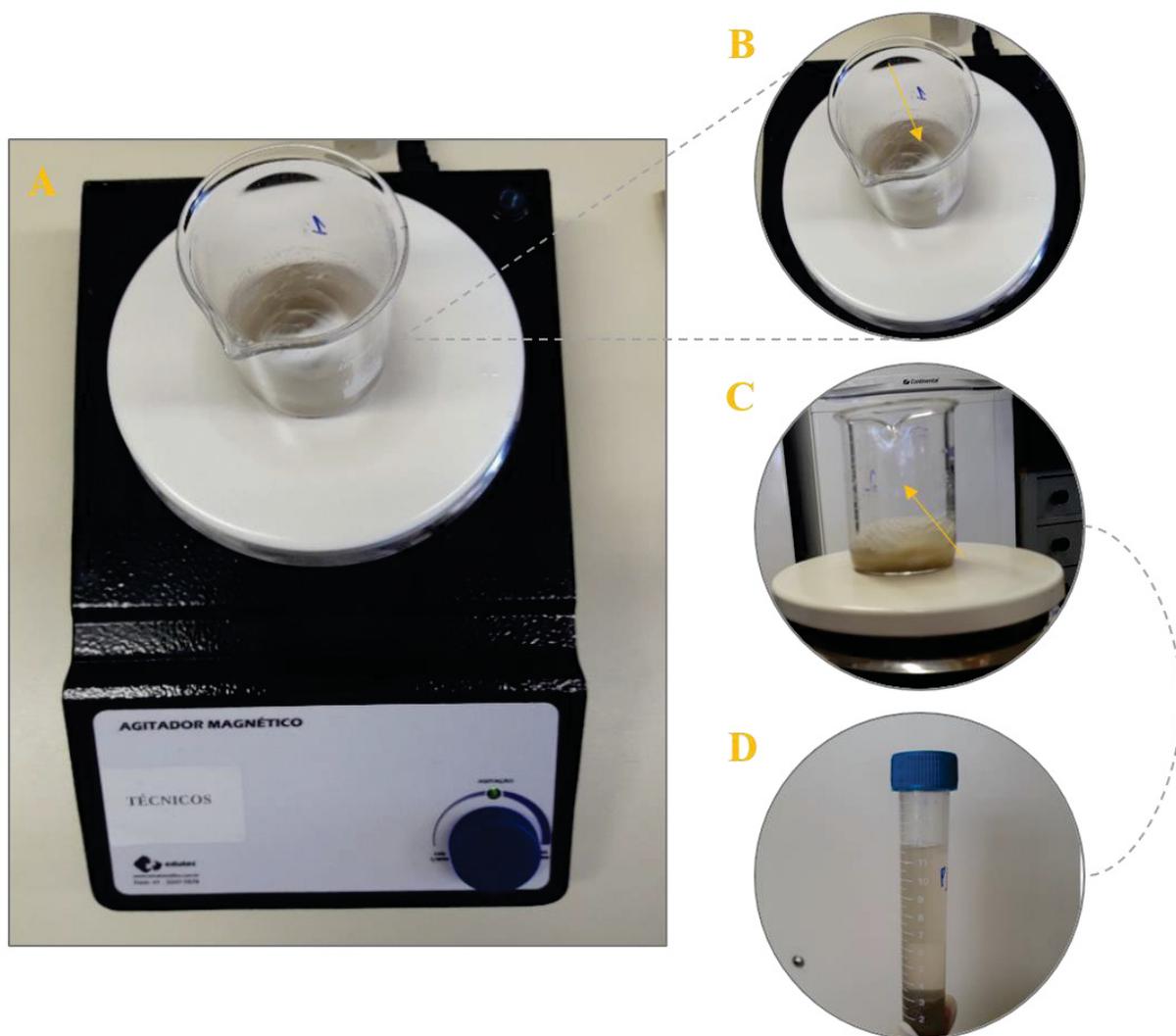
Janson, S.; Smith, P.; Legg, A.; Baird, R. W. Declining soil transmitted helminth detections in an Australian tropical region. **Pathology**, v.51, n.7, p.737-741, 2019.

Zenner, L.; Gounel, J. M.; Chauve, C. M. A standardized method for detecting parasite eggs and oocysts in soils. **Revue de médecine vétérinaire**, v.153, n.11, p.729-734, 2002.

APÊNDICES

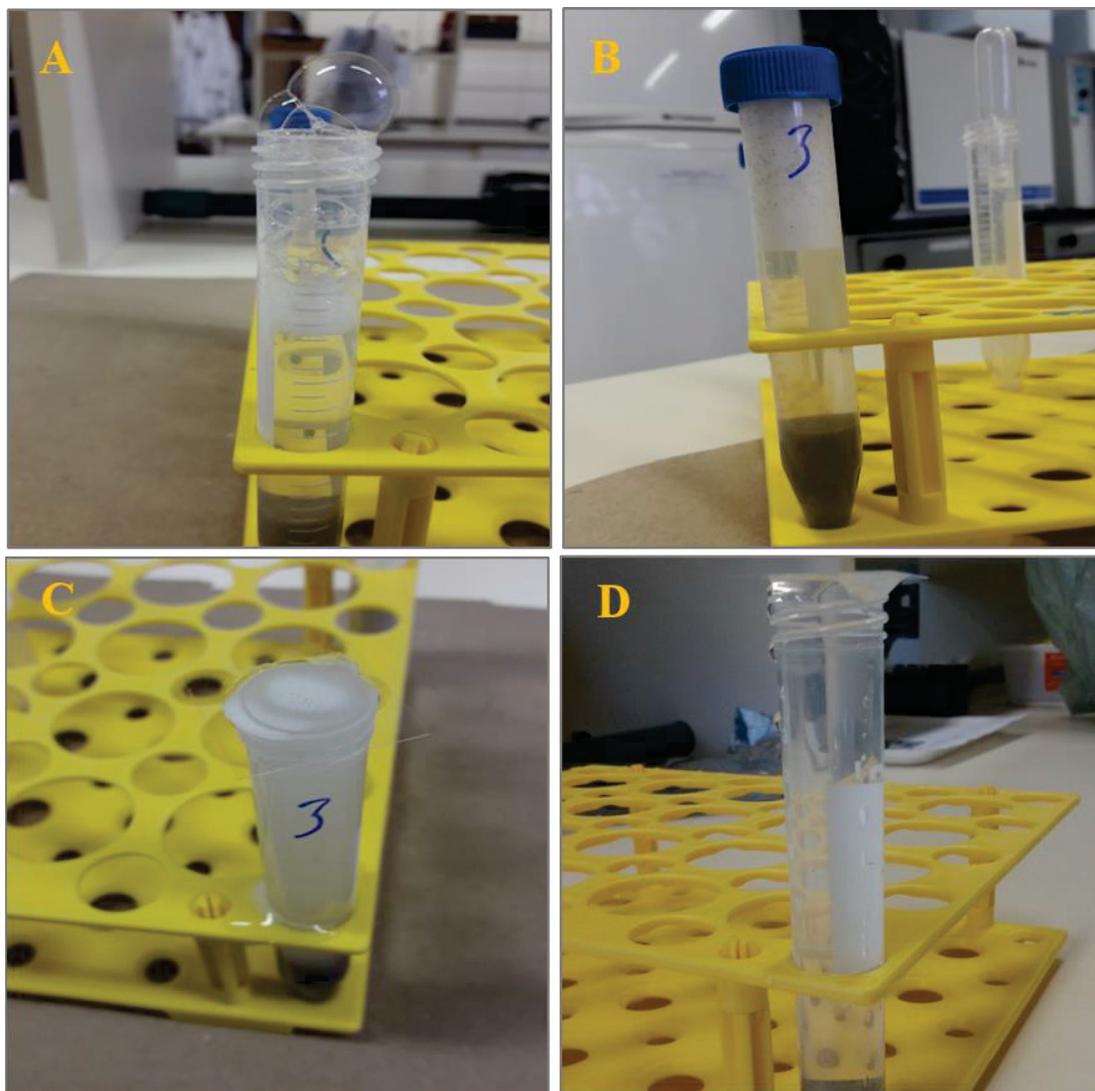
Apêndice A - Ensaios de contaminação artificial para padronização do protocolo.

Figura A 1: Perda de ovos durante a etapa de homogeneização - Agitador magnético (A); aderência dos ovos ao Imã (B) ou ao vidro (C); Transferência do material homogeneizado para tubo Falcon para posterior centrifugação (D).



Fonte: A autora (2019).

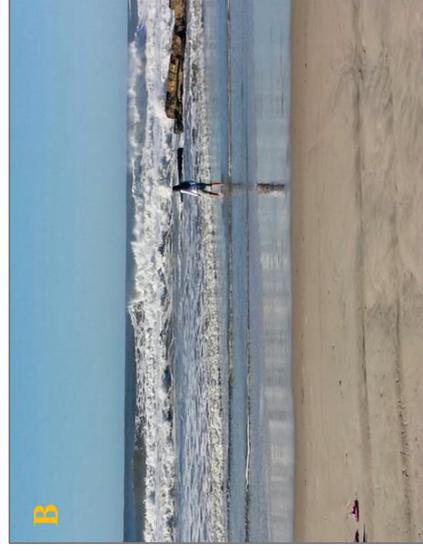
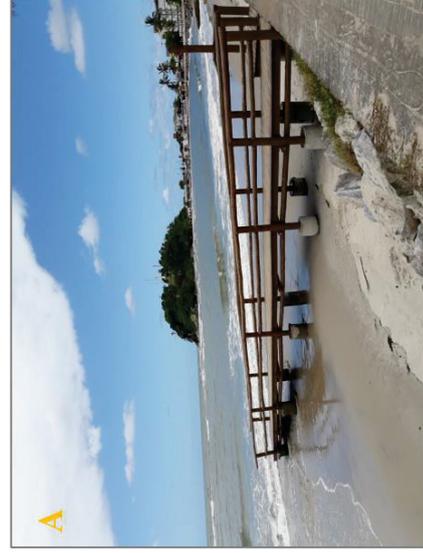
Figura A2: Desempenho das soluções de dissociação em diferentes etapas do método de recuperação de ovos: Adição da solução de dissociação (Tween 80) (A); após a etapa de homogeneização (Tween 80) (B); Etapa de Flutuação (Tween 80) (C); Etapa de Flutuação (Glicina).



Fonte: A autora (2019)

Apêndice B - Situações verificadas durante o monitoramento da ocorrência de ovos de helmintos no litoral do Paraná

Figura B 1: Alterações no nível do mar e sua influência sobre a orla da praia – Faixa de areia da Praia de Guaratuba (Ponto 1) (A); Ondas após o evento de maré alta (B); Efeito dos eventos de ressaca do mar sobre a cidade de Matinhos (Ponto 2 e 3) (C).



Fonte: A autora, (2018) e Globo.com (2019).

Figura B 2: Liberação de efluentes na areia da praia, formação das “línguas negras” (A, B, C, D).



Fonte: A autora (2018 / 2019).

Apêndice C - Monitoramento da ocorrência de ovos de helmintos em áreas de recreação— parques públicos e CMEI de Curitiba.

Figura C1: Presença de animais em áreas de recreação infantil – Circulação de cães nas caixas de areia dos Parques Públicos de Curitiba (A, B); Gato observado no muro do CMEI durante a coleta (C).



Fonte: A autora (2019).

Figura C2: Crianças brincando na caixa de areia do CMEI - Alta concentração de ovos de *Ascaris* sp observados durante a detecção de ovos de helmintos em microscopia, aumento de 10 X.



Fonte: A autora, 2019.

ANEXOS

Anexo A – Produtos derivados da Dissertação de Mestrado

Figura: 3º Prêmio Inova Saúde Paraná – Desenvolvimento de metodologia para recuperação de ovos de helmintos parasitos em areia de praias: aplicabilidade do método proposto para monitoramento da contaminação ambiental.



Fonte: A autora (2018).

Anexo B - Carta de efetivação de parceria entre a UFPR e o IAP.

OFICIO N.º 009/2016 - IAP/DIMAP

Curitiba, 18 de Fevereiro de 2016.

Prof. Dr. Diego Averaldo Guiguet Leal
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Patologia Básica
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Centro Politécnico - Caixa Postal 19031
CEP 81531-990 - CURITIBA/PR

Ref.: Proposta de Parceria em Projeto de Pesquisa

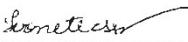
Prezado Senhor,

Em atenção a correspondência datada de 15/02/2016, referente ao projeto de pesquisa intitulado: MONITORAMENTO AMBIENTAL DE PARASITOS NO LITORAL DO PARANÁ COMO INSTRUMENTO PARA ELABORAÇÃO DE PROPOSTA DE LEGISLAÇÃO ESTADUAL DE BALNEABILIDADE, informamos que temos interesse em participar do mesmo, no que se refere à realização das análises microbiológicas de rotina.

Salientamos que o referido projeto é de interesse para esta instituição tendo em vista a necessidade de elaboração de legislação estadual referente à critérios e padrões, não contemplados pela legislação do CONAMA 274/2000, para a classificação de águas para fins recreacionais e balneabilidade, especificamente no que se refere a detecção de enteropatógenos humanos - protozoários patogênicos *Giardia* e *Cryptosporidium* - causadores de gastroenterite, bem como, quanto a qualidade da areia de algumas praias do litoral quanto à contaminação por geohelmintos e outros de caráter zoonótico que ocasionam patologias em seres humanos.

Sem mais para o momento, colocamo-nos à disposição para os esclarecimentos que se fizerem necessários.

Atenciosamente


Ivonete Coelho da Silva Chaves
Diretora da DIMAP

Rua Eng Rebouçás, 1206 – Rebouçás 80215-100 – Curitiba – Paraná – Brasil
Fone: 41 3213-3700 Fax: 41 3333-6161 www.iap.pr.gov.br

Anexo C - Autorização para atuação nos CMEI que compõe a regional do Cajuru, Curitiba.



Prefeitura Municipal de Educação
Secretaria Municipal de Educação
Núcleo Regional de Educação -
Cajuru
Rua Prof.ª Nereide Fract, nº 2150
Bairro Cajuru - Curitiba-PR
CEP: 81.500-000
www.cidadeeducacaoeducimetro.org.br

Aos professores
Diego Averaldo Guiguet Leal (orientador)
Márcia Kiyoe Shimada (co-orientador)
Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Patologia Básica

Assunto: Carta de aceite para a atuação da aluna Patrícia Padilha Ribeiro nos Centros Municipais de Educação Infantil Cajuru e Vila Camargo

O projeto de pesquisa intitulado "Padronização de protocolo para detecção de helmintos em diferentes matrizes de solo" tem como objetivo coletar amostras da areia das áreas de recreação dos Centros Municipais de Educação Infantil (CMEI) Cajuru e Vila Camargo da cidade de Curitiba para monitoramento parasitológico. O projeto é importante, pois trata de questões de importância de saúde pública e a metodologia vem a acrescentar para o monitoramento de parasitos em ambiente. O trabalho será realizado pela equipe do laboratório de Parasitologia Ambiental juntamente ao trabalho de mestrado da aluna Patrícia Padilha Ribeiro.

O trabalho será agendado para toda segunda semana do mês sendo a primeira coleta agendada para o mês de outubro durante um ano. A coleta não interferirá na rotina das atividades das crianças, pois será realizada em horário de descanso das crianças e em área externa, área de recreação onde haja parque de areia.


Maria Odete Claro Pentecoste
Matrícula 87268
Chefe do NRECJ

Maria Odete Claro Pentecoste
Chefe de Núcleo - NREC - CJ
Matrícula 87268
Portaria 263/17