

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

Mirna Aparecida Pereira



**OCORRÊNCIA DE *CRYPTOSPORIDIUM* spp. E *GIARDIA* spp. EM
HORTALIÇAS DA REGIÃO METROPOLITANA DE CAMPINAS
(SP), SUA RELAÇÃO COM A COMUNIDADE DE
TRABALHADORES E COM A ÁREA AGRÍCOLA**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Mirna Aparecida Pereira
Regina Maura Bueno Franco
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como parte
dos requisitos exigidos para a obtenção do título
de Doutor em Parasitologia.

Orientadora: Profª Dra. Regina Maura Bueno Franco

**Campinas – SP
Fevereiro - 2008**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

P414o Pereira, Mirna Aparecida
Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em hortaliças da região metropolitana de Campinas, SP., sua relação com a comunidade de trabalhadores e com a área agrícola / Mirna Aparecida Pereira. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientadora: Regina Maura Bueno Franco.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Cryptosporidium*. 2. *Giardia*. 3. Protozoário. 4. Doenças parasitárias – Campinas (SP). 5. Hortaliças - Contaminação. I. Franco, Regina Maura Bueno. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Occurrence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in vegetables of the metropolitan area of Campinas, SP., her relationship with the workers' community and with the agricultural area.

Palavras-chave em inglês: *Cryptosporidium*; *Giardia*; Protozoa; Parasitic diseases - Campinas (SP, Brazil); Vegetables – Contamination.

Área de concentração: Parasitologia.

Titulação: Doutora em Parasitologia.

Banca examinadora: Regina Maura Bueno Franco, Silmara Marques Allegretti, Sandra Maria Oliveira Morais Veiga, Neliane Ferraz de Arruda Silveira, Luiz Carlos do Nascimento, Ana Maria Aparecida Guaraldo.

Data da defesa: 28/02/2008.

Programa de Pós-Graduação: Parasitologia.

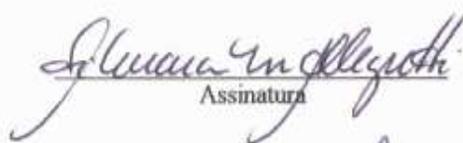
Campinas, 28 de março de 2008.

BANCA EXAMINADORA

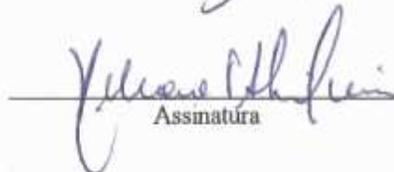
Profa. Dra. Regina Maura Bueno Franco
(Orientadora)


Assinatura

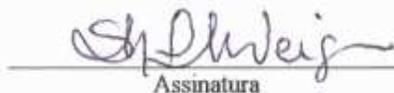
Profa. Dra. Silmara Marques Allegrette


Assinatura

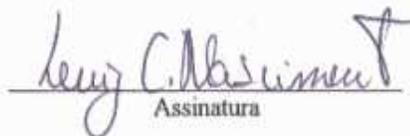
Profa. Dra. Neliane Ferraz de Arruda Silveira


Assinatura

Profa. Dra. Sandra Maria Oliveira Morais Veiga


Assinatura

Prof. Dr. Luiz Carlos do Nascimento


Assinatura

Profa. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo

Assinatura

Profa. Dra. José Maria Monteiro Sigrist

Assinatura

Prof. Dr. José Euclides Paterniani

Assinatura

Pesquisador antes de tudo tem que ser honesto.
E isto não se aprende.

Prof. Dr. Ênio Rosa Prates (UFRGS)

À minha mãe, que pressentindo que ia faltar, colocou uma lâmpada em minha mão jovem, e disse que ela brilharia um dia para iluminar o meu caminho, e eu sentiria na luz a sua benção.

Ao meu eterno companheiro Paulo (“*et al.*”), que ajudou a acender a lâmpada e compreender seu brilho. E que me acompanhou em meu caminho, permitindo que nos fizéssemos felizes.

AGRADECIMENTOS

O meu sincero obrigado à Prof^a Dra. Regina Maura Bueno Franco, pela paciência, confiança e principalmente pela orientação no desenvolvimento deste estudo.

Ao querido amigo Prof. Dr. Norair Salviano dos Reis, que me mostrou o caminho a seguir, e iluminou meus passos no sentido desta conquista.

Ao Prof. e sempre amigo Dr. Nelson Cordeiro, pelo incentivo e apoio, contribuindo para minha formação profissional e científica. Minha imensa gratidão.

À Prof^a Ana Maria Aparecida Guaraldo, pela imensa atenção e contribuição científica durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao colega e amigo Nilson Branco, pelo companherismo, cordialidade e pelas valiosas sugestões, minha eterna gratidão.

Aos colegas de laboratório, Luciana, Romeu, Taís, Paula, Rita e Diego, pelo carinho e atenção.

Aos produtores rurais e ao Sindicato Rural de Campinas e Região, que de forma gentil, prontamente atenderam minhas solicitações.

À todos que contribuíram de alguma forma para a realização desta pesquisa, e para a minha formação profissional e científica.

RESUMO

Cryptosporidium spp. e *Giardia* spp. são parasitos causadores de gastroenterites destacando-se pela elevada incidência de casos, características de resistência aos tratamentos químicos e capacidade de permanência no meio ambiente. O importante papel desses protozoários em vários surtos epidêmicos de veiculação hídrica e alimentar coloca em evidência as hortaliças que, por serem ingeridas cruas, favorecem a aquisição destas parasitoses. No Brasil, são escassos os dados sobre a ocorrência destes protozoários em vegetais como alface e rúcula, alimentos frescos amplamente consumidos pela população. O propósito deste estudo foi investigar a ocorrência destes parasitos em amostras de hortaliças cultivadas na região agrícola de Campinas (SP), e comercializadas pela Central de Abastecimento de Campinas S.A. - CEASA, avaliar a água utilizada na irrigação das mesmas, e as condições higiênico-sanitárias das Unidades de Produção Agrícola - UPAs estudadas (n=15). Para tanto, a presença de oocistos e cistos foi determinada em amostras de alface (*Lactuca sativa*) e rúcula (*Eruca sativa*) e parâmetros físico-químicos foram estabelecidos para a água de irrigação destes vegetais, em diferentes épocas do ano. As coletas foram realizadas durante dois anos consecutivos, nos períodos de maior frequência das chuvas e de maior ocorrência (esperada) de casos de criptosporidiose em Campinas (devido à acentuada sazonalidade do protozoário no fim do verão e início do outono) e, em períodos que correspondessem a épocas de maior utilização das águas subsuperficiais na irrigação das hortaliças, devido à escassez de chuvas. As diversas amostras de vegetais, após serem lavadas com 100ml de solução contendo Tween 80 (0,01 %), foram filtradas em membranas de ésteres mistos de celulose (47mm de diâmetro e 3µm de porosidade nominal), seguida de eluição mediante extração mecânica. Após concentração por centrifugação (1050 x g por 10 minutos), os sedimentos resultantes foram examinados mediante a reação de imunofluorescência direta e teste confirmatório das características morfológicas empregando-se o corante fluorogênico DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole). Também se utilizou a técnica de centrífugo-flutuação em sulfato de zinco, com o intuito de comparar a eficiência de detecção destes protozoários nos vegetais. Amostras de água de irrigação (2 litros) foram processadas pela mesma metodologia. A presença de cistos de *Giardia* spp. ocorreu em 4,1% das 120 amostras de hortaliças

examinadas, no primeiro e terceiro períodos de coleta, e não foram encontrados na água de irrigação. *Cryptosporidium* spp. não foi detectado em nenhum dos períodos investigados, tanto em relação às amostras de hortaliças quanto da água de irrigação. A técnica de centrífugo-flutuação em sulfato de zinco mostrou-se ineficiente, pois não foi revelada a presença de cistos de protozoários e oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas amostras de hortaliças, quando este método foi empregado. A sensibilidade da técnica de filtração em membranas para os vegetais foi de 2,3 % a 63,1 % para oocistos e, para cistos, 1,1 % a 29,3 %. Em amostras de água de irrigação, a sensibilidade desta metodologia variou de 6,0 % a 15 % para *Cryptosporidium* spp. e, de 23,6 % a 25,8 % para *Giardia* spp.. Cistos foram encontrados em 6,6 % das amostras de alface, com densidade de 180 a 230 cistos/50g e, 1,6% das amostras de rúcula, com densidade de 180 cistos/50g de folhas de vegetal o que representa elevada importância em Saúde Pública, dada a possibilidade de aquisição de giardiose. O esclarecimento sobre a dispersão destes protozoários no ambiente e o aperfeiçoamento de procedimentos de detecção dos mesmos, quer em amostras hídricas ou alimentares, são vantajosos para o entendimento da epidemiologia destes patógenos.

PALAVRAS CHAVE: protozoário intestinal, *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., propriedades agrícolas, hortaliças.

ABSTRACT

Cryptosporidium spp. and *Giardia* spp. are waterborne parasites that cause gastroenteritis. They are known for the high incidence of cases and the chemical resistance to treatments and capacity to stay intact for a prolonged time in environment. Today, the great influence of protozoa in several waterborne and foodborne outbreaks, becomes evident that vegetables eaten raw are dangerous and favor acquisition of intestinal parasitosis. In Brazil, there is little information on transmission of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in fresh vegetables as lettuce and rucola, largely consumed by population. The objective of this study was to investigate the occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in vegetable samples from agricultural area in Campinas District (SP, Brazil), and commercialized by Central de Abastecimento de Campinas S.A, - CEASA, as well to evaluate the water used in vegetable irrigation, and the health and hygiene-related conditions of Unidades de Produção Agrícola – UPAs (n = 15). Therefore, the presence of cysts and oocysts was determined in lettuce (*Lactuca sativa*) and rucola (*Eruca sativa*) samples and physico-chemical parameters were established for irrigation water of vegetables, in different seasons of the year. Collections were made over two consecutive years, in such a way that characterized seasons of higher frequency of rains corresponding to months of higher occurrence of cryptosporidiosis cases in Campinas district (due to accentuated seasonality of protozoa in the end of summer and the beginning of autumn) and in periods that corresponded to seasons of high-peak utilization of subsurface waters in vegetable irrigation due to lack of rain. After washed with 100 ml of Tween 80 (0,01%) several vegetable samples were filtered through mixed esters of cellulose membranes (47mm diameter and 3µm nominal porosity), followed by elution by mechanical extraction. After concentration by centrifugation (1050 x g 10 minutes), the resulting sediments were examined by means of direct immunofluorescence reaction and confirmatory morphological test using the fluorogenic stain DAPI (- 4', 6'-diamidino-2-phenylindole), it was also used zinc sulfate centrifugation-flotation method to compare detection efficiency of protozoa in vegetables. Irrigation water samples (2L) were processed by the same methodology. The presence of *Giardia* spp. cysts occurred in 4,1% of 120 vegetable samples, in the first and third collection periods, cysts were not detected in irrigation water.

Cryptosporidium spp. was not detected in either investigated seasons (in relation to vegetable samples and irrigation water) and the presence of cysts and oocysts was not detected through zinc sulfate centrifugation-flotation method in either vegetable samples. Sensibility of membrane filtration method for vegetables was 2,3 % to 63,1 % oocysts and 1,1 % to 29,3 % cysts, respectively. In irrigation water samples, the sensibility of methodology varied from 6,0 % to 15 % for *Cryptosporidium* spp. and from 2,3 % to 25,8 % for *Giardia* spp.. Cysts were found in 6,6% of lettuce samples with a density of 180 to 230 cysts/50g, and 1,6 % of rucola samples with a density of 180 cysts/50g found on vegetable leaves. Therefore, it has a high importance for public health due to risk factor for acquisition of giardiasis. The knowledge on protozoa spreading into environment and the improvement of detection process in food or water samples are useful for epidemiological understanding of those parasites.

Keywords: Intestinal protozoa, *Cryptosporidium* spp; *Giardia* spp; agricultural properties, vegetables.

SUMÁRIO

RESUMO	
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	9
3 OBJETIVO	68
3.1. Objetivo geral	68
3.2. Objetivos específicos	68
4 MATERIAL E MÉTODOS	70
4.1. Caracterização das propriedades agrícolas e critérios para avaliação das amostras de hortaliças e de água de irrigação	70
4.2. Coleta das informações sobre as condições sanitárias das propriedades	72
4.3. Colheita e análises parasitológicas das amostras de hortaliças e da água de irrigação	73
4.4. Experimento controle: análise da sensibilidade da metodologia empregada.	79
4.5. Exame dos fitonematóides detectados.	82
5 RESULTADO	83
5.1. Avaliação das condições sanitárias das UPAs – Unidade de Produção Agrícolas	83
5.2. Avaliação da contaminação das hortaliças e da água de irrigação	85
5.3. Avaliação da contaminação da água de irrigação	87
5.4. Experimentos controle	87
6 DISCUSSÃO	96
6.1. Produção agrícola do “cinturão verde” - Campinas (SP), com ênfase na horticultura	96
6.2. Hortaliças: otimização de métodos para detecção de oocistos e cistos em vegetais folhosos.	99
6.3. Presença de fitonematóides nas Unidades de Produção Agrícola - UPAs	107
6.4. Água de irrigação	110
7 CONCLUSÕES	116
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119

9 ANEXOS

Anexo 1. Características das Unidades de Produção Agrícola – UPAs.

Anexo 2. Termo de autorização: consentimento pós-informativo do produtor.

Anexo 3. Ordem dos sorteios para investigação das UPAs.

Anexo 4. Tabulação de dados das características das UPAs.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Unidades de Produção Agrícola – UPAs. da Região Metropolitana de Campinas (SP) selecionadas para estudo mediante sorteio e, dados de georreferenciamento.	72
Tabela 2. Avaliação da contaminação de amostras de hortaliças por oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. e cistos de protozoários, com ênfase em <i>Giardia</i> spp. pela técnica de Imunofluorescência Direta e pelo método de Faust., e por ovos e larvas de helmintos, no primeiro período de colheita em 2004.	89
Tabela 3. Avaliação da contaminação de amostras de hortaliças por oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. e cistos de protozoários, com ênfase em <i>Giardia</i> spp. pela técnica de Imunofluorescência Direta e pelo método de Faust., e por ovos e larvas de helmintos, no segundo período de colheita em 2004.	90
Tabela 4. Avaliação da contaminação de amostras de hortaliças por oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. e cistos de protozoários, com ênfase em <i>Giardia</i> spp. pela técnica de Imunofluorescência Direta e pelo método de Faust., e por ovos e larvas de helmintos, no terceiro período de colheita em 2005.	91
Tabela 5. Avaliação da contaminação de amostras de hortaliças por oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. e cistos de protozoários, com ênfase em <i>Giardia</i> spp. pela técnica de Imunofluorescência Direta e pelo método de Faust., e por ovos e larvas de helmintos, no quarto período de colheita em 2005.	92
Tabela 6. Densidade de cistos presentes em 100mL de água de lavagem de 50g de folhas de alface e/ou rúcula, recuperados mediante o método de filtração em membranas (FRANCO et al. 2001b) e visualização por imunofluorescência direta (RID) com anticorpos monoclonais ant- <i>Giardia</i> .	93
Tabela 7. Avaliação da contaminação de amostras de alface e rúcula por oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. e cistos <i>Giardia</i> spp. pela técnica de filtração em membrana e visualização por Imunofluorescência Direta a partir de experimentos controle.	93
Tabela 8. Avaliação da contaminação de amostras de água de irrigação por oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. e cistos <i>Giardia</i> spp. pela técnica de filtração em membrana e visualização por Imunofluorescência Direta a partir de experimento controle.	94
Tabela 9. Avaliação da contaminação de amostras de água de irrigação por oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. e cistos <i>Giardia</i> spp. pela técnica de filtração em membrana e visualização por Imunofluorescência Direta e dos parâmetros químicos e físicos .	95

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Dados sobre a Regional Agrícola de Campinas.	71
Figura 2. Unidade de Produção Agrícola VI – Campinas	81
Figura 3. Unidade de Produção Agrícola V – Campinas	81
Figura 4. Fitonematóide	82
Figura 5. Fitonematóide	82

1. INTRODUÇÃO

O crescimento da população mundial faz aumentar a necessidade de se produzir alimentos e buscar novas alternativas, e esta produção, para uma população que cresce é, sem dúvida, o desafio do novo século. Em razão desta crescente pressão antrópica sobre o nosso planeta, torna-se necessária a realização de estudos que apontem soluções para os inúmeros problemas que atingem o meio ambiente, nas mais diversas escalas de intensidade, mas que também, possam revelar as importantes transformações contemporâneas que lhe confere características modernas e que desenham um novo cenário de oportunidades.

Mudanças inerentes ao mundo moderno como a globalização, o desenvolvimento econômico, a rapidez dos meios de transportes, o aumento do comércio internacional, o surgimento de novos hábitos alimentares (TAUXE, 2002) e a existência de um ambiente altamente competitivo possibilita ao Brasil, cada vez mais, estabelecer o papel do agronegócio como uma estratégia de inserção na economia mundial.

O crescimento do consumo e da demanda global por produtos alimentícios, inclusive hortifrutigranjeiros, são fatores que ajudam a elucidar a questão da competitividade da produção agrícola no mercado nacional e internacional, bem como a redução da incidência da pobreza rural-urbana. Estes fatores são essencialmente dependentes da eficiência do cultivo de subsistência, e da introdução de tecnologias no sistema produtivo, numa busca crescente por alimentos de melhor qualidade (DA SILVA et al., 1999).

O Brasil é um país essencialmente agrícola. Apesar do grande desenvolvimento de outras áreas de atividades econômicas nas últimas décadas, ainda hoje a economia

brasileira baseia-se nas atividades agrícolas. Assim sendo, o Brasil se destaca no mundo como um dos maiores produtores de alimentos (RODRIGUES, 2005).

É nesse sentido que os “hortifrutigrangeiros” constituem uma “nova fronteira” global na produção de alimentos, tendo a olericultura como uma das atividades mais prósperas deste ramo em diversas regiões do mundo, e o meio rural se afigura como uma das mais promissoras dentre essas alternativas, oferecendo grandes possibilidades (MELO & VILELA, 2007).

Neste novo contexto, as divisões rural e urbano, indústria e agropecuária, entre outras formas de fixar fronteiras para separar mundos dicotômicos, perdem o sentido que possuíram (DA SILVA et al., 1999).

O setor da agricultura familiar apresenta uma grande diversidade: em relação ao seu meio ambiente, à situação e tipos de produtores, à aptidão às terras, à disponibilidade de infra-estrutura, ao acesso ao crédito, às variações econômicas, entre outros. Atualmente, pequenos produtores de “hortifrutigrangeiros”, também chamados “chacareiros” ou ainda de “pequeno produtor mercantil”, são responsáveis, a partir da produção de suas culturas, pelo abastecimento do mercado local e do seu próprio sustento (MELO & VILELA, 2007).

A popularidade dos alimentos frescos como os vegetais e as frutas, na dieta humana, continua aumentando significativamente. Em geral, esses produtos são considerados uma rica contribuição de proteínas, de baixas calorias, para uma dieta saudável e balanceada. No entanto, existem sérias preocupações quanto ao risco de acometimento da saúde do homem por consumo destes alimentos contaminados, principalmente aqueles que usualmente são ingeridos crus ou mal cozidos, por exemplo; os vegetais folhosos, como a alface e a rúcula.

Um fator primordial de qualidade diz respeito à segurança alimentar, traduzida pela ausência de riscos ao consumo, face às possibilidades de contaminação, quer por

organismos patogênicos, quer por resíduos tóxicos. O desafio para fortalecer a agricultura peri-urbana está em buscar estratégias para que esse “seguimento da população” funcione como um instrumento importante para contribuir com a segurança alimentar.

É neste contexto que pequenas e médias propriedades rurais que se desenvolveram em torno de grandes cidades, explorando uma agricultura voltada para a produção de hortifrutigranjeiros, estão atualmente sentindo os reflexos da deterioração dos recursos hídricos, o que representa um risco em potencial para a saúde pública. As populações que vivem nessas propriedades rurais são, em grande parte, de pouca escolaridade, e limitado acesso às informações sobre hábitos sanitários e de higiene, além de baixo poder aquisitivo. Essa condição aliada à produção de hortifrutigranjeiros irrigadas muitas vezes com água de má qualidade pode colocar no mercado produtos contaminados por organismos patogênicos, colocando em risco também a saúde de consumidores externos às propriedades rurais, o que pode acarretar surtos de gastroenterites, como já documentado em diversos países (DA SILVA et al., 1999).

A maioria dos surtos epidêmicos causados por alimentos e devidamente documentados está relacionada ao consumo de alimentos frescos. A preocupação com o controle das doenças diarréicas é mundial, agravando-se nos países em desenvolvimento, cuja carência de saneamento básico limita a prevenção e o controle da morbidade e mortalidade associadas a estas enfermidades (MEAD, 1999). A poluição fecal das águas provenientes das mais variadas atividades humanas tem desempenhado importante papel na disseminação de inúmeros parasitas intestinais no ambiente (FAYER et al., 2004).

O transporte e a disseminação de organismos patogênicos, facilmente dispersáveis pela água e por alimentos contaminados, têm representado um fator de risco no comprometimento dos recursos hídricos e na propagação de processos infecciosos para

diversas populações, sendo algumas destas doenças produzidas por protozoários parasitas. Entre os potencialmente patogênicos, estão *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., que podem ser veiculados pelos alimentos e pela água, atualmente denominados "parasitos emergente e re-emergente", estão ganhando grande importância devido ao aumento da incidência nos últimos tempos (FAYER, 2004).

Cryptosporidium spp. e *Giardia* spp. são enteroparasitas que produzem respectivamente, oocistos e cistos resistentes, que são eliminados no meio ambiente com as fezes de um portador (ROSE & SLIFKO, 1999). A transmissão pode ocorrer por contato direto (pessoa-a-pessoa), comumente observada em ambientes coletivos com grandes populações, tais como creches e hospitais, ou a transmissão pode ocorrer pela ingestão de alimentos e água contaminados.

As espécies de *Cryptosporidium* são parasitas de vertebrados, e causam criptosporidiose, considerada uma zoonose. Atualmente, é enquadrada também como uma antropozoonose.

A infecção provocada por *Cryptosporidium parvum* tem sido associada com alterações funcionais e estruturais do intestino delgado, porém a patogênese da diarreia, que é o sintoma predominante, não é até o presente, inteiramente compreendida (SODRÉ & FRANCO, 2001). As infecções assintomáticas ocorrem em indivíduos imunocompetentes e imunodeficientes (CURRENT, 1983). O largo espectro clínico produzido por esta infecção entérica em pacientes portadores de imunodeficiências, varia de um quadro assintomático a manifestações severas, com desidratação e má absorção. As infecções sintomáticas em pacientes imunocompetentes caracterizam-se por um quadro de diarreia aguda com duração de 1 a 2 semanas, dor abdominal, náuseas, vômitos e febre (SODRÉ & FRANCO, 2001). Isto ocorre devido à pequena dose infectante exigida (<10 oocistos, dependendo dos

isolados) para a contaminação do hospedeiro. Por outro lado, os oocistos de *Cryptosporidium* spp. são liberados em grandes quantidades provenientes de bezerros e dos humanos infectados ($>10^{10}$ durante as infecções crônicas ou agudas) (TZIPORI & WARD, 2002).

Giardia duodenalis é o protozoário intestinal mais comumente relatado no ser humano (THOMPSON, 2000; HOMAM & MANK, 2001). A *Giardia* spp. pode desenvolver danos e atrofia as microvilosidades (MAC DONALD & SPENCER, 1988) do intestino. Estas alterações estão relacionadas às deficiências enzimáticas da região epitelial e a má absorção, normalizadas, uma vez cessada a infecção. Por outro lado, sintomas que incluem a diarreia persistente, má absorção de gorduras, dores abdominais e a perda rápida de peso poderão ser observados em indivíduos infectados Estes sintomas estão relacionados a fatores do hospedeiro como a imunidade e a virulência da cepa do parasito, condicionando assim, a gravidade dos sinais clínicos (THOMPSON, 2000). Sua transmissão ocorre pela ingestão de alimentos ou água contaminados com cistos.

Com ampla dispersão no ambiente, os oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp., presentes nas fezes, são formas de resistência capazes de suportar as condições adversas do meio e a maioria dos desinfetantes rotineiramente utilizados para a descontaminação ambiental, permanecendo infectantes conforme as condições de umidade e temperatura (FAYER & NERAD, 1996; FAYER et al., 2000). Sobrevivem também ao tratamento convencional usado para tornar a água potável (filtração e cloração). Cistos e oocistos são refratários à etapa química do tratamento e resistem ao cloro. Quanto às águas subterrâneas, usualmente aplica-se somente a cloração, estando estas, propensas à contaminação por esgotos e à drenagem hídrica (FAYER et al., 2000; DILLINGHAM et al., 2002).

Tanto as águas, assim como os alimentos, causaram numerosos surtos epidêmicos de gastroenterites, durante os últimos 25 anos em países desenvolvidos e em desenvolvimento (CRAUN et al., 1998; OLSEN et al., 2000).

É importante ressaltar que a aquisição dos protozoários patogênicos *Cryptosporidium* spp, *Giardia* spp. e *Cyclospora cayetanensis* ocorre por ingestão de alimentos contaminados, principalmente, os vegetais folhosos e pequenas frutas silvestres, que são habitualmente ingeridos crus ou mal-cozidos (ORTEGA et al., 1997a; ROSE & SLIFKO, 1999; HERWALDT, 2000).

Comumente, a ocorrência de surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) está associada à presença de alguns fatores de risco, que podem ser identificados na inspeção sanitária e dentre os quais se destacam: consumo de alimentos acondicionados de forma inadequada; falhas nos processos de higienização de utensílios e equipamentos utilizados no preparo de alimentos; manipuladores de alimentos com práticas de higiene pessoal inadequadas ou portadores de lesões ou doenças ou ainda, contaminação de alimentos a partir de manipulação, favorecendo a contaminação a partir de superfícies ou, de resíduos; utilização de matérias-primas contaminadas quando de preparações alimentícias servidas cruas ou quando da ocorrência de mistura dessas com outros alimentos já cozidos; utilização de água cuja potabilidade não seja monitorada (fonte de abastecimento complementar); contaminação da água a partir da ocorrência de avarias na rede de abastecimento, construção ou reparo de tubulações, conexões cruzadas, inundações, efluentes de águas residuárias, entre outros (HOONSTRA & HARTOG, 2003).

A descarga de esgotos domésticos em águas de oceano e rios ainda constitui uma conduta bastante comum em vários países (ROBERTSON et al., 2000; XIAO et al., 2001; FARIAS et al., 2002). Tanto o esgoto tratado quanto o não tratado pode conter

concentrações significativas de patógenos, como *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., que sobrevivem no meio ambiente aquático, pois o tratamento do esgoto não remove 100% dos protozoários (FARIAS et al., 2002).

As hortaliças, em especial aquelas consumidas cruas, se irrigadas com águas contaminadas, podem servir de veículo para a transmissão de diversas doenças entéricas. Assim, torna-se importante analisar e fazer o controle sanitário das águas empregadas para a prática da irrigação, como prevenção para a saúde pública. A poluição das águas pelas fezes de alguns animais, também representa um importante fator na transmissão zoonótica de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp (FAYER et al., 2000). A drenagem hídrica das fezes de animais, no solo pode contaminar reservatórios de água e pode levar à contaminação dos alimentos frescos (BRIDGMAN et al., 1995).

Dados sobre a transmissão dos protozoários parasitas veiculados por alimentos são poucos e difíceis de serem documentados (FAYER et al., 2000), principalmente devido aos problemas inerentes a este tipo de pesquisa, como a avaliação retrospectiva, a dificuldade na obtenção das amostras, devido a curta vida dos vegetais, a disponibilidade das amostras e o pequeno número de agentes infecciosos usualmente presentes nesses alimentos (HERWALDT, 2000).

Na ausência de metodologia padronizada e validada para a análise microbiológica das amostras de alimentos, a maioria dos estudos existentes foi fundamentada em técnicas originalmente delineadas para a análise de amostras clínicas (fezes) ou hídricas (ROBERTSON & GJERDE, 2001b). Com as devidas adequações algumas destas técnicas poderão ser úteis para a detecção e identificação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. nos alimentos; entretanto o bom desempenho depende principalmente do pré-tratamento da amostra considerando que, nos alimentos frescos,

oocistos e cistos estão naturalmente presentes em baixos números. Portanto, há a necessidade do emprego de técnicas específicas de concentração e purificação, adequadas a este tipo de amostra com a finalidade de maior eficiência de recuperação dos parasitos (LABERGE et al., 1996).

Uma vez que são escassos os dados sobre a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em vegetais folhosos no Brasil e, particularmente, em unidades produtoras agrícolas da Região Metropolitana de Campinas, tornou-se relevante investigar a ocorrência destes protozoários causadores de gastroenterites em amostras de alface e rúcula bem como a presença destes organismos patogênicos em águas utilizadas nestas propriedades para a irrigação. Paralelamente efetuou-se uma investigação das condições sanitárias das Unidades de Produção Agrícola – UPAs selecionadas, para avaliação do potencial de risco de contaminação das hortaliças e dos recursos hídricos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. O gênero *Cryptosporidium* spp.: classificação, biologia e patogênese.

O gênero *Cryptosporidium* spp. foi descrito por Tyzzer em 1907, entretanto, somente 70 anos depois, este protozoário foi reconhecido como um importante agente patogênico intestinal humano (NIME et al., 1976).

Taxonomicamente, *Cryptosporidium* spp. pertence ao Phylum Apicomplexa; Classe Sporozoa; Sub-classe Coccidiasina; Ordem Eucoccidiorida; Família Cryptosporidiidae (LEVINE, 1988).

Cryptosporidium spp. é um organismo diminuto, variável em seu tamanho de acordo com as diferentes formas evolutivas, entre 2 a 6µm, apresentadas durante o seu ciclo vital monoxeno. O oocisto esporulado é o único estágio exógeno, consistindo-se de quatro esporozoítos livres envolvidos por uma parede de duas camadas, e é eliminado do corpo do hospedeiro infectado pelas fezes (CURRENT, 1985).

A fase endógena se inicia após o oocisto ter sido ingerido por um hospedeiro adequado. Os esporozoítos oriundos do oocisto, excistam e parasitam as células epiteliais do trato gastrointestinal ou respiratório. A extremidade anterior de cada esporozoíto excistado adere à superfície luminal da célula epitelial até que as microvilosidades possam envolvê-lo, tornando-o intracelular, porém extra-citoplasmático. A organela alimentar forma-se entre o parasito e o citoplasma da célula. Excetuando-se os merozoítos e os microgametas, que saem de uma célula do hospedeiro para invadirem outra célula, todos os estágios endógenos do parasito se localizam na superfície epitelial. Cada esporozoíto se diferencia em um trofozoíto esférico. A multiplicação assexuada, chamada de esquizogonia ou merogonia, acontece quando o núcleo do trofozoito se divide. Quanto ao *C. parvum*, os

esquizontes/merontes do tipo I desenvolvem 6 ou 8 núcleos, e cada um é incorporado no merozoita, um estágio estruturalmente similar ao esporozoíto. Cada merozoito maduro, teoricamente, deixa o esquizonte para infectar outra célula hospedeira e se desenvolver em um outro tipo de esquizonte/meronte I ou II, o qual produz 4 merozoitos. Imagina-se que apenas os merozoitos provenientes dos esquizontes do tipo II iniciem a multiplicação sexuada (gametogonia), ao infectar novas células hospedeiras, diferenciando-se nos estágios de microgamonte (masculino) e/ou de macrogamonte (feminino). Cada microgamonte se torna multinucleado e cada núcleo se incorpora no microgameta. Presume-se que apenas os macrogamontes fertilizados se desenvolvam em oocistos, que esporulam “*in situ*” e passam a conter 4 esporozoítos. Oocistos presentes no trato gastrointestinal são eliminados junto com as fezes, ao passo que aqueles presentes no trato respiratório saem do corpo através das secreções nasais ou respiratórias.

Os oocistos com paredes finas liberam esporozoítas que auto-infectam o hospedeiro, ao passo que aqueles com paredes mais espessas deixam o corpo do hospedeiro para infectar outros hospedeiros (CURRENT, 1985; 1988).

A auto-infecção, em que as fases sexuadas e assexuadas do ciclo de vida são repetidas dentro do mesmo hospedeiro, não é comum entre os coccídios. Apenas *Cryptosporidium* spp. e *Caryospora* sp. são coccídios cujos oocistos esporulam *in situ* e auto-infectam o hospedeiro (FAYER, 1997).

O período pré-patente varia de 2 a 14 dias dependendo do hospedeiro e das espécies de *Cryptosporidium*. Os períodos patentes experimentalmente determinados para o *C. parvum* vão de 2 a 12 dias para bezerros, 3 a 33 dias para cães, 5 a 14 dias para suínos, e de 1 a 20 dias para humanos (DUPONT, et al., 1995).

A infecção por *Cryptosporidium* spp. tem sido associada com alterações funcionais e estruturais do intestino delgado, porém a patogênese da diarreia, que é o sintoma predominante, não é até o presente, inteiramente compreendida (POWER, 1991). As interações iniciais de ligação, invasão e de formação do vacúolo parasitóforo são processos complexos que envolvem múltiplos ligantes do parasito e os receptores do hospedeiro.

Nos pacientes imunocompetentes, a maioria das infecções é auto-limitada e pouco se sabe sobre a taxa de infecção assintomática (BERN et al., 2002).

A criptosporidiose pode ser entérica, renal ou respiratória. O amplo espectro clínico causado pela infecção em pacientes imunodeficientes, oscila de assintomática a severa com desidratação e má absorção. A diarreia autolimitada é mais comum em pacientes com imunodeficiência discreta (SODRÉ & FRANCO, 2001). As manifestações clínicas observadas em um grupo de pacientes HIV positivo com criptosporidiose, pode desenvolver quadros fulminantes, de diarreia intensa e com eliminação de grandes volumes de fezes, principalmente, por pacientes com contagens de linfócitos CD4 inferiores a 50 células/mm³ e que apresente outras infecções oportunistas concomitantes (WEBER, et al., 1991; BOTERO, et al., 2003).

Em infecções maciças, muitos parasitos podem invadir áreas de epitélios vizinhos ao intestinal, como o trato biliar. A infecção do trato biliar é capaz de produzir dois tipos de síndromes: colangite esclerosante produzindo uma obstrução e dilatação dos ductos biliares intra e extra-hepáticos (CHIEFFI, et al., 1998); e síndrome da colecistite produzindo uma infecção da parede da vesícula biliar, que acomete indivíduos com Aids (LABARCA et al., 1992). Já, as infecções compreendendo o ducto pancreático são raras dependendo da cepa.

A infecção respiratória e pulmonar ocorre com alguma frequência, é geralmente observada em imunocomprometidos (BRADY et al., 1984; GIANG et al., 1994).

Dillingham et al., 2002, ressaltam a ocorrência de redução da condição física associada à diarreia precoce infantil, em crianças com 4 a 6 anos de idade, e, este efeito é mais pronunciado nos dois primeiros anos de vida.

No Brasil, estudos em comunidades pobres nas redondezas de Fortaleza (CE) revelaram que crianças em seus primeiros dois anos de vida podem sofrer influência em seu crescimento devido aos repetidos episódios diarréicos provocados pela criptosporidiose (ZU et al., 1994).

A transmissão de *Cryptosporidium* spp. ocorre por contato inter-pessoal via fecal-oral e, indiretamente por ingestão de água e alimentos contaminados com oocistos do parasito.

Atualmente, são registrados casos de criptosporidiose em 90 países e seis continentes (FAYER et al., 2000). Nos países desenvolvidos, as taxas de positividade para *Cryptosporidium* spp. situam-se ao redor de 2% enquanto nos países em desenvolvimento, foram registradas prevalências variáveis de 8% a 31,6% (ESTEBAN et al., 1998; FAYER et al., 2000).

O interesse mundial na criptosporidiose, não só por ser uma infecção zoonótica, levou a investigação dos vários surtos epidêmicos da doença, geralmente associados às visitas nas fazendas e aos zoológicos, ou através da contaminação pela água potável, o que levava a se acreditar que está última, ocorria devido à contaminação por animais de criação.

De 1984 a 2000, 56 surtos de criptosporidiose causada pela veiculação hídrica foram relatados nos Estados Unidos afetando cerca de 434.676 pessoas (LEVINE & WILLIAM, 1990; CRAUN et al., 1998; FAYER et al., 2000). No mesmo período, países como Reino Unido, Canadá, Japão, Itália, Nova Zelândia e Irlanda do Norte registraram um total de 47 surtos (GLABERMAN et al., 2002; FAYER, 2004). As águas destinadas ao

consumo humano foram responsáveis por 59,2% de todas estas ocorrências e aquelas utilizadas para recreação, 40,7%.

Até o momento, o surto epidêmico de veiculação hídrica identificado em Milwaukee, Wisconsin, EUA em 1993, cujo agente etiológico foi *Cryptosporidium* spp., confirmou-se como o mais expressivo dos surtos, e afetou aproximadamente 403.000 pessoas causando 100 mortes (MACKENZIE et al., 1994). PENG et al., (1997), confirmaram, porém, o *Cryptosporidium hominis* como o verdadeiro agente etiológico deste surto.

2.1.1. *Cryptosporidium* spp.: aspectos epidemiológicos.

A criptosporidiose é uma infecção ubíqua, que tem sido descrita nos animais e no homem (PENG et al., 1997; THOMPSON, 2003; HUNTER & THOMPSON 2005; CACCIÒ et al., 2005; FELTUS et al., 2006).

Contemporaneamente, a descoberta mais importante por meio de estudos biológicos, genéticos e ferramentas moleculares, foi o achado em que o *Cryptosporidium parvum* é um complexo de espécies (PENG et al., 1997; CACCIÒ et al., 2005; HUNTER & THOMPSON, 2005). Existindo assim, dois genótipos distintos de *Cryptosporidium* spp. que infectam o homem, agora reconhecidos como espécies: *Cryptosporidium hominis*, que até o momento tem sido encontrado em humanos, peixe-boi marinho, em bovinos e, experimentalmente em macacos e, *Cryptosporidium parvum* que infecta os animais de criação e domésticos como vacas, ovelhas, cabras, assim como no homem (FAYER et al., 2000).

Pelo menos, sete espécies e dois genótipos de *Cryptosporidium* spp. podem causar doenças em humanos (CACCIÒ et al., 2005): *Cryptosporidium hominis*, *C. parvum*, *C.*

meleagridis, *C. felis*, *C. canis*, *C. suis*, *C. muris*, e dois genótipos de *Cryptosporidium* (macaco e cervídeo).

As espécies *C. hominis* e *C. parvum* são os principais agentes etiológicos causadores dos numerosos surtos de veiculação hídrica ao redor do mundo, sendo que *C. hominis* predomina nos ambientes urbanos enquanto *C. parvum* ocorre no meio rural. *C. meleagridis*, um parasito específico de aves (MONIS & THOMPSON, 2003) é, nos dias de hoje, considerado como uma espécie emergente sendo responsável por 11% das infecções em indivíduos imunocomprometidos (CACCIÒ et al., 2005).

2.2. O gênero *Giardia* spp.: classificação, biologia e patogênese.

Giardia duodenalis é um protozoário eucariótico unicelular flagelado comum no intestino do homem, que causa doenças gastrointestinais com freqüência em todo mundo. O parasito foi observado pela primeira vez por Van Leeuwenhoek em 1681 nas suas próprias fezes, tendo sido mais tarde designado de *Cercomonas intestinalis* em 1859. Posteriormente, foi-lhe atribuído o nome de *Lambliia intestinalis* por Blanchard em 1888 e a designação *Giardia lamblia* foi aceita a partir de 1970 (KULDA & NOHÝNKOVÁ, 1995).

Giardia spp. em termos de classificação taxonômica pertence ao Reino dos Protistas, sub-reino Protozoa, Filo Sarcomastigophora, sub-filo Mastigophora, Classe Zoomastigophora, Ordem Diplomonadida, Família Hexamitidae (CAVALIER-SMITH, 1987; CORLISS, 1994).

Existem atualmente seis espécies reconhecidas de *Giardia* spp., com apenas uma delas, *Giardia duodenalis*, conhecida por infectar múltiplas espécies de hospedeiros (THOMPSON, 2000).

Giardia spp. durante seu ciclo vital apresenta duas formas distintas: trofozoíto e cisto. O trofozoíto mede aproximadamente 10 a 12µm de comprimento, 5 a 9µm de largura e 1 a 2µm de espessura. O trofozoíto apresenta um achatamento dorso ventral, quando observado lateralmente, encontrando-se nos dois terços da superfície ventral uma área ovóide, côncava, denominada disco estriado ou disco ventral. Possui dois núcleos iguais, equivalentes na quantidade de DNA e na atividade de transcrição (KABNICK & PEATTIE, 1990), corpos medianos e quatro pares de flagelos livres (anterior, caudal, posterior e ventral) que emergem das duas fibras longitudinais ou axonemas. No citoplasma estão presentes ribossomos, glicogênio e vacúolos lisossomais. O aparelho de Golgi torna-se visível nos trofozoítos durante o encistamento (REINER et al., 1990; GILLIN & REINER, 1996), embora outras organelas presentes nos encariotas, como mitocôndrias, peroxissomas e nucléolos não tenham sido, ainda, identificados (ADAM, 2001).

O cisto é a forma infectante e também de disseminação de *Giardia* spp. para o hospedeiro e para o meio ambiente, respectivamente. Esta estrutura apresenta uma forma ovóide ou elipsóide, mede cerca de 7 a 10µm de comprimento e é revestida por uma fina parede de 0,3µm de espessura, composta por filamentos de 7 a 30nm de largura. No interior do cisto encontram-se os axonemas flagelares, vacúolos, ribossomos, grânulos de glicogênio, fragmentos do disco e quatro núcleos pequenos (KULDA e NOHÝNKOVÁ, 1995).

O ciclo de vida da *Giardia* spp. é monoxênico. A infecção se inicia pela ingestão do cisto por meio da água e alimentos contaminados ou pela via direta fecal-oral ou anal-oral. Os cistos ingeridos pelo hospedeiro, expostos às enzimas e pH ácido do estômago, desencistam nas primeiras porções do intestino delgado dando origem aos trofozoítos (BINGHAM & MEYER, 1979). Após a eclosão, o trofozoíto alonga-se e inicia-se a

citocinese formando-se dois trofozoítos (BUCHEL et al., 1987). Após o desencistamento, o trofozoíto adere à mucosa intestinal e multiplica-se assexuadamente por divisão binária longitudinal. Os trofozoítos são formas muito sensíveis não conseguindo sobreviver no meio exterior e, assim, quando as condições do “habitat” sofrem alterações de pH, tensão de oxigênio e temperatura, o trofozoíto encista. O encistamento tem lugar geralmente no baixo íleo e, reproduzindo-se as condições aí existentes, foi possível seguir este processo *in vitro* tendo-se verificado um ótimo encistamento na presença de sais biliares, ácidos glicólico e mirístico, a pH 7,8 (GILLIN et al., 1987, 1989).

Durante o processo de encistamento, os trofozoítos tornam-se arredondados e destacam-se do substrato, perdendo a mobilidade flagelar. As células ficam refráteis, os núcleos dividem-se e forma-se uma parede resistente. A microscopia eletrônica revela que antígenos específicos dos cistos aparecem no aparelho de Golgi ao final de 5 horas de indução do encistamento e que ao fim de 6 a 18 horas, esses antígenos aparecem armazenados em vesículas secretoras específicas (ESVs) que os transportam para a periferia de modo a integrarem a parede do cisto (GILLIN & REINER, 1996). A formação das ESVs é a primeira alteração visível ao microscópio óptico. Após 44 a 77 horas de encistamento a parede fica concluída e os dois núcleos dividem-se simultaneamente, produzindo um cisto maduro com quatro núcleos (GILLIN et al., 1987; SCHUPP et al., 1988; REINER et al., 1990). Os cistos são eliminados juntamente com as fezes do hospedeiro e, uma vez ingeridos por um hospedeiro susceptível, por via direta fecal-oral, ou indireta por veiculação hídrica e/ou alimentar, inicia-se um novo ciclo.

O espectro da infecção provocada por *Giardia duodenalis* é na grande maioria das vezes assintomática e não invasiva e, por isso, só em 1981 a OMS considerou o protozoário na lista dos parasitos patogênicos. As manifestações observadas durante a giardiose variam

desde a infecção assintomática à diarreia crônica com má absorção. O período de incubação é normalmente de 12 a 19 dias culminando com a primeira detecção de cistos nas fezes. Os sintomas da fase aguda desaparecem, normalmente, em alguns dias e a infecção pode ser suprimida em 2 a 6 semanas. Contudo, em alguns casos e independente das condições imunológicas dos hospedeiros estarem normais ou não, a fase aguda evolui para a fase crônica e a sintomatologia manifesta-se por curtos e recorrentes períodos. Os indivíduos que apresentam cistos nas fezes sem haver sintomatologia representam importantes reservatórios na disseminação da infecção (SMITH, 1985; ADAM, 1991; THOMPSON et al., 1993).

A variabilidade dos sintomas clínicos observados na giardiose humana exhibe uma característica patogênica dominante que é a deficiência das funções digestivas e absorptivas dos enterócitos devido a alterações da área de superfície das microvilosidades, mais grave na área do intestino colonizada pelo parasito, ou seja, nas primeiras porções do intestino delgado. As células epiteliais da área afetada são vacuolizadas e comprimidas e por vezes danificadas. Ocorrendo o encurtamento dos enterócitos, resultando numa diminuição considerável da área de superfície da mucosa intestinal (BARBIERI et al., 1970).

O grau das alterações patológicas do intestino delgado na giardiose tem sido relacionado à sintomatologia. As manifestações mais significativas da mucosa intestinal e o maior número de parasitas têm sido associados, e relacionados à diarreia e má-absorção com atrofia total ou parcial das vilosidades (SMITH, 1985).

Giardiose é comum entre crianças que frequentam creches, no mundo (HOMAN & MANK, 2001; THOMPSON, 2000). Os fatores de risco investigados são as variáveis relacionadas às características das creches, ao histórico familiar e condições sócio-

econômicas das crianças (FRANCO & CORDEIRO, 1996; GUIMARÃES & SOGAYAR, 2002; MALTA et al., 2002, SCHNACK et al., 2003).

A má absorção da lactose é freqüente em crianças com giardiose sintomática (TOLBOOM et al., 1987), podendo contribuir para os distúrbios gastrointestinais (diarréia, flatulência e desconforto abdominal) comuns da infecção. Contribui significativamente para o retardo no crescimento devido à deficiência nutricional decorrente da não absorção de vitaminas lipossolúveis pelo hospedeiro infectado (ORTEGA & ADAM, 1997b).

Pode ocorrer infecções assintomáticas, especialmente em crianças e em indivíduos que tiveram contato prévio com o protozoário em infecções anteriores, com eliminação de cistos nas fezes de forma intermitente durante semanas ou meses, resultando em um período prolongado de disseminação do patógeno no ambiente (CDC, 2000).

A resposta imune inflamatória ao parasito pode contribuir para o dano epitelial observado durante a giardiose. A atrofia das vilosidades, a hiperplasia das criptas e a resposta celular na lamina própria, alterações comuns na giardiose, são semelhantes às lesões da mucosa associadas as desordens do intestino delgado. Em infecções experimentais por *C. muris* em um murganho atímico nu/nu e imunocompetentes BALB/c verificou-se que a atrofia das vilosidades parece ser mediada pela ativação de linfócitos T (ROBERTS-THOMPSON & MITCHELL, 1978; BURET et al., 1990; HIL, 1990; SCOTT et al., 2000).

No homem verificou-se que o desenvolvimento da sintomatologia da giardiose estava associado a deficiências no sistema imunitário humoral (FAUBERT, 2000). Observou-se uma elevada incidência de giardiose em indivíduos com hipogamaglobulinemia (WRIGHT et al., 1977) e as lesões nas vilosidades foram mais acentuadas em indivíduos imunodeficientes (AMENT e RUBIN, 1972; HARTONG et al.,

1979; FERGUNSON et al., 1990). No entanto, o grau das alterações patológicas nas vilosidades em indivíduos portadores de aids e parasitados com *Giardia duodenalis* foram semelhantes aos indivíduos imunocompetentes (FAUBERT, 2000). Os indivíduos com aids não são mais susceptíveis à giardiose (SMITH et al., 1988).

A terapêutica da giardiose tem apontado alguns problemas devido à elevada incidência de efeitos secundários e recidivas frequentes (UPCROFT & UPCROFT, 2001). Muitos fármacos têm sido utilizados, como os nitroimidazóis, furazolidona, paramomicina (GARDNER & HILL, 2001; UPCROFT & UPCROFT, 2001). O metronidazol é o fármaco recomendado pela OMS e é considerado como o fármaco de primeira escolha no tratamento da giardiose em muitos países (UPCROFT & UPCROFT, 1993).

A Organização Mundial de Saúde – OMS estimou 3,5 bilhões de pessoas no mundo são parasitadas, dentre elas 800 milhões têm giardiose. Nos países desenvolvidos os portadores de *Giardia* spp. são estimados entre 2 a 7% e nos países em vias de desenvolvimento as taxas de infecção podem atingir 5 a 50% da população (OMS, 2005).

Atualmente, cerca de 200 milhões de pessoas na Ásia, África e América Latina têm giardiose sintomática e 500.000 novos casos ocorrem a cada ano (THOMPSON, 2000).

O primeiro surto epidêmico de giardiose comprovadamente de origem hídrica foi relatado em 1965, em Aspen, Colorado (EUA) onde um levantamento realizado entre 1994 esquiadores entravam em contato diário com esgotos domésticos (ROSE & SLIFKO, 1999).

O levantamento da ocorrência das doenças de veiculação hídrica é importante para a melhora da qualidade da água utilizada para consumo, para produção e para recreação. Entretanto, nem sempre os surtos são reconhecidos, investigados, relatados e notificadas à vigilância epidemiológica.

2.2.1. *Giardia* spp.: aspectos epidemiológicos.

Hoje, *Giardia* spp. é um dos organismos mais amplamente estudados, não somente por sua ubiquidade como parasita mas, também, pela sua importância na biologia evolucionária e genética molecular.

A *Giardia* spp. possui uma larga faixa de hospedeiros e é frequentemente encontrada em animais domésticos, especialmente animais de criação, cães e gatos, além de numerosas espécies de mamíferos selvagens e aves, embora consequências adversas e infecções por *Giardia* spp. e seu potencial patogênico, tenham sido melhores determinados no homem. Apesar do amplo conhecimento sobre a transmissão, a veiculação hídrica deste patógeno e a sua importância para a saúde pública, o papel da transmissão zoonótica na epidemiologia das infecções humanas por *Giardia* spp. ainda não foi solucionado (THOMPSON, 2004).

Os isolados de *Giardia* spp. recuperados de humanos se encaixam em um dos dois principais agrupamentos ou assembléias, que distribuídos mundialmente, compreendem vários genótipos e são amplamente referidos como Assembléias A e B (THOMPSON, 2004).

A Assembléia A consiste de isolados que podem ser encontrados em dois grupamentos (subgrupos) distintos, Subgrupo AI compreende uma mistura de isolados humanos e animais bem relacionados, e que têm se destacado pelo seu potencial zoonótico. Em contraste, o Subgrupo AII consiste inteiramente de isolados humanos. A Assembléia B, compreende dois subgrupos, III e IV, dos quais o último parece ser específico para o ser humano (THOMPSON, 2004).

Atualmente, têm sido propostos agrupamentos genéticos adicionais para os isolados de *Giardia* spp. provenientes de vários mamíferos. Embora morfologicamente idênticos aos

isolados humanos de *Giardia* spp., apresentam seqüências das regiões que codificam proteínas diferentes (EY et al., 1997; HOMAN et al., 1998; HOPKINS et al., 1997; O'HANDLEY et al., 2000).

A incerteza do potencial zoonótico de *G. duodenalis* torna complexa a questão, em função das numerosas rotas de transmissão e baixas doses infectantes para os hospedeiros (CACCIÒ et al., 2005). Assim, o papel dos animais na transmissão para humanos e as rotas mais prováveis de infecção permanecem incertos (CACCIÒ et al., 2005).

2.3. Surtos de criptosporidiose e giardiose relacionados ao consumo de alimentos.

As ocorrências de Doenças Transmitidas por Alimentos – DTA vêm aumentando de modo significativo em nível mundial e vários são os fatores que contribuem para a emergência dessas doenças, dentre os quais se destacam o crescente aumento das populações, vulneráveis ou expostas, os processos de urbanização desordenados, a necessidade de produção em grande escala de alimentos e com o deficiente controle dos órgãos públicos e privados no tocante a qualidade dos alimentos ofertados às populações (FORSYTHE, 2002).

Aos fatores citados, acrescentam-se outros determinantes nas incidências das doenças transmitidas por alimentos (DTAs), tais como o aumento do número de estabelecimentos que comercializam alimentos prontos para consumo (“*fast-foods*”) e pela aquisição de alimentos em vias públicas adquiridos de vendedores ambulantes, sem as devidas condições de higiene, a mudança de hábitos alimentares (aumento do consumo de frutas e verduras “*in natura*” e/ou minimamente processados); sem deixar de considerar as facilidades atuais de deslocamento da população, inclusive em nível internacional. Mudanças inerentes ao mundo moderno como a globalização, o aumento do comércio

mundial, a rapidez dos meios de transportes e as crescentes viagens internacionais, têm elevado o risco de disseminação de agentes infecciosos através das fronteiras (TAUXE, 2002). A exportação de gêneros alimentícios de diferentes regiões geográficas podem facilitar a transmissão de patógenos, a partir do ponto da produção primária, do processamento e embalagem, de forma efetiva para grandes distâncias.

Uma a cada três pessoas, em países industrializados, anualmente, é afetada por doenças veiculadas por alimentos e pela água, resultando em sofrimento humano e perdas econômicas. A Organização Mundial de Saúde (OMS) assinala 250 enfermidades diferentes implicadas na propagação pela água e alimentos, e constata ao redor de 3,4 milhões de pessoas, crianças em sua maioria, morrem a cada ano, vítimas de doenças adquiridas pela contaminação por estas vias, e ainda, aproximadamente 2,2 milhões por infecções diarréicas vinculadas a serviços insuficientes de saneamento, higiene e abastecimento de água. Calcula-se que nos Estados Unidos, o total das principais doenças de origem alimentar ocasionem, a cada ano, 76 milhões de casos (MEAD *et al*, 1999).

O primeiro surto epidêmico de criptosporidiose veiculado por alimentos, foi reportado no ano de 1993, atingindo 154 pessoas de um total de 284 que ingeriram suco de maçã contaminado, em Maine (Inglaterra). Desde então, outros surtos associados aos alimentos como: salada de frango no Estado de Minnesota no ano de 1995; suco de maçã em New York, 1996, foram registrados e, também o parasito foi associado ao consumo de cebolinhas verdes na cidade de Washington, em 1997 (ROSE & SLIFKO, 1999).

Vários surtos de giardiose de veiculação alimentar relacionados ao preparo de alimentos foram documentados, causados por manipuladores de alimentos contaminados ou pelo contato destes profissionais com indivíduos infectados (PORTER *et al.*, 1990; MINTZ *et al.*, 1993).

Muitos casos provavelmente são esporádicos e podem ocorrer surtos de giardiose alimentar que não são reconhecidos. Smith relaciona que 3850 casos de giardiose de veiculação alimentar ocorrem a cada ano no Canadá, com custos anuais de até 19,7 milhões de dólares. A extensão da giardiose de veiculação alimentar nos EUA é estimada em 7 mil casos ao ano (SMITH, 1993; THOMPSON et al., 2000; DAWSON, 2005).

O primeiro surto de giardiose ocasionado pela ingestão de alimentos contaminados nos EUA, foi descrito em 1979 e foi relacionado ao alimento preparado por um portador assintomático o qual cuidava de crianças, em uma escola (ROSE & SLIFKO, 1999).

Segundo dados fornecidos pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC, EUA), de 17 surtos ocorridos entre 1988 e 1992, devido à veiculação de um agente parasitário por alimentos, 41% tiveram como etiologia o protozoário *Giardia* spp. (ROSE & SLIFKO, 1999).

O preparo de alimentos, que envolva calor por um certo tempo, provavelmente torna não infectante os cistos de *Giardia duodenalis*, porém o efeito de outros procedimentos como a fermentação e processos sem o uso do calor, como a simples lavagem, não são reconhecidos em suas ações sobre a destruição ou eliminação dos cistos (SMITH, 1993).

A *Giardia* spp representa um risco para os sistemas de abastecimento de água devido a sua resistência ao cloro (DAWSON, 2005). Visto que, a dose mínima de *Giardia* spp. responsável pela infecção do hospedeiro é bem baixa, aproximadamente 10 cistos. É de se surpreender que não seja estimado um número maior de surtos de giardiose por veiculação alimentar. É provável que estes surtos ocorram comumente, porém, não seja frequentemente detectados e notificados (SMITH, 1993; DAWSON, 2005).

2.4. *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. no ambiente: aspectos relevantes da transmissão e disseminação.

Cryptosporidium spp. e *Giardia* spp. estão presentes no ambiente na forma de oocistos e cistos que lhes confere a capacidade de sobreviver sob as mais variadas condições ambientais (FAYER, 1997).

A resistência dos oocistos e cistos aos desinfetantes comumente utilizados como amônia, cloro, hipoclorito de sódio, limita a existência de um tratamento efetivo para eliminar estes patógenos do ambiente (CAMPBELL et al., 1982; MEDEMA et al., 1998; ROBERTSON, et al., 2000; WEIR et al., 2002). O tamanho reduzido de oocistos e cistos, assim como a flexibilidade aparentemente existente em patógenos como *Cryptosporidium* spp., facilita a passagem dos mesmos nos processos de filtração efetuados durante o tratamento da água para abastecimento (ROSE et al., 1988).

O ozônio tem sido indicado, como um dos mais importantes desinfetantes químicos na inativação de oocistos (FAYER, 1997). Porém, como a exposição necessária para se conseguir a inativação é alta, há a geração de subprodutos (CRAIK et al., 2000). Com este problema, a luz UV tem recebido mais atenção, sendo promissora por não gerar subprodutos. Por outro lado, pesquisas têm sido realizadas para avaliar os limites de sobrevivência de oocistos e cistos expostos ao calor, frio, dessecação e irradiação ultravioleta.

Temperaturas superiores a 64,2°C por 5 minutos e 72,4°C por 1 minuto inativam os oocistos, e estes podem resistir ao congelamento a -20°C por longos períodos, mas não sobrevivem a -70°C (FAYER, 1994, 1997; FAYER & NERAD, 1996; WALKER et al., 2001, XUNDE et al., 2005). Segundo Fayer & Nerad (1996), temperaturas abaixo de zero

propiciam a formação de uma camada de gelo que isola a superfície do ar mais frio, fazendo com os oocistos sobrevivam por semanas até meses.

Bingham & Meyer (1979) empregaram a excitação “*in vitro*” para investigar o efeito da temperatura sobre a infectividade dos cistos de *Giardia* spp , e demonstraram que cistos armazenados a 37°C nunca sobreviveriam mais que 4 dias, ao passo que, cistos armazenados a 8°C são infectantes por até 77 dias. Segundo LeChevallier et al. (1991), *Giardia* sobrevive por longos períodos no ambiente, na água, e sobrevivem mais tempo em baixas temperaturas (0,5°C). Porém, hoje o único método aceito para avaliar a capacidade infectante dos cistos de *Giardia* é o bioensaio em camundongos, gerbil ou cobaias, verificando-se a reprodução do ciclo deste protozoário nos animais (SANTOS, 2007)

A inativação de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. depende de danos metabólicos ou estruturais sofridos pelas isoenzimas, da temperatura, e também da intensidade de radiação solar, além da presença de microflora autóctone e da predação (MEDEMA et al., 1998). E tudo isso é influenciado por vários fatores biológicos, hidrodinâmicos, de sedimentação, ligação dos oocistos e cistos às partículas suspensas na coluna de água, e da sobrevivência dos mesmos (MEDEMA, et al., 1998).

Quando estes são infectantes, o risco para a saúde pública é enorme. Portanto a determinação da infectividade de tais organismos torna-se fundamental, e tem recebido muita atenção nos últimos anos (CAMPBELL et al., 1992).

A investigação de vários parâmetros físico-químicos acerca da sobrevivência dos oocistos e cistos relata que em contato com fezes, estes patógenos tornam-se mais resistentes às pressões ambientais. É possível que o material fecal forneça proteção contra a dessecação dos mesmos prolongando assim, a sua capacidade de sobrevivência e infectividade no ambiente (FAYER, 1997).

Cryptosporidium spp. e *Giardia* spp. são mantidos em vários ciclos de transmissão que podem ser preservados independentemente e não requerem interação entre eles. Assim, *Giardia* spp. mantém ciclos independentes envolvendo os animais domésticos e de vida selvagem. Da mesma forma, *Cryptosporidium* spp. envolve animais de criação, especialmente bovinos (HUNTER & THOMPSON, 2005).

A relação entre as infecções animais e humanas, têm sido uma questão que tem dominado grande parte das pesquisas e do esforço para a compreensão da epidemiologia da *Giardia* spp. e do *Cryptosporidium* spp. Visto que ambos os organismos podem ser veiculados e transmitidos pela água esta fonte de contaminação permanece como uma questão crítica para as autoridades que fazem o tratamento do sistema de abastecimento de água em todo o mundo (FAYER, 2004; THOMPSON, 2004). O papel que as infecções animais podem desempenhar neste sentido permanece controverso, particularmente com relação aos animais de criação e os de vida selvagem, devido ao seu potencial como reservatório zoonótico da infecção (MONIS & THOMPSON, 2003)

Giardia spp. de vários grupos tem demonstrado, por muitos anos, um potencial zoonótico controverso. O gado é susceptível a infecção transitória com genótipos zoonóticos, em que a frequência de transmissão pelo genótipo bovino é alta, e a competição provavelmente ocorre. Os cães domésticos são susceptíveis a infecção por *G. duodenalis* grupo C, ou *G. canis*, em situações onde os humanos e os cães vivam bem próximos (TRAUB et al., 2004). Apesar da frequência com que pacientes infectados têm animais de companhia em casa, raramente são implicados como a fonte de infecção (CACCIÒ et al., 2005).

Por outro lado, a transmissão humana/humana por *Giardia* spp. frequentemente ocorre indiretamente através da ingestão acidental de cistos presentes em água ou alimentos

contaminados, ou diretamente em ambientes onde os níveis de higiene possam estar comprometidos, tais como: creches ou os estabelecimentos de repouso ou tratamento (asilos e escolas especiais) (THOMPSON, 2004).

Estudos realizados para a presença de giardiose esporádica, apontam os principais fatores de risco: o ato de ingerir água de torneira (tratada com ineficiência), contato com água recreacional (natação) e ingestão de alimentos crus (ROSE & SLIFKO, 1999).

Os cistos de *Giardia* spp. sobrevivem menos na água bruta que os oocistos de *Cryptosporidium* spp., embora sejam geralmente detectados com mais frequência e com maior abundância tanto na água potável como bruta. A associação com o consumo de alface e outros vegetais folhosos além de frutas silvestres, ressalta o relevante papel do esgoto contaminado, o uso de fezes de animais como fertilizante, além da contaminação direta dos produtos por vetores mecânicos como moscas e aves (CACCIÒ et al., 2005).

Relatos anteriores sobre a criptosporidiose humana chamaram a atenção para a transmissão zoonótica por contato com animais jovens infectados (bovinos ou caprinos) e para o consumo de água contaminada pelos animais de criação. Estudos moleculares indicam que a proporção das infecções provocadas por *C. parvum* em humanos, é muito maior nas áreas rurais que nas áreas urbanas (citado por CACCIÒ et al., 2005).

Parece haver uma associação estacional entre o surgimento de surtos diarréicos produzidos por *Cryptosporidium* spp. e os meses quentes do ano. Uma variação sazonal acentuada da doença foi descrita no Reino Unido, revelando um pico máximo durante a primavera, e um segundo pico durante o final do verão até o início do outono (MCLAUHLIN et al., 2000). O pico máximo da primavera é praticamente restrito ao *C. parvum*, ao passo que *C. parvum* e *C. hominis* ocorrem no fim do verão (CACCIÒ et al., 2005).

Embora os bovinos tenham sido implicados como fonte de surtos de criptosporidiose de veiculação hídrica, a genotipagem de isolado(s) em questão com frequência tem implicado o efluente de origem humano como notória fonte de disseminação dos patógenos *Cryptosporidium* spp. (CACCIÒ et al., 2005) e *Giardia* spp. (SANTOS et al., 2004).

2.4.1. Ocorrência de oocistos e cistos em esgoto e nas águas superficiais.

A atividade diária do homem gera diversos resíduos, e o esgoto doméstico é um deles, este deve ser coletado e tratado produzindo o efluente que volta aos rios. O esgoto oriundo da população humana e animal pode apresentar patógenos como cistos e oocistos de protozoários, ovos e larvas de helmintos, bactérias e vírus. Assim, cuidados pessoais e na manipulação de dejetos do homem e/ou de animais, eliminação sanitária das fezes, descarte correto de material contaminado, são fundamentais no controle de patógenos no ambiente (FAYER et al., 2004).

Oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. são disseminados por indivíduos infectados ou por animais, e entram nas águas superficiais por meio da descarga de esgotos, de forma direta ou indireta com ou sem tratamento, e também pelos sedimentos lançados pela agricultura por ocasião da irrigação de plantações (FAYER et al., 2004). Assim, gera o transporte de ambos provenientes das águas contaminadas, para áreas recreacionais onde as pessoas se banham, para pontos de desvios da produção de água potável, e lugares onde os animais de criação, domésticos ou selvagens, costumam estar em contato ou ingerir a água (MEDEMA et al., 1998).

A descarga de esgotos domésticos em águas de oceano e rios ainda constitui uma conduta bastante comum em países do mundo todo (ROBERTSON et al., 2000; XIAO et

al., 2001; FARIAS et al., 2002). Tanto o esgoto tratado quanto o não tratado pode conter concentrações significativas de patógenos, como *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., que aí sobrevivem no meio ambiente aquático (FARIAS et al., 2002). No esgoto bruto, os patógenos humanos atingem números elevados. Se os efluentes finais ainda contiverem uma grande fração destes patógenos, eles representarão um fator de risco para a saúde pública (FEACHEM et al., 1983). Em geral, cerca de 80% a 90% dos protozoários patogênicos presentes no afluente são removidos pelos processos de tratamento de esgoto, sendo que a digestão aeróbica é reconhecidamente mais eficiente na remoção de patógenos do que a digestão anaeróbica (CHAURET et al., 1999; MATURAMA et al., 1992)

Tem sido reportado que a recuperação e enumeração de patógenos entéricos do esgoto podem ser usadas como indicador do nível de doenças dentro de uma comunidade (JAKUBOWSKI, 1991). No Brasil, os serviços de esgotamento sanitário só estão disponíveis para 52,2% dos municípios brasileiros. Considerando a carência de investimentos na captação, tratamento e distribuição da água e esgotos, comprova-se que 25% dos domicílios brasileiros não são atendidos por rede de água, apenas 45% das residências brasileiras possuem coleta de esgoto e somente 20% do esgoto é tratado (FUNASA/IBGE, 2000). Segundo Cattaneo (2007) no mundo atual, 1,1 bilhões de pessoas não têm acesso a água potável, e 2,6 bilhões não dispõem de saneamento básico.

As investigações realizadas sobre as concentrações de oocistos e cistos no esgoto tratado ou bruto revelam que a ocorrência destes patógenos aí presentes é bastante variável em função do tamanho da população ou atividade humana, especialmente em amostras dos afluentes (CARRARO et al., 2000) e, há que se considerar a concentração de sólidos suspensos nas amostras analisadas que pode afetar a interpretação dos resultados (MEDEMA et al., 1998). Os valores compreendem de 10^2 a 10^4 oocistos/L e de 10^3 a 10^5

cistos/L em amostras de esgoto bruto, e em torno de 10 a 10³ para ambos os patógenos isolados do esgoto tratado (JAKUBOWSKI, 1991; CHAURET et al., 1995; BUKHARI et al., 1997; FARIAS et al., 2002; SANTOS et al., 2004). É importante considerar que, geralmente os cistos de *Giardia* spp. são detectados em maiores concentrações que os oocistos de *Cryptosporidium* spp. nos afluentes de esgotos, entretanto, é difícil inferir esta questão pois os métodos de amostragem, purificação e de detecção são distintos (CARRARO et al., 2000), em relação aos efluentes.

Roach et al (1993) descreveram as prevalências de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em amostras de esgotos em Yukon – Canadá, relatando concentrações de até 333 oocistos e de 3.511 cistos por litro respectivamente.

Santos et al. (2004) avaliaram a presença de oocistos e cistos em amostras de lodo ativado de uma ETE - Estação de Tratamento de Esgotos em Campinas/SP - Brasil, e, considerando a detecção de alta concentração destes protozoários, recomendaram a avaliação prévia do lodo ativado, antes de sua aplicação na agricultura, fosse solicitada.

A ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em água de esgotos e córregos da cidade de São Paulo foi avaliada por Farias et al. (2002), que detectaram 100% de positividade, em concentrações que variaram de 50 a 1200 oocistos por litro em esgoto bruto e de 48 a 1400 oocistos por litro em córregos.

O controle dos oocistos e cistos em água de abastecimento público, diante da resistência destes ao tratamento convencional da água, é uma preocupação de âmbito mundial.

De igual importância é a presença dos protozoários patogênicos no solo, considerando-se que o gado bovino, especialmente os bezerros neonatais, são uma

substancial fonte de eliminação destes patógenos pelas fezes, particularmente dos oocistos de *Cryptosporidium* spp (FAYER, 2004).

Uma vez no solo, oocistos e cistos são drenados pelas chuvas para os cursos de água e possibilitam a poluição dos mananciais; a exemplo Rockwell (2002) relatou 0,12/L cistos de *Giardia* spp. encontrados em águas superficiais de San Francisco, EUA. Desta forma, há a grande possibilidade destes protozoários intestinais atingirem os alimentos frescos e, em uma próxima etapa, o homem produzindo assim surtos epidêmicos de criptosporidiose e giardiose (OLSEN et al., 2000; TZIPORI & WARD, 2002).

Estudos de monitoramento de mananciais indicam que a contaminação pode ocorrer via o transporte superficial dos oocistos e cistos, proveniente de fezes aplicadas na adubação da terra, via eliminação fecal direta ou ainda via transporte vertical para as águas subterrâneas. O escoamento superficial das águas (“*runoff*”) proveniente das plantações e de lagoas ou de outras áreas que acumulam fezes de animais, pode também resultar em contaminação dos mananciais, da água subterrânea e de irrigação (ROSEN et al. 2000; CACCIÒ, et al., 2005).

2.4.2. Ocorrência de oocistos e cistos em águas subterrâneas e de subsuperfície.

Acredita-se que a contaminação das águas subterrâneas por patógenos, geralmente é resultante da migração ou da introdução fecal dos patógenos na subsuperfície. A contaminação fecal pode atingir as águas subterrâneas provenientes de muitas rotas.

De importância primária são as fontes pontuais: fendas em fossas sépticas, vazamentos nas tubulações de esgoto e tanques sépticos. Pasto de engorda de animais e operações agropecuária intensivas, também podem representar fontes importantes. O transporte de patógenos para as águas subterrâneas, basicamente é uma função das

condições hidrogeológicas e climáticas. As questões de destaque são as propriedades hidrogeológicas específicas do local que afetam a vulnerabilidade da contaminação e, as propriedades químicas e físicas que controlam o destino e o transporte dos patógenos na subsuperfície. Além da localização hidrogeológica, outros fatores afetam a vulnerabilidade do sistema de águas subterrâneas, estes incluem: a construção de poços, suas profundidades e proximidade com as fontes de contaminação fecal. As distâncias apropriadas das fontes fecais podem ajudar a garantir que a contaminação não atinja os poços (WIREMAN & JOB, 1998). A contaminação fecal em si, não significa que a água contenha patógenos; apenas, potencial para que eles existam; os patógenos específicos relacionados à saúde do homem, podem não ocorrer de modo algum, ou apenas durante certas épocas do ano (MACLER & MERKLE, 2000).

Outra questão importante está relacionada à área de captação de poços, ou seja, área de superfície e de subsuperfície ao redor dos poços ou campo, que abastecem o sistema público ou rural; essa questão envolve a proteção contra eventuais fontes de contaminação antropogênica. Em áreas urbanas, as linhas de esgoto e as tubulações de água podem ocupar a mesma vala ou não ter distâncias suficientes entre ambas. Devido às diferenças de pressão, sobretudo em situações de desabastecimento ou interrupção do fornecimento de água, os patógenos podem ganhar entrada nas tubulações de água a partir da rede coletora de esgoto (MACLER & MERKLE, 2000).

No Brasil, Gamba et al (2000) investigando 8 amostras de água de poços subterrâneos utilizadas para consumo, no município de Itaquaquetuba – Fortaleza, observou a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em 8 cisternas e duas fossas. Os resultados positivos ressaltaram o risco da possível contaminação das águas subterrâneas. Estes resultados revelaram ainda, que existia um grande potencial de risco para ocorrência de

doenças transmitidas por esta água contaminada à comunidade, uma vez que essa consumia a mesma água sem fervê-la.

2.4.3. Ocorrência de oocistos e cistos em águas de irrigação.

O escoamento das chuvas provenientes de áreas urbanas, suburbanas e rurais, e dos esgotos, pode conduzir protozoários encistados para águas empregadas na irrigação agrícola (FAYER et al., 2004).

A criação intensiva de animais pode trazer uma grande concentração de resíduos fecais – com frequência para instalações locais de armazenamento como lagoas, riachos, tanques, reservatórios – contaminando assim as águas de subsuperfície geralmente utilizadas para a irrigação (KIRBY et al., 2003).

As atividades de alimentação dos animais e as pastagens são potenciais fontes de patógenos. Locais abertos e sem vegetação, onde há grande concentração de animais têm maior potencial para que o escoamento (“*runoff*”) carregue patógenos levados pela água superficial, ou que sejam lixiviados pela água subterrânea (ROSEN et al., 2000).

Estudos recentes indicam que o gado adulto de recria, assintomático, também elimina oocistos, em pequenas quantidades, mas que contribuem para a contaminação ambiental (ROSEN et al., 2000).

Bradford & Schijven (2002) discutiram o papel exercido pela aplicação de esterco animal de bezerros e fezes de animais adultos nas plantações. É necessário determinar as condições em que o esterco dos animais é utilizado na adubação orgânica das culturas, muitas vezes como uma importante fonte de oocistos e cistos, com a finalidade de impedir o transporte destes patógenos para os corpos d’água.

Estudos recentes têm indicado que a prevalência de *Giardia* spp. no gado oscila entre menos de 14% em adultos a 100% em animais com menos de 6 meses de idade (ROSEN et al., 2000). Em grande parte, os bovinos geralmente agem como portadores assintomáticos de patógenos humanos (ex: *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., *E. coli* 0157, *Salmonella* spp.), podendo causar infecções em outros animais e no próprio homem (KIRBY et al., 2003).

O conhecimento sobre a sobrevivência de potenciais patógenos humanos e de animais em material fecal, antes e após a aplicação do mesmo na terra, é crítico para o comércio de produtos agrícolas seguros ao mercado mundial.

A qualidade da água é um aspecto fundamental para o êxito da utilização de sistemas irrigados, no entanto, a avaliação da qualidade da água é muitas vezes negligenciada (ROSEN et al., 2000).

O risco de ocorrência de surtos de doenças de veiculação hídrica no meio rural é alto, principalmente em função da possibilidade de contaminação de águas que muitas vezes são captadas em poços velhos, inadequadamente vedados e próximos de fontes de contaminação, como fossas e áreas de pastagem ocupadas por animais (STUKEL et al., 1990). Hoje, sabe-se que a baixa qualidade das águas de superfície levou os agricultores a optar pela irrigação utilizando-se águas subterrâneas.

No meio rural, as principais fontes de abastecimento de água para a irrigação são as nascentes (minas) e os poços rasos, fontes altamente susceptíveis à contaminação. Conboy & Goss (2000) citam que a deposição diária de resíduo orgânico animal (dejetos bovinos) no solo, prática muito disseminada no meio rural, aumenta o risco da contaminação das águas subterrâneas e conseqüentemente destas fontes naturais.

Ainda não são bem conhecidos os mecanismos de transporte de oocistos e cistos presentes nas fezes dos animais para um corpo de água próximo, isso mostra o importante papel desses animais na contaminação ambiental resultante da veiculação hídrica de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. (FAYER et al., 2000).

Larkin et al (1978) reportaram que plantações como alface, repolho e outros vegetais folhosos teriam áreas maiores de contato com a superfície do solo e as suas raízes estariam expostas diretamente aos contaminantes, podendo a contaminação ocorrer diretamente pelo uso da água de irrigação ou indiretamente pelo contato com o solo.

Nos Estados Unidos e boa parte da América Central, estudos que avaliaram a qualidade da água utilizada na irrigação dos vegetais, apresentaram resultado positivo de 60% cistos de *Giardia* spp. e 36% oocistos de *Cryptosporidium* spp. (THURSTON-ENRIQUEZ et al., 2002). Os cistos foram encontrados em coentro, cenouras, menta, rabanete, e batatas irrigadas com águas contaminadas por esgotos, e foram registrados surtos relacionados a frutas e hortaliças contaminadas.

Outra questão importante envolve reuso de água, uso de águas residuárias na irrigação, que não é um conceito novo e tem sido praticado em todo o mundo há anos. No Brasil, a prática do uso de esgotos – principalmente para a irrigação de hortaliças e de algumas culturas forrageiras – é de certa forma difundida. Entretanto, constitui-se em um procedimento não institucionalizado e tem se desenvolvido até agora sem nenhuma forma de planejamento ou controle. Muitas vezes é totalmente inconsciente por parte do usuário, que utiliza águas altamente poluídas de córregos e rios adjacentes para a irrigação de hortaliças e outros vegetais, ignorando que esteja exercendo uma prática danosa à saúde pública dos consumidores e provocando impactos ambientais negativos (ROSEN et al., 2000).

Alguns estudos epidemiológicos têm revelado um excesso de contaminação por enteroparasitas associados à reutilização de esgotos não tratados na irrigação (AL SALEM & TARAZI, 1992; CIFUENTES et al., 1992, 2000; BOUHOUM & SCHWARTZBROD, 1997), demonstrando que a incidência de doenças parasitárias em consumidores de produtos agrícolas irrigados é bastante elevada.

Ao contemplar que grande parte da produção de alimentos provém da horticultura, especial atenção deve ser dada à qualidade da água, já que muitos produtos hortigranjeiros são consumidos “*in natura*”. A captação, os reservatórios e o sistema de irrigação adotado são fatores determinantes na qualidade da água a ser utilizada.

A revisão dos padrões de potabilidade pelo Ministério da Saúde que alterou a Portaria 1469 para a Portaria 518 apresenta metas para o controle da qualidade da água a ser disponibilizada para a população, dando ênfase principalmente à pesquisa e controle de organismos potencialmente patogênicos tais como *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp.. A Portaria MS nº 518/2004 recomenda a inclusão da pesquisa de organismos patogênicos nas análises de águas, com o objetivo de atingir como meta um padrão de ausência, dentre outros organismos, de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp.”.

Deve-se ressaltar que os coliformes totais, coliformes termotolerantes, considerados referência mundial como indicadores microbiológicos para água e alimentos, não são bons indicadores para protozoários (HARICH et al., 1999). Muitos estudos vem demonstrando que estes bioindicadores bacteriológicos regulamentados por lei (coliformes totais e fecais) para atestar a inocuidade da água, são inadequados para determinar a qualidade parasitológica da mesma (HAYES et al., 1989; ROSE, 1990; FORD & COLWELL, 1996).

Assim, torna-se de extrema relevância, a padronização de métodos eficientes para diagnosticar *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. no ambiente, particularmente em

amostras como a água de irrigação e os alimentos, assim como a obtenção de dados de ocorrência (sazonal) e distribuição dos mesmos no ambiente rural, objetivando o planejamento e estabelecimento de medidas de controle e vigilância dos produtos adquiridos e da água de uso e de consumo humano.

2.4.4. Presença de oocistos e cistos em alimentos.

Durante os últimos 25 anos, a indústria alimentícia tem enfrentado o desafio da presença de patógenos emergentes de veiculação alimentar, tais como *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. A importação e exportação de alimentos levando a um aumento do comércio internacional, a rapidez dos meios de transportes (DA SILVA & IACCARINO, 1999; MAYER, 2000; AQUINO & GANDER, 2000), o surgimento de novos hábitos alimentares e de “diferentes” alimentos frescos, como exemplo “mesclum” (salada de folhas verdes) (ORTEGA et al., 1997b) ou “Basil-pesto” (molho de manjeriço) (citado por Blans et al., 2005), contribuíram de maneira significativa para a emergência dos protozoários intestinais e a introdução dos mesmos onde estes não existiam previamente (MAYER, 2000). A ameaça à segurança mundial em relação aos alimentos tem recebido muita atenção dentro da indústria alimentícia, uma vez que está associada ao mundo em transformação (TAUXE, 2002).

Dados sobre a disseminação dos oocistos e cistos dos protozoários emergentes, veiculados por alimentos frescos, são poucos e difíceis de serem documentados (FAYER et al., 2000), principalmente devido aos problemas inerentes a este tipo de pesquisa, como a avaliação retrospectiva, pouca disponibilidade das amostras devido à curta vida dos vegetais e a dificuldade na obtenção das mesmas, a falta de etiqueta de procedência destes produtos impossibilitando a identificação do produtor e, finalmente, o pequeno número de

agentes infectantes usualmente presentes nestes alimentos, são fatores que dificultam as investigações sobre a forma de propagação (HERWALDT, 2000).

Alguns estudos relatam a presença de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. na superfície de vegetais crus úmidos e frescos, o que proporciona um ótimo meio de sobrevivência a estes patógenos (MINTZ et al., 1993; ORTEGA 1997a). Assim, oocistos e cistos foram isolados de vários gêneros alimentícios, principalmente associados às hortaliças, frutas e moluscos (ORTEGA et al., 1997a; ROBERTSON & GJERDE, 2001a; GRACZYK et al., 2001; FAYER et al., 2004), alimentos que são frequentemente ingeridos crus.

No Peru, oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram encontrados em vegetais frescos analisados, numa proporção de 14,5% a 16,5%, tais como coentro, alface, rabanete, tomates, pepinos e cenouras (ORTEGA et al., 1997a), com elevada contaminação durante a estação chuvosa quando a água superficial é menos utilizada na irrigação (MONGE & CHINCHILLA 1996).

Entre os vegetais mais comumente contaminados encontra-se: alface, cenoura, repolho, brotos de soja, brotos de feijão, alfafa, espinafre, tomate, pepino, principalmente quando são consumidos em forma de saladas cruas (MINTZ et al., 1993; MONGE & ARIAS 1996; ORTEGA et al., 1997a; ROBERTSON & GJERDE 2000, 2001a, 2001b; ROBERTSON et al., 2002; COOK et al., 20006a, 20006b).

Os fatores de risco na avaliação da exposição ao *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em vegetais folhosos e frutas envolve: o cultivo, a colheita, o armazenamento e transporte, e preparo do alimento pelo consumidor. Durante o cultivo os riscos estão associados à contaminação fecal (indireta) por sedimentos de esgotos, resíduos orgânicos, contato direto com fezes de animais, e a água contaminada empregada na irrigação. Por

outro lado, o grau de contaminação de vegetais e frutas depende, entre outras coisas, do método usado na colheita, particularmente, estão envolvidas as medidas de higiene tomadas como um importante fator de risco (citado por HOORNSTRA & HARTOG 2003).

Não se sabe se o armazenamento e transporte de vegetais e frutas resultam na redução da infectividade de oocistos e cistos. Mas é certo que a sobrevivência ou a inativação é dependente da temperatura e do tempo de armazenagem, e também das características do produto. Alguns dados mostram a redução na infectividade de 95 a 100% em quatro dias. Para uma variedade de alface, a redução foi de apenas 30% em quatro dias porem 100% em seis dias (HOORNSTRA & HARTOG, 2003).

Quanto ao preparo dos alimentos, a qualidade diz respeito à forma como os alimentos são manipulados, desde a sua produção até a distribuição e os manipuladores, na sua maioria, são pessoas com poucos conhecimentos na área de alimentação, ignorando, muitas vezes, práticas básicas que possam garantir a segurança do alimento (DAWSON, 2005).

2.5. Métodos de análises para a detecção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em amostras de água e de alimentos.

Uma das razões importantes associada à emergência dos protozoários parasitas tem sido o aperfeiçoamento dos sistemas de detecção, primariamente na microbiologia clínica, e que propiciaram a identificação de oocistos e cistos como importantes agentes causadores de doenças gastrointestinais nos seres humanos (MILLAR et al., 2002).

Recentes métodos padronizados para a detecção de *Cryptosporidium* spp. em alguns tipos de alimentos (COOK et al., 2006a, 2006b), são fundamentados a partir de técnicas originalmente delineadas para a análise de amostras clínicas (fezes) ou hídricas.

Atualmente, técnicas para a detecção de oocistos e cistos nos alimentos, notavelmente de produtos frescos, estão cada vez mais sendo aperfeiçoados e publicados (ROBERTSON & GJERDE, 2000, 2001b). Mas, o bom desempenho de uma metodologia apropriada para a detecção e identificação dos mesmos nos alimentos, depende principalmente do nível de contaminação e do pré-tratamento da amostra considerando que, cistos e oocistos estão presentes naturalmente em números baixos nos alimentos. Portanto, há a necessidade do emprego de técnicas específicas de concentração e purificação, adequadas a este tipo de amostra, com a finalidade de maior eficiência de recuperação dos parasitos (LABERGE et al., 1996).

As análises parasitológicas em amostras de águas, primariamente, foram delineadas para recuperação de cistos de *Giardia* spp. Quanto ao *Cryptosporidium* spp., posteriormente, sua detecção na água e nos alimentos, foi baseada nas mesmas técnicas então descritas para o isolamento e identificação de *Giardia* spp. (JAKUBOWSKI et al., 1996). Hoje, ambos protozoários podem ser analisados nas mesmas amostras simultaneamente.

Os procedimentos laboratoriais para a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. nos alimentos baseiam-se nas etapas de: lavagem e filtração, eluição, concentração, purificação e visualização dos organismos (ROBERTSON & GJERDE 2001b).

Cabe ressaltar que os métodos convencionais como: a técnica de sedimentação espontânea de Lutz e a técnica de flutuação com solução saturada de sacarose, muitas vezes utilizados para o isolamento dos parasitos procedentes de vegetais e de frutas, foram consideradas geralmente ineficientes ou com eficiências de recuperação baixas e variáveis, reconhecendo-se a dificuldade em detectar os oocistos/cistos nos alimentos, devido à

interferência do material removido durante os procedimentos de lavagens e na separação dos oocistos/cistos das sujidades presentes na amostra (ROBERTSON & GJERDE, 2000).

Outro fator é a velocidade de sedimentação dos oocistos e cistos que pode ser afetada por características como tamanho e densidade das outras partículas as quais eles estão aderidos (ROBERTSON & GJERDE, 2001b). Além disso, os materiais para filtração convencionais, como tamis metálicos ou gases, são impróprios e quando empregados, provavelmente resultam na perda de oocistos e cistos em vez da sua concentração (XIAO & HERD, 1993).

Hoje, os métodos imunológicos estão disponíveis, e segundo Robertson & Gjerde (2001a), talvez “apontem o melhor caminho para a recuperação dos oocistos e cistos em alimentos”.

Em amostras de água destinada ao consumo humano, a utilização da Reação de Imunofluorescência Direta (IFA), desenvolvida em 1985, aplicada na visualização de oocistos e cistos, ocasionou um aumento da eficiência da recuperação dos parasitos, ao redor de doze vezes, comparativamente à flutuação em sulfato de zinco (CLANCY et al., 1999). Este método, juntamente com a filtração de volumes variáveis de água quer utilizando filtros de cartuchos, membranas filtrantes ou cápsulas de filtração, tornou-se padrão para a detecção de oocistos e cistos no ambiente aquático e, poderia ser aplicado ao estudo da contaminação dos vegetais por estes protozoários, desde que sofresse adaptações a este tipo de amostra, pois a água de lavagem destes alimentos pode conter muitos detritos que podem obscurecer a presença de oocistos e cistos.

Ortega et al., 1997a, em seus estudos sobre o isolamento de *Cryptosporidium* spp. e *Cyclospora cayentanensis*, de amostras de vegetais coletadas em mercados de uma região endêmica do Peru, utilizaram uma metodologia em suas análises que compreendia as etapas

de: lavagem dos vegetais e filtração da água de lavagem em membranas (3,0 µm de porosidade nominal), eluição dos parasitos provenientes da amostra e a concentração da suspensão obtida (1.200 x g. por 10 min) finalizando o exame pela microscopia de fluorescência para *Cryptosporidium* spp. e autofluorescência para *Cyclospora cayetanensis*.

Na análise dos vegetais “*in natura*”, estes autores encontraram uma positividade para *Cryptosporidium* spp. de até 19,35% e *Cyclospora cayetanensis* apresentou ao redor de 1,8% (ORTEGA et al., 1997a). Paralelamente, foram feitos experimentos controles para avaliar a eficiência de recuperação das técnicas utilizadas obtendo-se uma eficiência de recuperação para *Cryptosporidium* spp. de 42% e para *Cyclospora cayetanensis* de 15%.

Robertson & Gjerde (2000), descreveram um método de isolamento de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. presentes em várias frutas e vegetais, com base na técnica de separação imunomagnética (IMS), atualmente empregada para a análise de amostras de água envolvendo esses protozoários. Esta metodologia abrange quatro etapas distintas: a) lavagem dos vegetais e filtração em membrana (3,0µm de porosidade nominal); b) eluição dos parasitos provenientes da amostra da suspensão aquosa e a concentração da suspensão obtida; c) separação dos parasitos da suspensão através da IMS; d) exame pela microscopia de fluorescência (IFA).

Os autores, conduzindo experimentos controles com a finalidade de avaliar a eficiência de recuperação dos parasitos frente à técnica utilizada, concluíram que a recuperação dos cistos/oocistos semeados nas amostras é variável e depende da espécie do parasito, do substrato da amostra e do procedimento da lavagem, sugerindo que, como grandes quantidades de resíduos e células são removidas das amostras durante um processo de lavagem mais longo, isto pode contribuir para os menores índices de eficiência. A recuperação média total dos parasitos foi calculada em aproximadamente 67% para *Giardia*

spp. e 42% para *Cryptosporidium* spp., com eficiências de recuperação consideravelmente altas quando comparado aos dados de Ortega et al., 1997a.

Tendo em vista o desenvolvimento de um método padrão com maior eficiência de recuperação desses parasitos em vegetais, Robertson & Gjerde (2001b) analisaram uma grande faixa de parâmetros como: o peso das amostras, a contribuição da eluição para as perdas dos parasitos, os Kits usados para separação imunomagnética (IMS) e a força magnética durante a IMS. Experimentos controles foram conduzidos para determinação da eficiência na obtenção dos parasitos de acordo com os parâmetros investigados.

As primeiras conclusões demonstraram que com relação ao tamanho, o uso de uma amostra menor aumenta a possibilidade de detecção dos parasitos face à redução de partículas interferentes e isto é, particularmente importante quando a contaminação for baixa, por exemplo, entre 1 a 6 oocistos por 100g de alface. Portanto, o tamanho da amostra deve ser cuidadosamente escolhido, não apenas para aumentar a eficiência da recuperação dos parasitos quando em grandes quantidades, mas para produzir uma razoável detecção da contaminação naturalmente presente com baixos níveis desses agentes infecciosos presentes nas amostras (ROBERTSON & GJERDE, 2001b).

Ainda em relação aos cistos de *Giardia* spp., experimentos controles puderam demonstrar que, devido ao seu maior tamanho e às diferenças morfológicas na sua superfície ou ambos, é possível que estes fiquem enredados na “membrana de filtração” ou sejam capturados junto com os resíduos na lavagem de alguns tipos de vegetais (ROBERTSON & GJERDE, 2001b), o que contribui para uma baixa recuperação.

A separação imunomagnética (IMS) representa um avanço ao selecionar os parasitos na etapa de purificação separando cistos e oocistos das sujidades, com performance superior aos procedimentos de flutuação. Na atualidade, a IMS apresenta-se

como uma ferramenta diagnóstica sensível, com inúmeras vantagens na detecção de agentes patogênicos em diferentes tipos de amostras (ROBERTSON & GJERDE, 2001b). Porém, seu custo é bastante elevado.

A comparação entre os “kits” para a IMS demonstrou não haver diferenças significativas entre os “kits” Dynal anti-*Cryptosporidium*® e Immucell Cryptoscan®, para o isolamento dos parasitos provenientes de amostras ambientais. Um terceiro “kit” para a IMS, do fornecedor Aureon Bio Systems, demonstrou em alguns testes, uma eficiência de recuperação 12% superior em relação ao material de difícil análise, como brotos-de-feijão. E finalmente, embora tenha sido testada uma força magnética maior utilizando-se mais “esferas” recobertas com anticorpos para a coleta do material, a eficiência na recuperação dos parasitos não aumentou (ROBERTSON & GJERDE, 2001b).

Outra etapa de difícil interpretação é a determinação da viabilidade de oocistos e cistos de origens desconhecidas, procedentes das mais diversas amostras ambientais, assim como, a especificidade, precisão e custos das metodologias empregadas para essas análises (SMITH et al., 2002).

Foram descritos vários procedimentos para avaliar a infectividade dos oocistos e cistos, e para distinguir os parasitos vivos dos mortos, entre eles: a coloração empregando corantes vitais e a exclusão da coloração (DAPI/PI) (CAMPBELL et al., 1992; SMITH et al., 2002; CASTRO-HERMIDA et al., 2005), a excitação “*in vitro*” (VERSEY et al., 1997; FRICKER e CRABB 1998; CASTRO-HERMIDA et al., 2005), a cultura celular (GRIFFITHS et al., 1994; DI GIOVANNI et al., 1999; ARROWOD, 2002), a infectividade animal (DE REGNIER et al., 1989), e a hibridização da fluorescência “*in situ*” (FHS) (MORGAN et al., 1998).

Os corantes vitais como DAPI/PI ou a taxa de excitação “*in vitro*”, foram empregados por vários pesquisadores para se estimar a viabilidade (CAMPBELL et al., 1992), porém a correlação entre os procedimentos de coloração e a viabilidade de oocistos e cistos não foi conclusivamente demonstrada (JAKUBOWSKI et al., 2001), e o método mais confiável seria a infectividade animal (FRICKER & CRABB 1998).

Deve-se destacar ainda, que técnicas de biologia molecular, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – *polymerase chain reaction*) (STINER et al., 1996; MCLAUCHLIN et al., 2000), tem sido aplicadas na caracterização dos oocistos e cistos patogênicos (CEDILLO-RIVERA et al., 2003; FELTUS et al., 2006). Entretanto, não tem seu uso difundido como teste de rotina para amostras ambientais (DAWSON, 2005).

Até o momento, em relação à possível contaminação das hortaliças, na maioria dos trabalhos existentes e publicados na literatura brasileira, foram utilizados métodos convencionais para a detecção de cistos e oocistos (OLIVEIRA & GERMANO, 1992; MESQUITA et al., 1999; TAKAYANAGUI et al., 2000; COELHO et al., 2001; SIMÕES et al., 2001; PAULA et al., 2003; DA SILVA et al., 2005; FALAVIGNA et al., 2005).

Mesquita et al. (1999) avaliaram a contaminação por enteroparasitos (*Giardia* spp.), em hortaliças consumidas cruas, como alface (*Lactuca sativa*) e agrião (*Nasturtium officinale*), provenientes do comércio e de restaurantes “self-services”, nas cidades de Niterói e Rio de Janeiro. Utilizando técnicas convencionais, após filtração em tamis com gaze, a água de lavagem dos vegetais foi submetida à técnica de flutuação com solução saturada de sacarose e o material restante, ao procedimento de sedimentação espontânea de Lutz. Os resultados obtidos na análise de 128 amostras de vegetais indicaram um baixo índice de contaminação por protozoários e nematóides: ao redor de 3,9% em alface e 2,3% para agrião.

Takayanagui et al. (2000), examinando as condições higiênico-sanitárias e analisando a prevalência da contaminação por enteroparasitos em verduras de hortas produtoras de Ribeirão Preto, SP, utilizaram metodologia convencional: lavagem dos vegetais e, em seguida, cada folha foi lavada individualmente e o líquido resultante foi submetido à filtração em tamis com gaze e sedimentação espontânea de Lutz. O sedimento obtido após centrifugo-flutuação em sulfato de zinco e técnica da formalina seguida de coloração por Kinyoun, foi analisado ao microscópio óptico por exame direto. Do total de 129 hortas avaliadas, cerca de 20,1% apresentaram irregularidades, tanto por contaminação das verduras pelos parasitos como da água utilizada para a irrigação. Em duas propriedades, foi flagrada a utilização de água de córregos na irrigação das verduras.

Coelho et al. (2001) avaliaram a presença de ovos, larvas e cistos de enteroparasitas na água utilizada para consumo e em hortaliças “*in natura*” consumidas cruas na rede escolar de Sorocaba (SP). As amostras de água foram submetidas à filtração em membrana (3,00 µm de porosidade nominal) seguidas de eluição do material filtrado e centrifugo-flutuação em sulfato de zinco - método de Faust, o material flutuante foi corado com lugol e examinado ao microscópio óptico. Para algumas amostras a técnica aplicada foi a sedimentação espontânea de Lutz e o sedimento obtido, corado com lugol e examinado ao microscópio óptico comum. Os resultados obtidos na análise das formas transmissíveis de enteroparasitos, entre eles cistos de *Giardia* spp., mostraram uma recuperação dos parasitos das hortaliças “*in natura*” em torno de 3,9%.

Simões et al. (2001) examinando as condições higiênico-sanitárias, mediante a prevalência da contaminação por parasitos e bactérias em vegetais de hortas produtoras de Campinas, SP, também avaliaram amostras de água de irrigação usada nestas propriedades. Os resultados obtidos na análise de 166 amostras de vegetais, utilizando técnicas

convencionais como: filtração em tamis com gaze, sedimentação espontânea seguida de centrífugo-flutuação em sulfato de zinco, e após coloração com solução de lugol, indicaram um índice de contaminação por ovos/larvas de helmintos e cistos/oocistos de protozoários ao redor de 14,5% dos vegetais, sendo que todos foram negativos para *Cryptosporidium* spp. a partir das técnicas de centrífugo-sedimentação em éter seguida por coloração de Ziehl-Neelsen modificada. Das 93 amostras de águas utilizadas na irrigação e que foram analisadas segundo o método de filtração em membranas, para a detecção de coliformes, 54% apresentaram formação de colônias destes microrganismos, mas apenas 11,8% foram consideradas inadequadas de acordo com os limites de contaminação da água para fins de irrigação, que estão regulamentados pela Resolução nº 20/86 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (Conama) para o consumo humano.

A contaminação das hortaliças por formas de resistência dos protozoários parasitas (cistos e oocistos) pode ocorrer em diversos momentos: desde o plantio até o consumo e, a principal via seria através da água utilizada na irrigação das hortas (FAYER et al., 2000). Assim, sempre que a água entra em contato com produtos hortifrutícolas frescos, sua qualidade dita o potencial de contaminação patogênica destes (ROSEN, 2000).

No Brasil, é prática usual em muitas regiões, a utilização de água contaminada com esgoto doméstico na irrigação, o que pode acarretar a contaminação fecal das hortaliças, além de possibilitar a infecção dos trabalhadores rurais (CIFUENTES et al., 2000). É sabido que o esgoto doméstico, um dos principais resíduos produzidos pela atividade diária do homem, pode conter grande número de agentes patogênicos (TAKAYANAGUI et al. 2000). Neste país, o cenário atual é caracterizado pela progressiva contaminação das águas superficiais e subterrâneas devido à deficiente infra-estrutura do sistema de esgotamento sanitário (FUNASA, 2000).

A prática disseminada da reutilização da água de esgotos na agricultura, a falta de conhecimento sobre doenças como a giardiose e criptosporidiose associadas aos trabalhadores rurais (TAKAYANAGUI et al., 2000), contribuem para práticas irregulares na agricultura, tais como técnicas de cultivo, armazenamento, processamento, distribuição e manipulação ineficientes, assim como mecanismos de irrigação inadequados que contribuem para a dispersão dos oocistos e cistos, e conseqüentemente para o aumento dos riscos de doenças (MILLAR et al., 2002).

2.6. Fatores que influenciam na dispersão e na recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp..

A recuperação de oocistos e cistos depende da natureza e do tipo das amostras, e ainda dos tipos de soluções e da metodologia empregada para a concentração e identificação dos mesmos (LECHEVALLIER & NORTON, 1995).

A carga superficial e a hidrofobicidade são atributos essenciais para a compreensão da adesão dos oocistos e cistos às partículas (GUERRANT, 1997; BRUSH et al., 1998), assim como, outras características relacionadas à bioquímica da parede externa dos oocistos e cistos (distribuição e função dos lipídeos, proteínas e carboidratos) (TILLEY et al., 1997). Entretanto, a carga superficial e a hidrofobicidade, frequentemente dependem do pH, da resistência iônica (HSU & HUANG, 2002), da purificação, da idade dos protozoários, e do método utilizado para tratar a amostra (BRUSH et al., 1998; BUTKUS et al., 2003).

Vale ressaltar, que o entendimento sobre a carga superficial, da hidrofobicidade e do Potencial Zeta dos oocistos e cistos, e suas reações às condições de pH, resistência iônica, temperatura e os componentes da solução de uso, contribuem para o esclarecimento dos processos envolvidos na adsorção dos mesmos (HSU & HUANG 2002). As interações

eletrostáticas dependem fortemente das condições químicas da superfície dos oocistos e cistos e, possivelmente, a agregação dos parasitos possa ser favorecida pela composição química de certas soluções específicas ou de diferentes tipos de partículas (STUMM & MORGAN 1996; CONSIDINE et al., 2002; SEARCY et al., 2005).

Sob diferentes condições ambientais, as forças de controle da interação entre os oocistos e cistos e a adesão dos mesmos às partículas sofrem alterações ou se alternam entre eletrostáticas e hidrofóbicas (DAI et al., 2004).

Os Potenciais Zeta (ZP), ou seja, a carga superficial caracterizada como sendo a mobilidade eletroforética dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp., foram medidos em estudos realizados por Hsu & Huang (2002). Os autores inferiram que a medição dos potenciais zeta é sensível à alteração da resistência iônica e, assim, diferem diante de distintos valores de condutividade e de pH. Demonstraram que oocistos e cistos apresentaram cargas superficiais dependentes do pH, com os potenciais zeta se tornando menos negativos à medida que o pH era reduzido (ácido). Assim, o potencial zeta de zero foi alcançado em pH 3,3 e pH 2,2 para oocistos e cistos respectivamente.

Vários estudos reportaram que os oocistos e cistos possuem cargas negativas sob condições ambientais (DROZD & SCHWARTZBROD, 1996; BRUSH et al., 1998; THOMAS et al., 2001; HSU & HUANG, 2002; BUTKUS et al., 2003; DAI & BOLL 2003; SEARCY et al. 2005), provavelmente devido à presença de grupos fosfato, carboxílicos e carboxilados sobre a sua superfície (KARAMAN et al., 1999).

Segundo Daí et al. (2004), as características superficiais dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. são diferentes dos cistos de *Giardia* spp.. Assim, os parasitos apresentam diferente capacidade de adesão às partículas.

Daí & Boll (2003), em seus estudos, demonstraram que os oocistos de *Cryptosporidium parvum* tiveram carga superficial aproximadamente 25% mais negativa que os cistos de *Giardia duodenalis*. Hsu & Huang (2002) comprovaram que os oocistos foram duas vezes mais negativos que os cistos. Estas diferenças de carga superficial explicam, em parte, as disparidades existentes nas interações oocistos/cistos – partículas sólidas. Para os cistos de *G. lamblia*, as forças que não envolvem cargas, como o efeito hidrofóbico, podem se sobrepor à força eletrostática mais fraca e se tornar dominantes na adesão dos cistos às partículas sólidas.

Drozd & Schwartzbrod (1996) demonstraram uma fraca hidrofobicidade dos oocistos de *Cryptosporidium parvum*, não sendo esta uma propriedade acentuada nestes parasitos (para o pH observado na água superficial: quase neutro), ao passo que, Hsu & Huang (2002) demonstraram forte hidrofobicidade de *Giardia* spp., e Daí et al (2004), e sugeriram que a hidrofobicidade é mais importante que a carga superficial para a adesão de *Giardia lamblia* às superfícies sólidas.

Estudos realizados por Hsu & Huang (2002) enfatizaram que a hidrofobicidade dos oocistos e cistos aumenta com relação a valores de pH ácidos; os índices iniciais de remoção dos oocistos foram geralmente maiores que dos cistos cuja variação observada foi muito mais ampla. Segundo Drozd & Schwartzbrod (1996), os valores da adesão dos oocistos ao octano é, em média, próxima de 20%, e varia com o pH e a resistência iônica do meio; a hidrofobicidade do parasito é baixa, isto dá suporte à hipótese de Musial et al. (1987), acerca da adesão dos oocistos às superfícies de vidro ser maior que em materiais plásticos hidrofóbicos.

Outra questão relevante envolve o conhecimento acerca da sobrevivência e do transporte de oocistos e cistos no solo e no ambiente aquático, e a determinação dos

mesmos se locomoverem livres ou presos às partículas suspensas no solo ou na água (DAÍ & BOLL 2003). Assim como estabelecer os fatores que controlam os processos de dispersão horizontal e o transporte vertical que determinam a distribuição destes patógenos em lagos e reservatórios (BROOKES et al., 2004).

A associação dos oocistos e cistos com partículas em suspensão pode, eventualmente, alterar o seu tamanho efetivo e sua densidade, portanto poderá alterar a sua velocidade de dispersão, de deposição e de todo o seu comportamento de transporte no ambiente (DAÍ & BOLL, 2003; SEARCY et al., 2005; KUCZNSKA et al., 2005). Ambos os processos são essenciais para se determinar, não apenas as mudanças na concentração de uma distribuição inicial, mas, também a agregação de partículas e organismos patogênicos que podem, uma vez associados, se moverem significativamente para outros locais distantes, favorecendo assim a disseminação dos mesmos associados às partículas em suspensão (SEARCY et al., 2005).

A associação de oocistos e cistos a vários tipos de partículas do solo e de sedimentos suspensos, em lagos e reservatórios, foi examinada sob diversas condições (MEDEMA et al., 1998; DAÍ & BOLL 2003; BROOKES et al., 2004; KUCZYNSKA et al., 2005; SEARCY et al., 2005).

Segundo Medema et al. (1998), o fluxo da água é a força condutora para o transporte dos oocistos e cistos, e provavelmente partes destes organismos possam se associar à partículas maiores, cujas características influenciariam no comportamento de dispersão dos mesmos. Deste modo, a velocidade de sedimentação dos oocistos/cistos ligados às partículas na água depende não só do tamanho das partículas, mas da densidade e da viscosidade da água.

Devido a elevadas concentrações de partículas nas águas superficiais e residuárias, grande parte dos oocistos/cistos podem ser encontrados aderidos em materiais como o barro, a areia, o plâncton e algas (MEDEMA et al., 1998). Segundo Medema (1998), em ambientes naturais onde o fluxo da água é baixo (lagos e rios, reservatórios, tanques de tratamentos de esgotos ou de irrigação, e de água potável ou nos ductos), a velocidade de sedimentação dos oocistos e cistos é baixa, ao redor de $0,5\mu\text{m/s}$ para oocistos e $5,5\mu\text{m/s}$ para cistos.

Para Deen et al (2000), o transporte horizontal de partículas/organismos é predominantemente dirigido pela entrada de água e pelas características de circulação dos lagos e reservatórios, inclusive as ondas internas e as correntes conduzidas pelos ventos. Estas ondas internas podem criar movimentos verticais significativos nos lagos e reservatórios da ordem de dezenas de metros, e são responsáveis pela inclusão vertical de organismos patogênicos a distintas partículas dispersas, resultando em variações periódicas na qualidade das águas.

Quanto à distribuição vertical dos microrganismos, Brookes et al (2004), ressaltaram que a agregação dos patógenos às partículas, ou a integração dos mesmos dentro de uma matriz de material orgânico, influenciariam na deposição dos mesmos no ambiente aquático. Medema et al. (1998), relatam que oocistos isentos (livres), possuem uma velocidade de deposição de, aproximadamente, $0,03\text{m dia}^{-1}$ na água, e uma vez agregados as partículas de efluentes de esgoto, passariam a uma velocidade de deposição de $2,5\text{m dia}^{-1}$. De outra forma, Hawkins et al (2000), estimaram índices de sedimentação de oocistos de 5 a 10m dia^{-1} , e relataram ainda que, enquanto a deposição individual é extremamente lenta, a capacidade dos oocistos de se associarem às partículas, eventualmente aumenta sua velocidade de deposição em duas ordens de magnitude, se

constituindo numa importante questão na dispersão e propagação destes agentes patogênicos.

Segundo Daí & Boll (2003), a agregação de oocistos e cistos à matéria orgânica ou aos minerais, desempenha um papel fundamental no transporte, deposição e sobrevivência dos mesmos. Examinar a hipótese de que oocistos e cistos se agregam ou não a partículas naturais do solo, é um passo necessário para se esclarecer de que maneira estes protozoários patogênicos se locomovem frente ao fluxo superficial das águas (“*runoff*”).

Estudos realizados por Daí & Boll (2003), contrariamente, relatam que os oocistos e cistos não se associam à partículas naturais do solo, e sim são arrastados livremente pelo transporte superficial das águas (“*runoff*”). Mas, os autores atentam para o fato de que, as interações destes patógenos com o solo, em geral, podem envolver outros mecanismos além da carga eletrostática existente, e ainda, que se devem considerar os diferentes tamanhos e as quantidades destas partículas em questão, assim como a influência do pH do meio.

Considine et al. (2002) concluíram que a aderência entre os oocistos e partículas como a sílica, poderiam ser facilitadas devido as interações produzidas por ligações protéicas, visto que a parede exterior do oocisto é também composta por grande quantidade de glicoproteínas (NANDURI et al., 1999), e estas, são promotoras de adesão. As proteínas podem se estender na superfície dos oocistos, dirigidas pela força de repulsão das cargas entre grupos de superfície ionizáveis, dando origem às forças que promovam a estabilização dos oocistos. Este fato reforça a hipótese de que as forças de repulsão eletrostáticas dos oocistos com cargas negativas aumentam, a medida que a superfície das partículas inorgânicas se tornam mais negativas, impedindo assim, a adesão dos parasitos aos sedimentos e diminuindo a sua remoção por deposição.

Searcy et al (2005), observaram que oocistos de *Cryptosporidium parvum* se associam com sedimentos em suspensão sob várias condições químicas. Estes achados são concordantes com os resultados obtidos por Medema et al. (1998) e por Hawkins et al. (2000), que reportaram a existência de uma associação entre partícula-oocisto em diversas situações. Os autores enfatizaram que o tipo de partícula é mais importantes que a solução química para a ocorrência da agregação dos mesmos. Portanto, os oocistos estão mais propensos a se agregarem quando associarem-se com partículas maiores em suspensão, pois estas estão sujeitas a possuírem uma área maior de carga positiva facilitando a adesão dos mesmos, ou seja, pode fornecer uma área significativa de carga positiva ao longo de suas bordas, suficiente para promover a atração eletrostática e a ligação dos oocistos a estas áreas. A agregação dos oocistos às partículas maiores facilita a sua sedimentação ou deposição, e assim, eventualmente diminui os riscos destes parasitos serem transportados ao longo dos lagos e reservatórios, o que ocorreria com maior frequência se estes organismos patogênicos se encontrassem associados a pequenas partículas ou se estivessem livres (BROOKES et al., 2004).

Uma vez que a adesão do *Cryptosporidium parvum* depende substancialmente da ligação oocisto-partícula do solo, o esterco bovino pode afetar de modo bastante complexo esta agregação. Assim, os índices de dissolução da matéria fecal controlam não apenas a “liberação” dos oocistos, mas também a ligação transitória destes, às partículas do solo (KUCZYNSKA et al., 2005).

O esterco bovino é uma matriz complexa, constituída de biomassa microbiana, fibras, capim, urina e muco fecal. E as fibras estão presentes em maiores quantidades e em diferentes tamanhos. Segundo Van Kessel & Reeves (2002), o esterco bovino seco é constituído por 55% de fibras.

Os oocistos devem primeiro ser “liberados” da matriz do esterco antes que possam ser transportados para a água de subsuperfície, subterrânea ou superficial. A ligação ou a adesão dos oocistos às fibras vegetais presentes no esterco, por ocasião da aplicação do mesmo na terra, pode inibir as ligações de oocistos e cistos às partículas do solo. Isto se tornou evidente diante das dificuldades de extração dos parasitos provenientes do esterco, reportada por alguns pesquisadores (BUKHARI & SMITH, 1995; KUCZYNSKA & SHELTON, 1999; XIAO & HERD 1993), confirmando assim, a existência de uma associação entre os oocistos e as fibras vegetais.

De outra forma, grandes populações microbianas presentes em amostras de esterco podem competir com *Cryptosporidium parvum* e *Giardia* spp., pelas áreas de agregação destes, às partículas impedindo a ligação dos mesmos (DAVES et al., 2003).

Finalmente, o muco fecal existente no esterco pode “reter” os oocistos junto ao material particulado do solo. Em geral, o esterco bovino aumenta a agregação dos oocistos às partículas, significando que alguns componentes desse, facilitam a ligação (DAVES et al., 2003).

São necessários mais estudos para elucidar o impacto da dissolução do esterco bovino no transporte de oocistos pelo escoamento superficial das águas (“*runoff*”), ou pelas águas subterrâneas (SEARCY et al., 2005).

A persistência de oocistos e cistos no ambiente depende da sobrevivência e do transporte dos mesmos no solo e na água. Por isso, a permanência dos mesmos é bastante variada em relação à sua longevidade. Estudos demonstram que o principal modo de inativação ou de mortalidade destes patógenos é bastante variável, e que os fatores que controlam a inativação de *Cryptosporidium* e spp. *Giardia* spp. incluem: temperatura, pressão, radiação solar (UV) (LORENZO-LORENZO et al., 1993; CAMPBELL &

WALLIS 2002; MORITA et al., 2002; HAYES et al., 2003), e a predação por organismos superiores da cadeia alimentar (STOTT et al., 2001). Contudo, a temperatura e a radiação solar (UV) são os mecanismos mais importantes (LORENZO-LORENZO et al., 1993; CAMPBELL & WALLIS 2002; JENKINS et al., 2002; MORITA et al., 2002; ENEMARK et al., 2003; HAYES et al., 2003).

2.7. Aspectos das culturas investigadas.

2.7.1. Alface e rúcula.

A alface (*Lactuca sativa*) é uma planta herbácea, delicada, com caule diminuto, não ramificado com folhas grandes, lisas ou crespas, e sistema radicular pivotante com ramificações; vegetal folhoso, fechando-se ou não na forma de uma “cabeça” (FILGUEIRA, 2003).

Lactuca sativa (“alface”), é uma das hortaliças mais importantes e difundidas no mercado brasileiro. Originou-se de espécies silvestres, ainda atualmente encontradas em regiões de clima temperado, no sul da Europa e na Ásia Ocidental (FILGUEIRA, 2003), e atualmente é considerada a hortaliça folhosa de maior consumo no Brasil, se destacando como cultura de grande importância econômica e alimentar.

Considerada uma boa fonte de vitaminas e sais minerais, destaca-se por seu elevado teor de vitamina A, além de conter vitaminas B1 e B2, vitaminas C, cálcio e ferro. O aproveitamento dos nutrientes da alface é favorecido, por ser esta, consumida crua, destacando-se pela sua presença, especialmente nas folhas verdes, porém mais baixo entre as folhas internas brancas das alfaces crespas (FERNANDES et al., 2002).

São numerosos os cultivares de alface no mercado ocidental, sendo considerados os seguintes tipos: “alface americana”, “repolhuda manteiga”, “repolhuda crespa”, “solta lisa”,

“solta crespa”, “romana”. A maioria das cultivares deste vegetal folhoso apresenta uma constituição física frágil e é sensível a ferimentos e a desidratação (FILGUEIRA, 1982).

A condução da cultura de alface no campo é feita levando-se em consideração diversos fatores, dos quais o principal é a temperatura. Na fase de germinação, excelentes resultados são obtidos com temperaturas na faixa de 15 a 28°C, não devendo ultrapassar os 30°C (citado por ANTONIALI, 2000). Hoje, os diferentes cultivares existentes no mercado possibilitam o plantio em distintas regiões ao longo de todo o ano (BLISKA JR., 1998).

Ao considerar a umidade relativa ideal, a faixa de 60 a 80% funciona como a mais adequada ao bom desenvolvimento da cultura. Embora, em algumas situações parece vegetar melhor em condições de umidade relativa inferiores a 60% (CERMEÑO, 1977).

A alface deve ser colhida com um desenvolvimento vegetativo mínimo, enquanto ainda não se percebe o sabor amargo que se forma após o início do pendoamento (CALBO, 1999). Na colheita, o uso da faca pode reduzir a necessidade de uma limpeza secundária nas centrais de embalagem; por outro lado, pode transmitir doenças de planta para planta. Deve-se, portanto observar as condições higiênicas do material utilizado na colheita.

Quanto à rúcula (*Eruca sativa*), ela é uma hortaliça originária da Região Mediterrânea e introduzida no Brasil, especialmente no sul, muito popular nas regiões de colonização italiana no Brasil, e no sudeste. Planta anual pertencente à família Brassicacea, de 20 a 60cm de altura. Folhas lirado-pinadas, de margens denteadas, densamente dispostas no caule. Suas folhas são usadas como saladas e ingeridas cruas (SIGRIST, 2002). É rica em K, S, Fe e vitaminas A e C e é apreciada pelo sabor picante e cheiro agradável e acentuado (TRANI & PASSOS 1998).

A rúcula, muito apreciada na forma de saladas, no Estado de São Paulo, vem sendo oferecida aos consumidores dos grandes centros urbanos deste Estado, na forma de maços

de folhas ou ainda folhas soltas, lavadas, higienizadas e embaladas, prontas para consumo. São altamente perecíveis, murchando e amarelando rapidamente. A rúcula tem pequena durabilidade após a colheita, sendo que em condições ambientais, a hortaliça pode ser mantida no máximo por um dia, desde que colocada em local bastante fresco, com a parte inferior em uma vasilha com água. Em geladeira, a rúcula pode ser mantida por até quatro dias, desde que embalada em saco plástico (TAVARES et al., 2000).

A alface e a rúcula têm no processo de higienização o único tratamento recebido entre o cultivo e o consumo. Se os processos de limpeza e sanificação forem conduzidos de forma inadequada, poderão propiciar a transmissão de diversos agentes patogênicos que conduzem, principalmente, a tipos diversos de enteroparasitoses (TAVARES et al., 2000).

Considerando a elevada frequência de contaminação fecal, e o potencial risco de doenças veiculadas por hortaliças consumidas cruas, sugere-se o fortalecimento do sistema de vigilância sanitária no âmbito comercial, assim como é de extrema importância que haja ações básicas de higiene pessoal aos produtores e manipuladores e de toda população.

2.7.2. Importância econômica: características da produção

Na sociedade moderna, os padrões de consumo de alimentos têm mudado em resposta ao estilo de vida, necessidades, gostos, poder de compra dos consumidores e à publicidade veiculada pela mídia. A ênfase está em assegurar um adequado suprimento de calorias e nutrientes, qualidade, frescor e conveniência para serem preparados e servidos. Este fato tem levado a uma crescente popularidade de frutas e hortaliças, em sua forma original (“*in natura*”), ou minimamente processadas (CHANES et al., 1997).

Em 1998, o PIB brasileiro alcançou o valor de US\$ 805 bilhões, sendo o agronegócio o setor que mais contribuiu para a produção brasileira, com 35% deste total,

equivalente a US\$ 282 bilhões. Entre os itens componentes desse setor, as hortaliças e frutas responderam por 9,4% da movimentação financeira, sendo o valor das hortaliças estimado em US\$ 9.750 milhões, ou seja, 3,5% do PIB agrícola. Neste ano, a produção brasileira de hortaliças alcançou mais de 11.571 mil toneladas, ocupando uma área de mais de 778 mil hectares, distribuída entre as regiões Sudeste (68%), Sul (17%), Nordeste e Centro-Oeste (15%). A olericultura paulista participou com cerca de 21% da área nacional cultivada com hortaliças, respondendo isoladamente por mais de 34% da produção brasileira e por mais de 50% da produção regional (VILELA & HENZ 2000).

Em 2005, a produção total de hortaliças foi de 17.385,9 mil toneladas, ocupando uma área cultivada de 785,2 mil ha. O valor total da produção foi estimado em R\$ 11.482,42 milhões. Nos últimos dez anos a produção de hortaliças no país aumentou 33% enquanto a área foi reduzida em 5% e a produtividade incrementou 38%. Três quartos do volume de produção concentra-se nas regiões Sudeste e Sul enquanto o Nordeste e o Centro-Oeste respondem pelos 25% restantes. Nos estados do Norte, a produção de hortaliças é incipiente e os mercados consumidores são abastecidos por produtos oriundos principalmente, do Sudeste e Nordeste. O consumo de hortaliças nas regiões Sudeste e Sul, em média, é aproximadamente 60% superior à média das outras regiões (IBGE, 2005).

O perfil do consumidor de hortaliças, sobretudo, nos grandes centros de consumo, vem se tornado cada vez mais exigente em termos de qualidade e aspectos nutricionais e sanitários. Por sua vez, a expectativa do consumidor de encontrar produtos frescos e comprá-los em lugar confiável, com mais conforto e flexibilidade de horário tem exercido marcada influência na dinâmica de produção e distribuição dos produtos. Os consumidores mostram-se cada vez mais interessados em produtos com qualidade e sempre disponíveis nos pontos de venda. Assim, o mercado de hortaliças vem se estruturando em diversos

segmentos. As mudanças que vêm ocorrendo nos setores de produção, distribuição e comercialização têm desafiado todos os elos da cadeia produtiva de hortaliças (MELO & VILELA 2007).

Quanto ao potencial de receita para o produtor, em condições normais de mercado, as hortaliças proporcionam receitas líquidas por hectare muito superiores a qualquer outro cultivo temporário. Enquanto as culturas tradicionais alcançam menos de US\$ 500 por hectare, as hortaliças geram uma renda de US\$ 2 mil a US\$ 25 mil por hectare (SAASP, 1997).

Em relação ao comércio exterior, a participação do Brasil no mercado mundial de hortaliças é ainda pouco significativa. As exportações cresceram 29% em valor, passando de US\$ 134 milhões, em 2004, para US\$ 173,5 milhões, em 2005, ano de ascensão ao mercado internacional (MELO & VILELA, 2007).

A globalização da economia tem causado alterações em todos os elos da cadeia produtiva brasileira de hortaliças. Ao mesmo tempo em que tem possibilitado avanços tecnológicos e estruturais, essa mudança expõe os gargalos que ensejam superação para melhorar a sua competitividade (RODRIGUES, 2005).

A olericultura tem particularidades que a diferencia de outros setores do agronegócio, notadamente em relação às culturas de grãos. A característica mais marcante da exploração olerícola, advém do fato das hortaliças constituírem um grupo diversificado de plantas abrangendo mais de uma centena de espécies cultivadas de forma temporária (ACCARINI et al., 2000a). A olericultura se caracteriza ainda por ser uma atividade econômica de alto risco em função de problemas fitossanitários, maior sensibilidade às condições climáticas adversas, e maior vulnerabilidade à sazonalidade da oferta, gerando instabilidade de preços praticados na comercialização (MELO & VILELA, 2007). Como

atividade agroeconômica diferencia-se, ainda, por exigir altos investimentos, em contraste com outras atividades agrícolas (MELO & VILELA, 2007).

O agronegócio de hortaliças no Brasil é complexo e dinâmico, apresentando características bastante peculiares. Ao mesmo tempo, as novas demandas da sociedade e as inovações tecnológicas estão ampliando a oferta de hortaliças, criando novas oportunidades de negócios, a exemplo do que ocorre em outros países. Um aspecto peculiar, é que a maior parte da produção de hortaliças (60%) está concentrada em propriedades de exploração familiar com menos de 10 hectares intensivamente utilizadas, tanto no espaço quanto no tempo (MELO & VILELA, 2007).

Os resultados recentes de pesquisas médicas e nutricionais têm revelado novas aplicações para as hortaliças, além das tradicionais fontes de vitaminas, sais minerais e fibras. O efeito benéfico de seu consumo no tratamento de inúmeras doenças e distúrbios da saúde tem aumentado o interesse em pesquisas, criando inclusive uma nova área de pesquisas e um novo ramo de negócios, onde se agregam conhecimentos de nutrição, biologia, farmácia e medicina. A divulgação de algumas dessas pesquisas já foi suficiente para aumentar o consumo de certos grupos de hortaliças, caracterizando um novo mercado (VILELA & HENZ, 2000).

A biotecnologia poderá ter um grande impacto sobre vários aspectos do sistema produtivo de hortaliças, tais como a viabilização da produção em novas áreas, redução dos custos de produção e melhoria da qualidade do produto, agregando assim maiores valores, e conseqüentemente, obter a maximização de lucros (VILELA & HENZ, 2000).

2.7.3. Fatores que influenciam na qualidade dos produtos hortícolas: aspectos sanitários do cultivo de hortaliças.

A tendência de participação efetiva do varejo na distribuição de hortaliças, tem conseqüências diretas para os produtores, como a necessidade de melhor proteger a sua produção, e não só com a quantidade, mas também com a qualidade do que é produzido (ACCARINI et al., 2000a).

Um dos desafios no segmento hortícola é melhorar a eficiência do produtor rural no processo de comercialização de sua produção, momento em que ocorrem perdas pós-colheita elevadas (ACCARINI et al., 2000a), que reduzem sensivelmente a disponibilidade interna dos produtos hortigranjeiros. Entre todos os grupos as hortaliças folhosas são as que apresentam maior perecibilidade (VILELA & HENZ, 2000).

Apesar dos avanços evidentes no mercado varejista, de um modo geral considera-se que o consumidor brasileiro ainda é particularmente, pouco exigente quanto à qualidade de seus produtos hortícolas. As hortaliças, frequentemente, chegam aos principais pontos de abastecimento com qualidade consideravelmente depreciada, devida a práticas inadequadas de manuseio na colheita e pós-colheita, transporte precário e embalagens impróprias. A seguir, o produto exposto em embalagens e nas prateleiras, geralmente sofre danos diretos pelo manuseio excessivo no processo de compra pelo consumidor (MELO & VILELA, 2007).

A temperatura e a umidade dos produtos hortícolas são os fatores mais relevantes a serem controlados na fase pós-colheita. Visto que os vegetais necessitam de um ambiente úmido para a sua sobrevivência, esta condição favorece o desenvolvimento de vírus e formas infectantes de enteroparasitas tais como cistos de protozoários, ovos de helmintos (SIMÕES et al., 2001).

A refrigeração de produtos hortícolas é de fundamental importância. O tempo de espera para a refrigeração desses produtos influi diretamente na vida de prateleira, pois

influencia na qualidade e favorece as perdas (SHEWFELT, 1986). Deve-se destacar que a sobrevivência dos oocistos e cistos é favorecida em baixas temperaturas.

De igual importância, o tipo de transporte usado na distribuição de hortaliças, depende da distância existente entre o local de produção e o de consumo, dos custos e do tipo de hortaliça (CEASA, 1999).

No caso das hortaliças destinadas ao consumo “*in natura*”, tem-se ainda o agravante de que suas qualidades não podem ser melhoradas, mas somente preservadas. Assim sendo, a proteção destes produtos deve começar no campo, especialmente no momento da colheita, utilizando-se métodos adequados, que evitem danos ao produto e minimizem a possível contaminação por microrganismos patogênicos (SHEWFELT, 1986).

Os alimentos de origem vegetal, e a água que os irriga, podem veicular diversos microrganismos patogênicos, causadores de muitas perturbações fisiológicas nos indivíduos que os consomem. As possibilidades de se contrair uma doença, muitas vezes fatal, são mais concretas do que supomos e, para que isso não ocorra, os alimentos devem ser preparados com higiene (ROSEN et al., 2000), .

Garantir uma qualidade microbiológica aceitável e segura do alimento manipulado, e do próprio manipulador dos alimentos é imprescindível.

É fundamental, sensibilizar o produtor proprietário responsável pelo estabelecimento, sobre a qualidade sanitária das hortaliças. Informar os princípios básicos de segurança alimentar e identificar os procedimentos que colocam em risco esses princípios; bem como, orientar os manipuladores de alimento para que se tenha um controle efetivo e mais específico referente à manipulação dos mesmos e sua inocuidade. A recomendação é eliminar a contaminação por patógenos por ocasião da manipulação,

esclarecendo e instruindo o trabalhador sobre como tratar o alimento sem o risco da propagação das doenças (www.ipv.pt.htm).

A indústria alimentícia está cada vez mais comprometida no desenvolvimento de planos e metas de segurança para os seus produtos. Pode-se inferir que, a vigilância epidemiológica voltada à saúde pública, a investigação cuidadosa e a atenção responsável pela segurança alimentar dos produtos hortícolas, da propriedade agrícola ao consumidor, definem as medidas de controle como necessárias para um futuro seguro e previsível (TAUXE, 2002).

2.8. Características do abastecimento de hortaliças procedentes da região agrícola de Campinas, SP..

2.8.1. A agricultura familiar e o “cinturão verde” de Campinas.

O setor rural contemporâneo vem passando por importantes transformações que estão lhe conferindo características novas. Essas transformações parecem estar ocorrendo em todo o país, mas apresentam-se de forma mais intensa e nítida nos estados mais desenvolvidos como São Paulo e, principalmente a partir da década de 90 (DA SILVA, 1999).

O que se percebe é que está em gestão uma nova forma de ocupação e utilização do espaço rural, com uma dinâmica própria, distinta das anteriores. Esta nova realidade tem sido denominada de “*neo rural*” (DA SILVA, 1999), e é constituída fundamentalmente, de uma agricultura moderna, que garante a sustentabilidade do meio ambiente (PINTO, 2002).

A unidade de produção familiar agrícola é regida por princípios gerais de funcionamento interno que a torna diferente da unidade de produção capitalista (WANDERLEY, 1998).

Tradicionalmente, a idéia de agricultura familiar baseia-se na identidade entre família e exploração. A unidade de produção é um grupo familiar em que os membros estão ligados por laços de parentesco biológico ou simbólico, um grupo social que se constitui e se renova tendo como base as relações familiares. Ocupa um mesmo espaço, não necessariamente a mesma habitação, e cujos indivíduos estão ligados entre si, sobretudo através de um bem comum, a produção, e com isso, a exploração familiar assegura a subsistência do grupo (LAMARCHE, 1993). O agricultor familiar tem como herança a tradição camponesa que se adaptou às novas exigências do mercado (WANDERLEY, 1998).

Esta população residente na área rural próxima aos grandes centros urbanos se caracteriza pela sustentabilidade que implica tanto no atendimento às necessidades humanas quanto no respeito ao meio ambiente, ambos considerados sob a perspectiva de garantir a continuidade de reprodução de uma dada população, e se permitir as mesmas possibilidades às gerações futuras (PINTO, 2002). Pela sua baixa densidade de ocupação e pela garantia da manutenção da permeabilidade do solo, a agricultura familiar, é vista como alternativa econômica de uso do solo, mais compatível com as exigências de uma área de manancial (WANDERLEY, 1998).

O meio rural brasileiro possui novas funções e por isso não pode mais ser visto apenas por suas atividades agropecuárias e agroindustriais. Da Silva (1999) registrou que nos anos 60 e 70 um número expressivo de trabalhadores rurais se deslocou da zona rural para as periferias das grandes cidades ocorrendo uma “urbanização do meio rural”.

Campinas, localizada no Estado de São Paulo e numa das regiões mais desenvolvidas do país, é um pólo tecnológico integrante da terceira mais importante região agropecuária do Estado de São Paulo em termos do valor da produção e da ocupação de

mão de obra. É também, um município de tamanho expressivo (79.760 ha) em relação a esta região, e tem mais 50% de seu espaço físico como área rural (41.380) ha. (PINTO, 2002).

A zona rural de Campinas é reconhecida como fonte geradora de riquezas e empregos. A população rural do município de Campinas passou de 73.151, em 1980, para 16.178 habitantes, em 2000, é evidente que essa redução está relacionada a mudanças no perímetro urbano associado à migração campo/cidade (PINTO, 2002).

A região agrícola de Campinas conta com os chamados “cinturões verdes” produtores de uma ampla variedade de hortaliças, principalmente alface e rúcula, e de outros produtos agrícolas, que hoje, coincidem com as novas exigências do mercado, o que gerou o aumento de produtores em pequenas propriedades. O clima fresco e ameno, devido à altitude, favorece o desenvolvimento de verduras na região e garante maior qualidade dos produtos. Assim sendo, a produção de hortaliças não se encontra igualmente distribuída por todas as Divisões Regionais Agrícolas (DIRAs), tendendo a se concentrar em algumas delas (LUPA, 1997/1998).

Nos “cinturões verdes”, em Campinas, predominam as pequenas propriedades onde se desenvolve a agricultura familiar. São os agricultores familiares que dirigem o processo produtivo, dando ênfase na diversificação e utilizando o trabalho familiar, eventualmente complementado pelo trabalho assalariado (LUPA, 1997/1998).

O LUPA (Levantamento Censitário de Unidades de Produção Agrícola – 1997/1998) executado pela Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, tomou como unidade para o seu levantamento a UPA (Unidades de Produção Agrícola), que é o imóvel rural com exploração econômica e com área igual ou superior a 0,1 ha utilizada para auto consumo e comercialização. Em Campinas há 808 UPAS com

uma área total de 39.267 ha.. Das 809 propriedades 95,5% possuem energia elétrica residencial, 64,24% têm energia elétrica para uso agrícola e 55,74% têm telefone. Dentre os proprietários 40% têm curso superior completo e 67,45% têm o primeiro grau completo. Quase 40% dos proprietários moram nas UPAs e há 20% de arrendatários.

Atualmente, quase o total da produção gerada nos “cinturões verdes” é responsável pelo abastecimento da CEASA – Campinas (Centrais de Abastecimento de Campinas S.A.), feiras livres e mercados, não só do Estado de São Paulo, como também de outros Estados.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo geral:

Investigar a ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em amostras de hortaliças produzidas na região agrícola de Campinas e comercializadas pela CEASA – Central de Abastecimento de Campinas S.A., assim como, avaliar a água utilizada na irrigação das mesmas, e as condições higiênico-sanitárias das UPAs – Unidades de Produção Agrícola estudadas.

3.2. Objetivos específicos:

3.2.1. Avaliar a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em amostras de hortaliças incluídas no estudo por meio das técnicas:

- filtração em membranas de ésteres mistos de celulose (47mm de diâmetro e 3µm de porosidade nominal, Millipore®), utilizando a água de lavagem dos vegetais, seguida do exame dos patógenos pela imunofluorescência direta, para verificar a aplicabilidade desta metodologia na detecção destes protozoários parasitas em vegetais;
- centrífugo-flutuação em sulfato de zinco, com exame dos sedimentos obtidos, por coloração com lugol.

3.2.2. Comparar as técnicas de filtração em membrana seguida de imunofluorescência direta e da técnica de centrífugo-flutuação em sulfato de zinco, quanto à eficiência de detecção destes protozoários nos vegetais.

3.2.3. Investigar a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. na água dos reservatórios e poços utilizados para a irrigação das hortaliças nas UPAs – Unidades de Produção Agrícola.

3.2.4. Determinar a influência de fatores ambientais na contaminação de hortaliças produzidas pelas UPAs, avaliada por meio de aplicação de questionários estruturados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Caracterização das propriedades agrícolas e critérios para a avaliação das amostras de hortaliças e de água de irrigação

A regional agrícola de Campinas é composta por 17 municípios, a maioria deles, localizados na Região Metropolitana de Campinas (RMC) (Figura 1). O número de propriedades que cultivam hortaliças nesta região é bastante significativo (n=3.232), segundo os dados do Projeto LUPA (Secretaria de Agricultura e Abastecimento; Coordenadoria de Assistência Técnica Integral, 1997-1998). Estas instalações, contam com seus proprietários e contêm um universo de pessoas registradas como trabalhadores fixos e temporários. As hortaliças produzidas nestas propriedades agrícolas são distribuídas à população por intermédio de uma central de abastecimento, CEASA (Central de Abastecimento de Campinas S/A) sediada em Campinas, a qual forneceu dados para a localização das propriedades produtoras e fornecedoras. Destas propriedades, 15 (Tabela 1) foram selecionadas para inclusão no projeto. O critério de escolha foi definido por distâncias entre as localizações das propriedades, de tal forma, que caracterizasse uma representatividade a partir de diferentes fontes produtoras de hortaliças do conjunto de UPAs cadastradas na Ceasa, bem como pelo grau de dificuldade de se obter colaboração por parte dos produtores e/ou trabalhadores.

As colheitas das amostras de hortaliças foram realizadas em 2 anos consecutivos de tal forma que, o 1º e 3º períodos das colheitas ocorressem nos meses de fevereiro, março e abril. Tal periodicidade de colheita é correspondente aos meses de maior ocorrência (esperada) de casos de criptosporidiose em Campinas, devido à acentuada sazonalidade do protozoário no fim do verão e início do outono (FRANCO & CORDEIRO, 1996). O 2º e 4º

períodos das colheitas correspondem aos meses de junho, julho e agosto, período de maior utilização das águas subsuperficiais na irrigação das hortaliças devido à escassez de chuvas.

As análises das hortaliças foram concretizadas simultaneamente à das amostras de água utilizadas na irrigação destas unidades agrícolas.



Figura 1. Dados sobre a Regional Agrícola de Campinas (Projeto LUPA, 1997/1998), região do “Cinturão verde”, responsável pela maior produção e comercialização de hortaliças (especificamente vegetais folhosos) para a CEASA, correspondente aos municípios de: Monte Mor (2), Sumaré (3), Hortolândia (4), Paulínia (5) e Campinas (7).

Tabela 1. Unidades de Produção Agrícola – UPAs. da Região Metropolitana de Campinas (SP) selecionadas para estudo mediante sorteio e, dados de georreferenciamento.

UPAs	Localização	Município	Coordenadas
I Sítio S. Benedito	Betel	Paulínia	22° 47'48.09" S 47° 06'54.94" W
II Chácara S.Pedro	Estrada Cps/M.Mor, km22,5	Monte Mor	22° 56'18.28" S 47° 16'28.76" W
III Sítio Mendonça	Amarais	Campinas	22° 50'44.13" S 47° 07'39.36" W
IV Sítio S.Francisco II	Amarais	Campinas	22° 49'28.73" S 47° 08'30.19" W
V Sítio Regina	Boa Vista	Campinas	22° 52'56.77" S 47° 08'28.52" W
VI Sítio Boa Esperança	Estrada Cps/M.Mor	Campinas	22° 51'45.47" S 47° 09'44.78" W
VII Horta do Lima	Parque Ceasa	Campinas	22° 50'10.49" S 47° 05'36.50" W
VIII Horta do Edinho	Av.Paulista, 450	Paulinia	22° 45'09.17" S 47° 09'59.24" W
IX Chácara Pazzeti	Rod.Mílton T.Sousa, km.125,5	Campinas	22° 45'50.57" S 47° 08'11.51" W
X Chácara Boa Esperança	Boa Vista	Campinas	22° 52'02.20" S 47° 08'35.15" W
XI Assentamento	Horto Florestal	Sumaré	22° 50'07.82" S 47° 15'33.87" W
XII Sítio Jatobá	Rod.Mílton T.Sousa, km.17/18	Campinas	22° 48'53.48" S 47° 06'28.64" W
XIII Horta do Zé Franco	Rua Emília S. Bonato	Campinas	22° 49'58.89" S 47° 05'05.42" W
XIV Horta do Geraldo	Sítio Monte Azul	Hortolândia	22° 52'09.85" S 47° 09'33.12" W
V Sítio Santa Beatriz	Rod.Cps/M.Mirim, km 116	Campinas	22° 49'58.99" S 47° 00'26.96" W

4.2. Coleta das informações sobre as condições sanitárias das propriedades

Em ocasião prévia às colheitas, foram realizadas entrevistas com os proprietários ou trabalhadores da unidade agrícola que aceitarem colaborar com o estudo, para obtenção do consentimento por escrito (anexo 2) após prestar esclarecimentos sobre os objetivos e a

importância da pesquisa. Foram preenchidos 15 questionários (anexo 1) visando obter informações sobre as condições sanitárias além do perfil agrícola das propriedades

As variáveis epidemiológicas estudadas como fatores de risco e abordadas nos questionários foram selecionadas de observações de atitudes e comportamentos presentes nas propriedades rurais referentes ao uso de água, das condições sanitárias e de saneamento bem como levantadas a partir de estudos arrolados na literatura científica (FRANCO & CORDEIRO, 1996; SODRÉ & FRANCO, 2001).

4.3. Colheita e análises parasitológicas das amostras de hortaliças e da água de irrigação.

4.3.1. Colheita e processamento das amostras de hortaliças.

Neste estudo, para avaliação da contaminação de hortaliças por enteroparasitos, foram utilizadas amostras de alface (*Lactuca sativa*) e rúcula (*Eruca sativa*), por apresentarem grande demanda de consumo cruas, facilidade e quantidade de produção, bem como possibilidade de contaminação por água e solos poluídos (MESQUITA, et al., 1999).

As colheitas de alface e rúcula foram realizadas em sacos plásticos de primeiro uso, sempre durante a manhã, em períodos de baixa pluviosidade, após a irrigação das mesmas, e a seguir, registrando a temperatura local. As diversas amostras foram imediatamente transportadas para o laboratório em condições apropriadas de refrigeração.

Para análise dos vegetais, cada amostra (50g de folhas) preferencialmente as folhas externas, foi acondicionada em saco plástico de primeiro uso, sem contato manual, por meio de pinça metálica, previamente descontaminada. Logo após, as amostras foram lavadas com solução de eluição (água destilada contendo Tween 80 (1%) mediante agitação manual durante um minuto. O líquido resultante foi submetido à pré-filtração em tamis

(1mm²), seguida da filtração em membranas de ésteres mistos de celulose (47mm de diâmetro e 3,0µm de porosidade nominal, Millipore®;), utilizando-se bomba de vácuo com fluxo de 4L/min (FANEM®). Em seguida, o material presente na membrana foi eluído, com a finalidade de recuperar os oocistos e cistos eventualmente presentes nos espécimens.

4.3.2. Recuperação de oocistos e cistos a partir da água de lavagem dos vegetais.

Após filtração, os oocistos e cistos eventualmente presentes nas diversas amostras foram eluídos da membrana filtrante por meio de extração mecânica e alternadamente, por lavagem da superfície da mesma com solução de eluição contendo Tween 80 (1 %), de acordo com Franco et al. (2001b). O líquido resultante foi transferido para tubos de centrífuga. Após duas centrifugações por 10min a 1050 x g (aproximadamente 2400rpm), foi aspirado cuidadosamente o sobrenadante até a graduação final de 1mL. Transferia-se o “pellet” para um tubo eppendorf, mantendo o volume final de 1mL, procedendo à identificação da amostra e o registro dos dados num caderno de laboratório. Os sedimentos finais das amostras acondicionados em tubos de eppendorf foram conservados a 4-8°C, e posteriormente num prazo máximo de 24 horas, submetidos aos procedimentos de Imunofluorescência Direta, utilizando o kit Merifluor (Meridian Diagnostics, Cincinnati, Ohio), para determinação da presença/ausência de oocistos e cistos (*Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp.). Paralelamente, foram conduzidos procedimentos com o reagente 4',6'-diamidino - 2 phenylindole (DAPI) como teste confirmatório da presença de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., como descrito em Smith et al. (2002).

Vários parâmetros limitantes da sensibilidade do procedimento de detecção dos protozoários nas hortaliças foram testados, previamente à colheita bianual das amostras,

com o objetivo da melhoria da eficiência do isolamento dos parasitos presentes nos vegetais, para o desenvolvimento da metodologia que assegure maior eficiência de recuperação, como segue:

- peso das amostras a serem processadas: ensaios comparando 100g (n=2) e 50g (n=7).
- volume usado na lavagem dos vegetais: ensaios comparando 400mL (n=2), 150mL (n=1) e 100mL (n=6).
- tempo de agitação para lavagem das hortaliças: ensaios comparando 30 segundos (n=2) e 60 segundos (n=7).

Para a realização dos ensaios posteriores, visando a análise parasitológica dos vegetais “*in natura*”, foram adotados os parâmetros correspondentes aos testes que resultaram em maior eficiência de recuperação (Tabela 7).

4.3.3. Colheita e processamento das amostras de água de irrigação.

As colheitas das amostras de água de irrigação foram realizadas simultaneamente à das amostras de hortaliças destas unidades agrícolas, com auxílio de balde e cordel (anteriormente descontaminados com uma solução de hipoclorito de sódio a 10%), e acondicionadas em frascos de polipropileno previamente limpos e enxaguados com solução de eluição com Tween 80 (1%) e com água destilada. As colheitas foram realizadas sempre no mesmo horário do dia sendo obtidos 10 litros (amostra composta), sendo 5L recolhidos a 20cm da superfície do tanque de irrigação e 5L recolhidos diretamente do dispositivo (mangueira) de irrigação. Imediatamente após a colheita das diversas amostras de água, era

medida a temperatura das mesmas, e estas eram transportadas para o laboratório em condições adequadas de refrigeração.

4.3.4. Recuperação de oocistos e cistos apartir da água de irrigação.

No laboratório, a água do galão (dez litros) era homogeneizada por um minuto. Alíquotas da água eram determinadas para avaliação dos parâmetros de pH, turbidez, cor e condutividade elétrica, a seguir, eram filtrados um volume mínimo de 2 litros do total de cada amostra, e na seqüência o procedimento de eluição das membranas conforme realizado anteriormente para as hortaliças, de acordo com os itens 4.3.2 e 4.3.5. Após cada colheita das águas, o frasco coletor era lavado com álcool 70% e solução de eluição.

A sensibilidade do procedimento de detecção dos protozoários nas águas de irrigação também foi testada, como segue: após a colheita da água de irrigação conforme o item 4.3.3, efetuou-se a homogeneização do galão contendo água, foram retirados 2 litros e depositados num recipiente plástico (garrafa previamente descontaminada). Adicionou-se um inóculo contendo oocistos (10^3) e cistos (10^2) no interior da garrafa com água e esta permaneceu em repouso por 24h. Na seqüência, efetuou-se a filtração efetiva dos 2 litros da água, e a recuperação dos oocistos e cistos desta amostra contaminada artificialmente procedeu-se conforme descrito anteriormente neste mesmo item. A detecção e quantificação dos parasitos foram realizadas conforme o item 4.3.5., e o cálculo da eficiência de recuperação dos oocistos e cistos foi calculado conforme o item 4.4.1.

4.3.5. Detecção e quantificação de oocistos *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. mediante a Reação de Imunofluorescência Direta (RID) e teste confirmatório com DAPI (- 4',6'- diamidino - 2 phenylindole):

Para análise das amostras, a reação de Imunofluorescência Direta com anticorpos monoclonais específicos, foi efetuada da seguinte forma: uma ou mais alíquotas de 5µm das várias amostras foram transferidas e aplicadas de maneira uniforme nos poços da lamina de imunofluorescência e após a secagem natural da lamina, foram fixadas com 10µL de metanol absoluto em cada poço da lâmina por 10 minutos. Adicionou-se a cada poço (da lâmina), uma gota do reagente de detecção contendo anticorpo monoclonal anti-*Cryptosporidium* spp. e anti-*Giardia* spp., marcado com fluoresceína e também uma gota do contra-reagente. As lâminas foram mantidas à temperatura ambiente em câmara úmida e protegidas da luz. Na sequência, o excesso de reagentes foi retirado procedendo à lavagem de cada poço da lamina com solução tampão diluída (2,5mL da solução tampão do Kit Merifluor mais 47,5mL de água destilada).

Em um próximo passo, foram aplicados 25µL da solução de DAPI (- 4',6'-diamidino - 2 phenylindole), diluído numa proporção de 1/5000 em PBS, objetivando a realização de testes confirmatórios da morfologia dos patógenos, simultaneamente a RID. Após 10 minutos foi retirado o excesso de DAPI e procedeu-se às lavagens por PBS. Finalmente, foram aplicados 10µL do meio de montagem, em cada poço e, recoberta a lâmina com uma lamínula. As preparações foram examinadas ao microscópio de epifluorescência (Jenalumar – Carl Zeiss®) com aumentos de 250x, 400x e 1000x e filtros apropriados de epifluorescência (filtro de excitação: 450-490nm; filtro de barreira: 520nm), e DAPI (filtro de excitação: 365-400nm; filtro de barreira: 395nm).

A confirmação da presença de cistos e/ou oocistos, foi determinada pela observação simultânea em microscópio de contraste de fase e de fluorescência. Após a leitura da RID, foi realizado o teste confirmatório utilizando o corante fluorogênico vital, DAPI (- 4',6'-diamidino - 2 phenylindole) Sigma Chemicals®, conforme descrito por Smith et al. 2002.

4.3.6. Critérios de positividade visando à identificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp..

Para a identificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. os critérios de positividade considerados foram: em relação à imunofluorescência, observação do grau de fluorescência definida pela intensidade verde-maçã brilhante (comparável àquela exibida por mais de 50% dos oocistos e cistos presentes nas suspensões dos controles positivos) predominante na parede dos organismos, formato (ovalado a esférico) e tamanho compatíveis a 3-8,5µm de diâmetro para oocistos e, para cistos, tamanhos de 8-12µm e formas ovaladas.

Quanto à microscopia de contraste de fase, observação de estruturas internas como: presença de sutura para oocistos e presença de axonema e dos núcleos (1 a 4) para os cistos.

Durante a análise do teste confirmatório utilizando o corante fluorogênico vital DAPI, a observação da presença de núcleos (1 a 4) corados nitidamente em azul-céu intenso, visualizados dentro de um único oocisto ou cisto.

4.3.7. Estimativa do número de oocistos e cistos presentes nas diversas amostras.

O número de oocistos/cistos nas amostras dos vegetais (água de lavagem das hortaliças) e da água de irrigação foi estimado a partir da equação:

$$\boxed{X = \frac{n}{K} \times \frac{S}{A}} \quad (1)$$

onde:

X = concentração de oocistos/cistos/L de água de irrigação ou de água de lavagem dos vegetais (100 mL);

n = número de oocistos ou cistos visualizados no poço da lâmina de imunofluorescência.

K = volume do sedimento examinado no poço da lâmina (em µL).

S = volume total do sedimento obtido (em µL).

A = volume efetivamente filtrado da amostra (em litro).

4.4. Experimento controle: análise da sensibilidade da metodologia empregada.

A sensibilidade das metodologias utilizadas para lavagem, filtração, eluição e concentração das amostras e detecção de oocistos e cistos, foram avaliadas por meio da inoculação de oocistos e cistos (procedentes do Kit Merifluor anti-*Cryptosporidium*/anti-*Giardia*) em diferentes concentrações em amostras controles. Experimentos controle positivos e negativos foram conduzidos em intervalos regulares, durante os anos de 2003, 2004 e 2005, para avaliação de diversos procedimentos da metodologia proposta. Os experimentos de semeadura artificial foram realizados simultaneamente para as amostras de hortaliças e amostras da água de irrigação.

Para tal, o cálculo do inóculo e da dose a ser semeada nas amostras-controle, foram definidos a partir do exame de três alíquotas de 5µL da suspensão de oocistos e cistos do

Kit Merifluor, e da enumeração direta dos parasitos nos poços da lamina de imunofluorescência, sendo calculada a média do número de oo/cistos encontrados em 5µL. A partir desta média, realizou-se uma diluição em água destilada com a finalidade de obter uma suspensão de trabalho que continha em torno de 100 a 3000 oo/cistos/100µl, estas suspensões foram inoculadas experimentalmente nos vegetais e na água de irrigação respectivamente, e estes foram submetidos aos mesmos procedimentos descritos nos itens 4.2.1; 4.2.2. e 4.2.3, determinando-se a porcentagem de eficiência de recuperação.

4.4.1. Cálculo da eficiência de recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp.

A eficiência de recuperação da metodologia utilizada foi avaliada com base no número de oocistos e cistos enumerados nos poços da lâmina de imunofluorescência, presentes tanto nas amostras semeadas artificialmente como nas amostras brutas, por meio da seguinte equação:

$$Y = \frac{r - b}{i} \times 100 \quad (2)$$

sendo:

Y = eficiência de recuperação (%) em amostras de hortaliças ou águas de irrigação.

r = número de oocistos/cistos recuperados das amostras controle +

b = número de oocistos/cistos presentes nas amostras brutas.

i = número inicial de oocistos/cistos inoculados na amostra controle.

4.4.2. Experimentos controle negativos

Para o controle negativo da metodologia empregada, uma amostra de água destilada foi processada a cada período dos experimentos intercalando a filtração das amostras das propriedades de acordo com os procedimentos descritos nos itens 4.2.1; 4.2.2. e 4.2.3. Assim o controle negativo serviu como indicativo de possível contaminação do sistema.



Figura 2. Unidade de Produção Agrícola VI – Campinas, produção de alface.



Figura 3. Unidade de Produção Agrícola V – Campinas, tanque de irrigação.

4.5. Exame dos fitonematóides detectados.

Na avaliação da alta densidade populacional de fitonematóides que se encontravam na área cultivada, foram retiradas amostras simples do solo e estas foram processadas de acordo com Jenkins (1954) e Coolen & D'Herde (1972).

Efetuuou-se o reconhecimento dos nematóides pela montagem dos espécimes em lâminas semipermanentes e pelo uso de chaves de classificação atualizadas (DECKER, 1989; NICKLE, 1991).



Figura 4. Fitonematóide



Figura 5. Fitonematóide

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação das condições sanitárias das UPAs – Unidade de Produção Agrícola

Averiguou-se, num período anterior às colheitas, que os agricultores tiveram acesso a diferentes formas de ensino – escolaridade, mas a maioria, residentes em 12 (80%) das propriedades, sabia ler e escrever e cursaram o ensino médio, sendo que em 2 (13%) das UPAs os agricultores proprietários eram Engenheiros Agrônomos, entretanto, em 3 (20%) das propriedades investigadas os agricultores não completaram o primeiro grau. Algumas famílias com objetivo de dar continuidade ao trabalho familiar (dados dos produtores extra inquérito epidemiológico das UPAs).

As condições socioeconômicas relacionadas à população e a infra-estrutura domiciliar foram mais precárias em apenas uma das UPAs que se caracterizava como o Assentamento de Terra (UPA nº XI). Todas as famílias têm no seu estabelecimento a sua principal fonte de renda. E todos os estabelecimentos analisados contratam mão-de-obra para auxiliar a família no trabalho.

Com relação às características das Unidades de Produção Agrícola, pode-se observar, que todas as propriedades aplicavam adubação natural, fazendo uso da “cama de frango”, e com menos frequência a adubação química concomitante a adubação natural (Anexo 4).

Quanto à irrigação, o sistema utilizado pelos produtores para irrigar as hortaliças era o sistema de aspersão convencional semi-portátil, em todas 15 (100 %) as propriedades analisadas, este sistema é usado especialmente em pequenas áreas de produção, e se adapta melhor às condições diferentes de solo e topografia (Anexo 4).

Quanto ao tipo de captação de água para a irrigação, haviam 13 (87%) propriedades cuja água utilizada para a irrigação era proveniente de água subterrânea (mina) que formavam os chamados “tanques de irrigação”; e em 2 (13%) das propriedades, a água usada para irrigar era proveniente de poços semi-artesianos (Anexo 4).

Em relação à presença de animais, observou-se apenas animais domésticos de pequeno porte como aves e cães em 14 (93 %) das propriedades investigadas. Não sendo encontrados bovinos e nem instalações para confinamento em nenhuma das propriedades analisadas (Anexo 4).

Todas as propriedades apresentavam edificações como barracões abertos ou galpões para manipulação, armazenamento e distribuição da produção agrícola, sempre em boas condições de higiene (Anexo 4) .

Na análise das instalações sanitárias das UPAs, em 7 (46 %) das propriedades analisadas tinham rede geral ligadas às suas casas, e 5 (33%) tinham fossa séptica, em 2 (13 %) foram descritas como outras e apenas em 1 (6 %) o esgoto era a céu aberto. As propriedades que possuíam fossas séptica mantiveram uma distância destas, até às áreas de produção de hortaliças, de no mínimo 100m.

Quanto às características sanitárias das moradias das UPAs, o destino do lixo em 4 (26 %) das propriedades era coletado, e 10 (67 %) o lixo era queimado ou enterrado, e somente em 1 (6 %) o lixo era jogado a céu aberto (Anexo 4).

O tipo de abastecimento de água para 6 (40 %) das UPAs analisadas era pela rede geral de abastecimento; 6 (40 %) utilizavam água de minas subterrâneas com canalização interna; 2 (13 %) usavam água de poço, porém sem canalização interna, e 1 (6 %) das UPAs não possuía moradia, portanto sem rede de abastecimento.

Todas as moradias possuíam reservatórios (caixas d'água) com cobertura e em estado bom de saneamento (Anexo 4).

Com relação à produção de hortaliças, em 14 (93%) das propriedades investigadas com exceção de 1 (7%) delas, a área de cultivo destinada à plantação dos vegetais era localizada sempre num nível bem mais alto em relação a toda área da propriedade, ou seja, áreas que não estão sujeitas a inundações/enchentes. A técnica de cultivar as hortaliças “no alto” evitando inundações foi trazida para Campinas juntamente com os pioneiros produtores de rúcula há duas décadas (CEASA) (Anexo 4).

Em todas as propriedades, as hortaliças após a colheita são lavadas no interior de caixas de amianto contendo água (a mesma utilizada para a irrigação), estas caixas são sempre tampadas e no período de dois dias são submetidas à lavagem e efetuada a troca da água, segundo informações obtidas junto aos proprietários das UPAs (Anexo 4).

5.2. Avaliação da contaminação das hortaliças e da água de irrigação.

Foram realizadas 60 colheitas de cada hortaliça, nos períodos caracterizados como sendo chuvoso: fevereiro/março/abril (30 colheitas) e de estiagem: junho/julho/agosto (30 colheitas). Foram analisadas 120 amostras sendo: 60 alfaces e 60 rúculas.

Nas amostras examinadas para oocistos e cistos nos quatro períodos de avaliações, *Cryptosporidium* spp. não foi detectado em quaisquer das 120 amostras de hortaliças. Em relação à *Giardia* spp. foi observada a presença de cistos em 5 das 15 propriedades durante os quatro períodos de colheitas, como segue:

- 20,0% das propriedades apresentaram cistos isolados de *Giardia* spp. em amostras de hortaliças (ou seja, cistos de *Giardia* spp. presentes em três propriedades de 15 analisadas) no 1º período de colheita.

- Não foram encontrados cistos de *Giardia* spp. nas amostras de hortaliças das propriedades investigadas no 2º período de colheita.
- 13,3% das propriedades apresentaram cistos isolados de *Giardia* spp. em amostras de hortaliças (ou seja, cistos de *Giardia* spp. presentes em duas propriedades de 15 analisadas) no 3º período de colheita.
- Não foram encontrados cistos de *Giardia* spp. em quaisquer das propriedades analisadas no 4º período de colheita.
- À despeito dos períodos de colheitas, do total de 60 amostras de alface analisadas, 6,6 % (4 amostras) continham cistos de *Giardia* spp., cuja densidade de parasitos variou de 180 a 230cistos/50g de alface.
- À despeito dos períodos de colheitas, do total de 60 amostras de rúcula analisadas, 1,6 % (1 amostra) continham cistos de *Giardia* spp., cuja densidade de parasitos foi de 180cistos/50g de rúcula.
- Não foram encontrados protozoários patogênicos utilizando-se a técnica de centrífugo-flutuação em Sulfato de zinco – Método de Faust, em quaisquer das hortaliças examinadas.
- Foi detectada a presença de grande quantidade de fitonematóides nos exemplares de hortaliças (Tabelas 2, 3, 4, 5) empregando-se a técnica de centrífugo-flutuação em sulfato de zinco – Método de Faust. Os fitonematóides foram reconhecidos como pertences à família Pratylenchidae.
- Do total de 60 amostras de alface analisadas durante esse estudo, 70 % (42) amostras continham ovos e 48% (29) continham larvas de fitonematóides. Do total

de 60 amostras de rúcula analisadas durante esse estudo, 66 % (40) amostras continham ovos e 45 % (27) continham larvas de fitonematóides.

- Do total de 15 propriedades investigadas durante os 4 períodos 83 % (12,5) continham ovos e 55 % (8,25) continham larvas de fitonematóides.

5.3. Avaliação da contaminação da água de irrigação.

Foram realizadas 60 colheitas das águas de irrigação com o mesmo propósito de investigar períodos chuvosos e de estiagem (irrigação intensa).

Nas amostras examinadas para oocistos e cistos nos quatro períodos de avaliações, *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. não foram detectados em quaisquer das 60 amostras das águas de irrigação (Tabela 9).

Na investigação da água de irrigação vários parâmetros químicos e físicos foram avaliados, alguns deles não puderam ser avaliados no primeiro período de coleta, devido à falta de disponibilidade de aparelhos específicos para estas análises, isto só foi possível a partir do segundo período de coleta com a colaboração do laboratório de Qualidade de Águas da Universidade de Alfenas, MG (Tabela 9).

5.4. Experimentos controle

Os resultados referentes aos ensaios-controles onde algumas etapas (peso das hortaliças a serem processadas, volume da solução de Tween 80 (1 %) empregada na lavagem dos vegetais, e o tempo de agitação durante a lavagem das hortaliças) do método proposto foram testadas quanto ao seu potencial em melhorar a eficiência do isolamento

dos parasitos das hortaliças e da água de irrigação, encontra-se nas Tabelas 7 e 8 respectivamente.

Tabela 2. Avaliação da contaminação de amostras de hortaliças por oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de protozoários, com ênfase em *Giardia* spp. pela técnica de Imunofluorescência Direta e pelo método de Faust, e por ovos e larvas de helmintos, no primeiro período de colheita em 2004.

UPA	Tipo de amostra	Peso total da amostra (g)	Peso da amostra processado (g)		Volume final do sedimento/ pellet (µL) (mL)		Número de parasitos recuperados				
							Técnica IFA		Técnica FAUST		
							Protozoário		Metazoário		Protozo-ário
							Crypto	Giardia	ovos	larva	cisto
I	alface	270,0	51,0	50,3	115	0,5	-	-	-	-	-
	rúcula	140,0	50,0	50,0	125	0,6	-	-	2	-	-
II	alface	163,7	50,0	51,0	110	0,7	-	+	-	-	-
	rúcula	120,6	50,1	50,0	95	0,5	-	-	2	-	-
III	alface	306,0	50,6	51,0	115	0,5	-	+	1	-	-
	rúcula	120,6	50,0	50,0	90	0,6	-	-	2	-	-
IV	alface	178,0	51,0	50,0	100	0,7	-	-	-	-	-
	rúcula	148,0	50,0	50,0	80	0,5	-	-	1	-	-
V	alface	193,0	52,0	50,0	110	0,6	-	-	1	-	-
	rúcula	170,0	51,0	50,0	95	0,5	-	-	-	-	-
VI	alface	452,2	50,5	51,0	130	0,8	-	-	1	2	-
	rúcula	305,1	50,0	50,0	100	0,6	-	-	2	1	-
VII	alface	394,0	50,0	50,0	110	0,5	-	-	3	5	-
	rúcula	409,0	50,0	51,0	95	0,7	-	-	10	-	-
VIII	alface	590,0	51,0	50,0	115	0,6	-	-	6	-	-
	rúcula	335,0	50,0	50,0	95	0,5	-	-	2	2	-
IX	alface	244,0	51,0	50,0	90	0,8	-	+	1	2	-
	rúcula	267,0	51,0	50,0	105	0,6	-	-	2	1	-
X	alface	420,0	50,0	50,0	90	0,6	-	-	2	-	-
	rúcula	260,0	50,0	50,0	95	0,5	-	-	2	-	-
XI	alface	451,0	51,0	50,0	115	0,8	-	-	20	105	-
	rúcula	287,0	50,0	50,0	50	0,6	-	-	25	86	-
XII	alface	460,0	50,0	50,0	110	0,5	-	-	9	14	-
	rúcula	370,0	50,0	50,0	100	0,5	-	-	7	12	-
XIII	alface	500,0	51,5	51,0	120	0,7	-	-	4	6	-
	rúcula	310,0	50,0	50,0	100	0,5	-	-	9	15	-
XIV	alface	510,0	50,0	50,0	110	0,6	-	-	7	5	-
	rúcula	340,0	50,0	50,0	95	0,5	-	-	8	-	-
XV	alface	510,0	51,0	50,4	115	0,6	-	-	2	-	-
	rúcula	370,0	50,0	50,0	90	0,6	-	-	1	-	-

Crypto = oocisto de *Cryptosporidium* spp.

Giardia = cisto de *Giardia* spp.

Metazoários = ovo e larva de nematódeos

IFA = Imunofluorescência Direta

FAUST = Centrifugo-Flutuação em Sulfato de Zinco

UPA = Unidade de Produção Agrícola

Tabela 3. Avaliação da contaminação de amostras de hortaliças por oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de protozoários, com ênfase em *Giardia* spp. pela técnica de Imunofluorescência Direta e pelo método de Faust., e por ovos e larvas de helmintos, no segundo período de colheita em **2004**.

UPA	Tipo de amostra	Peso total da amostra (g)	Peso da amostra processado (g)		Volume final do sedimento/ pellet (µL) (mL)		Número de parasitos recuperados				
							Técnica IFA		Técnica FAUST		
							Protozoário		Metazoário	Protozoário	
IFA	FAUST	IFA	FAUST	<i>Crypto</i>	<i>Giardia</i>	ovo	larva	cisto			
I	alface	283,8	50,0	50,0	100	0,5	-	-	3	-	-
	rúcula	284,1	50,0	50,0	85	0,6	-	-	3	-	-
II	alface	334,3	50,0	50,0	95	0,5	-	-	-	-	-
	rúcula	260,7	50,0	50,0	85	0,5	-	-	-	-	-
III	alface	193,7	50,0	50,0	100	0,7	-	-	2	-	-
	rúcula	160,3	50,0	51,0	90	0,7	-	-	-	-	-
IV	alface	289,5	50,0	51,0	95	0,5	-	-	1	-	-
	rúcula	229,4	50,0	50,0	80	0,5	-	-	1	-	-
V	alface	337,1	50,0	50,0	100	0,6	-	-	-	1	-
	rúcula	354,0	50,0	51,0	85	0,5	-	-	1	3	-
VI	alface	331,9	50,0	50,0	95	0,5	-	-	2	-	-
	rúcula	283,4	50,0	50,0	85	0,5	-	-	-	-	-
VII	alface	462,7	52,0	51,0	100	0,5	-	-	-	-	-
	rúcula	164,9	50,0	50,0	80	0,5	-	-	1	-	-
VIII	alface	444,7	51,0	51,0	105	0,7	-	-	1	-	-
	rúcula	220,5	50,5	51,0	95	0,5	-	-	1	-	-
IX	alface	202,0	50,0	50,0	85	0,6	-	-	-	-	-
	rúcula	150,0	50,0	50,0	75	0,5	-	-	1	-	-
X	alface	221,0	50,0	50,0	105	0,6	-	-	1	-	-
	rúcula	231,0	50,0	50,0	90	0,5	-	-	-	-	-
XI	alface	529,5	51,0	51,0	115	0,6	-	-	2	-	-
	rúcula	278,0	50,5	50,0	95	0,5	-	-	-	-	-
XII	alface	254,0	50,0	50,0	95	0,6	-	-	-	-	-
	rúcula	200,7	50,0	50,3	85	0,6	-	-	-	1	-
XIII	alface	283,2	50,0	50,0	105	0,6	-	-	2	1	-
	rúcula	260,2	50,0	50,0	80	0,5	-	-	2	2	-
XIV	alface	201,4	50,0	50,0	95	0,8	-	-	1	1	-
	rúcula	194,3	50,0	50,0	80	0,6	-	-	2	1	-
XV	alface	316,0	50,5	50,0	110	0,6	-	-	-	-	-
	rúcula	390,0	50,0	50,0	95	0,5	-	-	-	-	-

Crypto = oocisto de *Cryptosporidium* spp.

Giardia = cisto de *Giardia* spp.

Metazoários = ovo e larva de nematódeos

IFA = Imunofluorescência Direta

FAUST = Centrifugo-Flutuação em Sulfato de Zinco

UPA = Unidade de Produção Agrícola

Tabela 4. Avaliação da contaminação de amostras de hortaliças por oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de protozoários, com ênfase em *Giardia* spp. pela técnica de Imunofluorescência Direta e pelo método de Faust., e por ovos e larvas de helmintos, no terceiro período de colheita em **2005**.

UPA	Tipo de amostra	Peso total da amostra (g)	Peso da amostra processado (g)		Volume final do sedimento/ pellet (µL) (mL)		Número de parasitos recuperados				
			IFA	FAUST	IFA	FAUST	Técnica IFA		Técnica FAUST		
							Protozoário	Protozoário	Metazoário	Metazoário	Protozoário
							<i>Crypto</i>	<i>Giardia</i>	ovo	larva	cisto
I	alface	137,1	50,0	50,0	100	0,6	-	-	2	5	-
	rúcula	147,8	50,0	50,0	90	0,5	-	+	-	2	-
II	alface	282,6	51,4	50,0	90	0,6	-	-	-	2	-
	rúcula	167,1	50,0	50,0	85	0,6	-	-	1	1	-
III	alface	268,2	50,0	50,4	95	0,8	-	-	-	-	-
	rúcula	252,2	50,0	52,3	85	0,6	-	-	-	1	-
IV	alface	220,0	50,5	51,0	110	0,5	-	-	1	1	-
	rúcula	170,0	50,0	50,0	90	0,5	-	-	-	1	-
V	alface	280,0	50,0	50,0	105	0,6	-	-	-	1	-
	rúcula	210,0	50,0	50,0	85	0,5	-	-	2	1	-
VI	alface	285,0	50,0	50,0	95	0,5	-	-	-	-	-
	rúcula	348,0	50,0	50,0	85	0,5	-	-	-	-	-
VII	alface	340,0	50,0	51,0	100	0,7	-	+	-	-	-
	rúcula	270,0	50,0	50,2	85	0,5	-	-	-	2	-
VIII	alface	234,1	50,0	50,0	95	0,7	-	-	-	4	-
	rúcula	173,4	50,0	50,0	85	0,5	-	-	-	-	-
IX	alface	179,0	50,0	50,0	95	0,6	-	-	1	3	-
	rúcula	154,0	50,0	50,0	90	0,5	-	-	-	2	-
X	alface	153,0	50,0	51,0	100	0,5	-	-	3	1	-
	rúcula	135,0	50,0	50,0	90	0,5	-	-	-	1	-
XI	alface	294,2	51,0	50,0	105	0,7	-	-	3	11	-
	rúcula	223,1	50,0	50,0	95	0,5	-	-	2	4	-
XII	alface	110,0	50,0	50,0	100	0,6	-	-	4	15	-
	rúcula	167,2	50,0	50,0	90	0,6	-	-	1	2	-
XIII	alface	330,0	50,0	50,0	105	0,5	-	-	-	1	-
	rúcula	192,2	50,0	50,0	90	0,5	-	-	1	3	-
XIV	alface	243,7	50,0	50,0	100	0,5	-	-	-	-	-
	rúcula	260,9	50,0	50,0	90	0,5	-	-	-	-	-
XV	alface	300,3	50,5	50,0	90	0,5	-	-	-	-	-
	rúcula	220,0	50,0	50,0	80	0,5	-	-	-	-	-

Crypto = oocisto de *Cryptosporidium* spp.

Giardia = cisto de *Giardia* spp.

Metazoários = ovo e larva de nematódeos

IFA = Imunofluorescência Direta

FAUST = Centrifugo-Flutuação em Sulfato de Zinco

UPA = Unidade de Produção Agrícola

Tabela 5. Avaliação da contaminação de amostras de hortaliças por oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de protozoários, com ênfase em *Giardia* spp. pela técnica de Imunofluorescência Direta e pelo método de Faust., e por ovos e larvas de helmintos, no quarto período de colheita em **2005**.

UPA	Tipo de amostra	Peso total da amostra (g)	Peso da amostra processado (g)		Volume final do sedimento/ pellet (µL) (mL)		Número de parasitos recuperados				
			IFA	FAUST	IFA	FAUST	Técnica IFA		Técnica FAUST		
							Protozoário		Metazoário	Protozoário	
						<i>Crypto</i>	<i>Giardia</i>	ovo	larva	cisto	
I	alface	190,0	50,0	50,0	60	0,6	-	-	8	2	-
	rúcula	200,0	50,0	50,0	55	0,5	-	-	3	1	-
II	alface	397,6	50,0	50,0	90	0,5	-	-	3	-	-
	rúcula	200,5	50,0	50,0	70	0,5	-	-	-	-	-
III	alface	665,0	51,0	51,0	110	0,5	-	-	4	-	-
	rúcula	275,0	50,0	50,5	75	0,5	-	-	1	-	-
IV	alface	435,0	50,0	50,5	95	0,7	-	-	2	-	-
	rúcula	231,0	50,0	50,0	75	0,5	-	-	-	-	-
V	alface	268,0	50,0	50,0	95	0,6	-	-	37	6	-
	rúcula	332,0	50,0	50,0	90	0,6	-	-	18	-	-
VI	alface	534,0	51,0	50,0	115	0,5	-	-	15	-	-
	rúcula	161,0	50,0	50,0	55	0,5	-	-	6	-	-
VII	alface	224,6	50,0	50,0	95	0,7	-	-	17	6	-
	rúcula	196,3	50,4	50,0	60	0,5	-	-	11	8	-
VIII	alface	435,0	51,0	50,5	100	0,6	-	-	5	-	-
	rúcula	223,5	50,0	50,0	85	0,6	-	-	2	-	-
IX	alface	200,0	50,0	51,0	105	0,5	-	-	12	9	-
	rúcula	180,0	50,0	50,0	90	0,5	-	-	10	6	-
X	alface	262,0	50,0	50,0	90	0,6	-	-	3	-	-
	rúcula	215,8	50,0	50,0	80	0,7	-	-	1	-	-
XI	alface	340,0	50,0	51,0	100	0,5	-	-	45	12	-
	rúcula	360,0	50,0	50,0	75	0,7	-	-	19	7	-
XII	alface	520,0	51,0	51,0	110	0,7	-	-	27	7	-
	rúcula	241,6	50,0	50,0	75	0,5	-	-	11	4	-
XIII	alface	333,0	50,4	50,0	95	0,6	-	-	18	3	-
	rúcula	216,0	50,0	50,0	80	0,6	-	-	7	5	-
XIV	alface	272,0	50,0	50,0	85	0,7	-	-	12	1	-
	rúcula	131,6	50,0	50,0	60	0,5	-	-	2	-	-
XV	alface	375,0	51,0	50,0	90	0,6	-	-	5	3	-
	rúcula	172,0	50,0	50,0	60	0,6	-	-	3	-	-

Crypto = oocisto de *Cryptosporidium* spp.

Giardia = cisto de *Giardia* spp.

Metazoários = ovo e larva de nematódeos

IFA = Imunofluorescência Direta

FAUST = Centrifugo-Flutuação em Sulfato de Zinco

UPA = Unidade de Produção Agrícola

Tabela 6. Densidade de cistos presentes em 100mL de água de lavagem de 50g de folhas de alface e/ou rúcula, recuperados mediante o método de filtração em membranas e visualização por imunofluorescência direta (RID) com anticorpos monoclonais anti-*Giardia*.

UPAs (período da colheita)	Tipo de vegetal	Número de cistos
I (3º período)	rúcula	180
II (1º período)	alface	220
III (1º período)	alface	230
VII (3º período)	alface	200
IX (1º período)	alface	180

UPAs = Unidades de Produção Agrícola

Tabela 7. Avaliação da contaminação de amostras de alface e rúcula por oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos *Giardia* spp. pela técnica de filtração em membrana e visualização por Imunofluorescência Direta a partir de experimentos controle.

Tipo de hortaliça	Ensaio	Número de parasitos inoculados		Peso das amostras: hortaliças (g)	Vol. da solução de lavagem (mL)	Tempo de lavagem (s)	Volume da solução filtrada (mL)	Eficiência de recuperação (%)	
		<u>Oocisto</u>	<u>Cisto</u>					<u>oocisto</u>	<u>cisto</u>
A	A	42	100	100	400	60	80	45,23	2,00
L	B	155	47	50	150	30	150	14,51	10,63
F	C	200	62	100	400	30	80	3,33	5,37
A	D	3340	380	50	100	60	85	21,05	1,19
C	E	3288	510	50	100	60	100	2,31	29,35
E	F	3696	690	50	100	60	100	38,00	22,00
RÚ	G	3340	380	50	100	60	100	63,15	4,78
CU	H	3288	510	50	100	60	100	9,11	5,80
LA	I	3696	690	50	100	60	100	44,00	27,00

Tabela 8. Avaliação da contaminação de amostras de água de irrigação por oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos *Giardia* spp. pela técnica de filtração em membrana e visualização por Imunofluorescência Direta apartir de experimento controle.

Tipo de água de irrigação	Número de parasitos inoculados		Volume da água coletado (litro)	Volume da água inoculado (mL)	Tempo de permanência da água inoculada (h)	Volume da água filtrado (mL)	Eficiência de recuperação (%)	
	<u>Oocisto</u>	<u>Cisto</u>					<u>Oocisto</u>	<u>Cisto</u>
Tanque de irrigação	3696	690	10	2000	24	2000	6,08	23,68
Poço semi-artesiano	3696	690	10	2000	24	2000	15,0	25,83

Tabela 9. Avaliação da contaminação de amostras de água de irrigação por oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos *Giardia* spp. pela técnica de filtração em membrana e visualização por Imunofluorescência Direta e dos parâmetros químicos e físicos da água.

UPA - UNIDADE DE PRODUÇÃO AGRÍCOLA																	
1º Período de colheita																	
Parâmetros físicos e químicos	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	Média	Mediana
Temperatura °C	23	21	24	20	20	16	21	20	23	19	25	23	19	21	15	20.67	21.00
pH	6.82	7.10	5.80	6.45	6.00	6.60	6.78	7.30	6.79	5.80	6.03	6.67	5.92	6.80	6.73	-	6.67
Volume do nellet/uL	100	75	65	70	90	3	70	75	60	65	55	70	65	95	3	64.07	70.00
nº de parasitos recuperados	C	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	G	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2º Período de colheita																	
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	Média	Mediana
Temperatura °C	23	23	19	19	18	16	20	20	22	18	24	21	16	20	15	19.60	20.00
pH	6.78	6.98	5.84	7.07	5.75	6.8	6.45	7.09	6.74	5.79	7	6.4	5.81	6.76	6.71	-	6.74
Turbidez (NTU)	8.26	3.17	7.21	6.23	1	0.39	5.69	2.49	7.17	0.9	6.01	17	21.9	6.11	0.39	6.26	6.01
Cor (Units Pt-Co)	77	52	139	121	12	1	62	30	89	19	52	54	189	203	4	73.60	54.00
Cond Elét (uS/cm)	77	187	392	189	91	179	19	183	190	380	23	231	298	190	182	187.40	187.00
Volume do nellet/uL	105	100	95	105	95	4	105	100	95	90	125	95	115	95	4	88.53	95.00
nº de parasitos recuperados	C	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	G	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3º Período de colheita																	
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	Média	Mediana
Temperatura °C	23	21	21	20	19	16	20	20	23	18	25	22	18	21	15	20.13	20.00
pH	6.86	7	5.75	6.5	6.45	6.8	6.5	7.24	6.8	5.74	6.2	6.5	5.85	6.59	6.7	-	6.50
Turbidez (NTU)	8.5	3.5	7.3	6.5	1.22	0.37	6	2.5	7.19	1	6.02	19	22	6.15	0.39	6.51	6.02
Cor (Units Pt-Co)	70	54	142	124	12	0	63	30	92	20	52	56	190	205	0	74.00	56.00
Cond Elét (uS/cm)	78	193	402	189	92	175	19	184	191	385	24	234	300	190	183	189.27	189.00
Volume do nellet/uL	100	100	90	95	85	3	100	90	95	80	120	90	105	90	2	83.00	90.00
nº de parasitos recuperados	C	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	G	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4º Período de colheita																	
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	Média	Mediana
Temperatura °C	24	23	21	20	20	17	22	21	23	19	25	23	20	21	15	20.93	21.00
pH	7	7	5.79	6.53	6.4	6.8	6.8	7.05	6.67	5.76	7	7.1	6.8	6.78	6.73	-	6.80
Turbidez (NTU)	8.6	3.48	7.29	6.5	1.2	0.35	5.98	2.5	7	1	6.04	16	21	6.14	0.4	6.23	6.04
Cor (Units Pt-Co)	75	53	143	124	12	1	63	30	85	20	52	54	188	204	4	73.87	54.00
Cond Elét (uS/cm)	78	193	401	189	92	179	19	183	190	80	240	231	298	192	183	183.20	189.00
Volume do nellet/uL	105	100	95	100	90	4	105	95	90	80	110	100	110	90	3	85.13	95.00
nº de parasitos recuperados	C	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	G	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

C = *Cryptosporidium* spp. G = *Giardia* spp.

6. DISCUSSÃO

6.1. Produção agrícola do “cinturão verde” – Campinas (SP), com ênfase na horticultura.

Hoje, a horticultura regional campineira se destaca no cenário brasileiro, e é considerada a “alavanca” da economia rural. Nas propriedades agrícolas, localizadas em cidades da Região Metropolitana de Campinas (RMC) e, que compõem o “cinturão verde”, verifica-se uma diversidade de culturas vegetais e a concentração de um grande número de produtores em pequenas propriedades.

No Brasil, as novas regras do agronegócio fizeram com que a horticultura se expandisse, e hoje o setor de hortaliças e frutas tem uma produção estimada em R\$ 17 bilhões/ano, enquanto o setor de grãos registra uma produção estimada em R\$ 16 bilhões/ano (Ministério da Agricultura, 1999). Além disso, gera grande número de empregos devido à elevada exigência de mão-de-obra desde a semeadura até à comercialização (MELO e VILELA, 2007).

Cada hectare plantado gera em média quatro empregos diretos, e um número expressivo de empregos indiretos na comercialização das hortaliças. Este crescimento está ligado diretamente às novas exigências do mercado como: uma boa sanitização de todos os exemplares de plantas, inclusive cuidados higiênicos com instrumentos e equipamentos individuais (luvas, aventais e botas) por parte dos operadores, bem como, utilização de água de boa qualidade na irrigação e lavagem dos vegetais, além do controle bastante rigoroso das embalagens e armazenamento nos entrepostos e do transporte até a central de abastecimento.

A participação econômica relativa aos diversos setores componentes do negócio agroalimentar tem se alterado em uma busca constante de eficiência e competitividade (CATI- Coordenadoria de Assistência Técnica Integral). Desta forma, várias exigências têm sido propostas e seguidas para minimizar os efeitos maléficos dos danos físicos e biológicos aos vegetais.

Por outro lado, têm-se constatado mudanças significativas no perfil epidemiológico urbano-rural. Neste particular, os resultados obtidos nos inquéritos epidemiológicos demonstraram que as propriedades agrícolas, hoje, apresentam boas condições higiênico-sanitárias, com uma infra-estrutura de saneamento básico inicial adequada, assegurando melhor qualidade dos alimentos ofertados à população e contribuindo, decisivamente, para o controle de graves infecções por eles transmitidas. Além disso, merece destaque o fato de que não se observa, nestas propriedades, a presença de animais de criação comercial, por exemplo, bovinos que poderiam se constituir numa fonte notória de patógenos no estabelecimento de protozooses.

Os resultados obtidos neste estudo são coerentes considerando o atual perfil da agropecuária nos dias de hoje. Nesta linha de raciocínio, torna-se importante a determinação de metodologias mais sensíveis e apuradas para a detecção e monitoramento de patógenos emergentes que, igualmente evoluíram em sua capacidade de causar danos à saúde do homem, principalmente, os que podem estar presentes nos alimentos e com capacidade de propagação no meio ambiente, visando maior qualidade dos produtos frente a um mercado cada dia mais competitivo e exigente.

No meio rural do “cinturão de verde” de Campinas, as principais fontes de abastecimento de água são as nascentes e os poços artesianos, que dão vazão aos chamados “tanques de irrigação”. De acordo com comunicação pessoal da CEASA, Engenheiro

Agrônomo Antônio Egídio Crestana, Presidente do Sindicato Rural/CEASA, “a irrigação no caso de hortaliças é praticada com águas de nascentes, poços artesianos, tanques e pequenos afluentes, e nunca água dos rios da região, até porque há uma disputa acirrada dos municípios que fazem captação para consumo próprio da população “(lei da servidão)”, ou seja, todos os produtores devem respeitar e preservar o curso natural do corpo d’água ao usá-lo”.

Concluiu-se que, em mais da metade das bacias destes rios, a má qualidade da água inviabiliza a prática da irrigação de hortaliças. Segundo Calheiros et al. (2002), nestes rios a qualidade da água inicialmente é boa, porém, vai se deteriorando ao longo das bacias, atingindo a condição crítica na sub-bacia, como é o caso do Piracicaba, onde inclusive é proibida para irrigação na horticultura e só deve ser utilizada para culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras (CALHEIROS et al., 2002).

No caso dos horticultores que comercializam seus produtos na Ceasa, a vigilância é maior, pois, uma possível contaminação, tornaria seus produtos rejeitados pelos compradores intermediários.

Quanto à distribuição e comercialização das hortaliças, pelos produtores cadastrados na Ceasa/Campinas, e considerando as novas tendências e necessidades do mercado atual, ações de treinamento têm sido realizadas pela equipe do Centro de Qualidade em Horticultura (CQH) para produtores, atacadistas, compradores e gerentes de supermercados em geral. São enfatizadas questões sobre o manuseio pós-colheita, classificação dos produtos, uso de embalagens, e monitoramento da contaminação por patógenos, resíduos orgânicos, agrotóxicos e fertilizantes (www.ceasacampinas.com.br).

A utilização do adubo (“cama de frango”) de escolha dos produtores de hortaliças credenciados ao Ceasa/Campinas, (material a base de serragem, sabugo de milho triturado e

capins, associados ao esterco de aves, carcaças e penas trituradas) exige a realização de análises periódicas das águas de subsuperfícies empregadas na irrigação, assim como dos solos onde são aplicadas, pois sua qualidade é o principal indicativo das perdas, através do perfil de nutrientes, nitratos e organismos patogênicos (www.ceasacampinas.com.br). O uso deste tipo de adubo evita o contato das hortaliças com o estrume de bovinos, usualmente empregado na agricultura para fertilização das culturas. Também não foi observada em nenhuma das Unidades de Produção Agrícola selecionadas para esse estudo, a presença de bovinos, desta forma a possibilidade de contaminação oriunda da deposição de oocistos e cistos no solo eliminados pelas fezes destes animais está descartada.

Em suma, a ausência de protozoários patogênicos na quase totalidade das propriedades agrícolas durante o decorrer deste estudo, pode ser explicada pelos fatores citados anteriormente e pelas boas condições higienico-sanitárias encontradas nas UPAs (propriedades agrícolas). Estes resultados foram similares aos obtidos por Simões et al. (2001). Além disso, a CEASA participa e apóia eventos ou atividades relacionadas ao setor de produção e abastecimento de alimentos, assim como atividades voltadas para ações de educação sanitária.

6.2. Hortaliças: otimização de métodos para detecção de oocistos e cistos em vegetais folhosos.

O método padrão para a detecção de patógenos presentes em alimentos deve apresentar-se simples, reproduzível, rápido, confiável e de baixo custo. Muitos métodos publicados para o isolamento e a recuperação de estágios de transmissão dos protozoários parasitas em alimentos são, principalmente, modificações de técnicas que utilizam etapas e reagentes destinados às amostras hídricas (COOK et al., 2006a).

Simões et al. (2001) avaliando as condições higiênico-sanitárias de hortas no município de Campinas, examinaram 166 amostras de hortaliças, nas quais não foram encontrados oocistos e/ou cistos, entretanto, um grande número de nematóides foi observado, significativamente mais freqüente na estação chuvosa. Tais resultados são semelhantes aos obtidos neste estudo.

Vale ressaltar que cistos de *Giardia* spp. detectados em cinco propriedades agrícolas, estavam presentes apenas nas amostras de alface lisa e rúcula. Embora nesta investigação não tenha sido efetuada a comparação entre os diferentes tipos de vegetais, é possível que a estrutura física natural das hortaliças estudadas contribua para a ocorrência de diferenças nos percentuais de contaminação observados entre as duas variedades de alface (lisa/rugosa) e a rúcula. A alface lisa possui folhas largas, justapostas, e flexíveis (assim como a rúcula) podendo ocorrer contato com o solo durante o cultivo levando a um maior índice de contaminação, dependendo das condições de cultivo; já, a alface rugosa possui folhas largas e justapostas, porém, rígidas, promovendo ao vegetal uma forma fechada e firme que dificulta seu contato com o solo, diminuindo sua carga de contaminação (DA SILVA et al., 2005).

Os métodos utilizados para a detecção dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp., neste estudo, foram executados com base na eluição dos parasitos presentes nas alfaces e rúculas, utilizando-se Tween 80 (1%), a concentração dos patógenos pela centrifugação e a marcação dos oocistos/cistos com FITC-MAB/DAPI. O potencial de aperfeiçoamento para a eluição deve existir em particular para os cistos de *Giardia* spp., em razão da sua grande hidrofobicidade.

Poucas pesquisas tentaram métodos melhores para a desagregação dos oocistos (COOK et al., 2006a) e cistos dos alimentos examinados. Segundo Davies et al (2003), para

promover a dissociação destes protozoários parasitos, é efetivo o uso de surfactantes como o Tween 80, que diminui a hidrofobicidade das partículas, promovendo então a dispersão destas. Os autores sugerem que o uso de TSPP (Pirofosfato Tetrassódico Anidro), Tween 80 e MilliQ® (Millipore, Molsheim, France), deva resultar em melhores recuperações dos patógenos.

Cook et al. (2006a) ao analisarem diversas soluções de extração de protozoários em alface, obtiveram maior eficiência de recuperação (ao redor de 90% a 100%), quando empregada a solução de extração contendo lauril sulfato 1% e, glicina 1M, respectivamente, principalmente quando o pH da solução era de 5,5. Há evidências de que a agregação das formas de resistência dos protozoários *Giardia* e *Cryptosporidium* às outras partículas é pH-dependente, pois este modifica a natureza hidrofóbica e/ou eletrostática da superfície dos protozoários (DRODZ e SCHWARTZBROD, 1996). Ainda, o pH é um dos fatores a influenciar a estabilidade/afinidade das ligações entre anticorpos monoclonais e superfície dos protozoários (COOK et al., 2006a).

Outra questão importante está relacionada ao peso da amostra efetivamente processado, assim como, do tempo de agitação das hortaliças durante a lavagem. Os experimentos controle demonstraram uma melhor eficiência de recuperação dos oocistos/cistos quando foi utilizada uma menor quantidade (peso) das hortaliças e o tempo de 60 segundos para o procedimento de lavagem, este resultado é concordante com Robertson & Gjerde (2001b) que, durante a comparação do tamanho de amostras, indicaram que o uso de uma amostra menor aumentava a eficiência de recuperação, e os fatores que possivelmente influenciaram incluíam uma redução dos resíduos interferentes, provenientes da amostra e da utilização de uma menor quantidade de solução de eluição, desta forma, diminuindo o potencial das perdas durante a manipulação dos vegetais.

Embora a redução do peso das amostras possa melhorar a eficiência de recuperação, deve-se tomar cuidado para que o tamanho da amostra seja suficiente para a detecção dos baixos níveis de contaminação.

Cook et al. (2006a) utilizaram 30g, que consideraram ideal para a padronização e validação de métodos de detecção de oocistos em alface e framboesas, por representar uma porção de vegetal que o ser humano ingere por dia. No entanto, este estudo foi realizado numa situação anterior às pesquisas de padronização e validação da metodologia proposta por esses autores.

Uma questão que precisa ser ressaltada é o fato dos cistos de *Giardia* spp. apresentarem uma característica altamente hidrofóbica o que dificulta a sua recuperação a partir dos vegetais, tornando-se extremamente difícil a sua recuperação no meio líquido (DAI et al., 2004), conseqüentemente na água de lavagem (solução de eluição) dos vegetais.

A baixa taxa de recuperação de cistos de *Giardia* (29,35%) pode estar relacionada com o seu tamanho e/ou às diferenças morfológicas na sua superfície, permitindo que eles fiquem enredados na membrana de filtração, ou seja, capturados junto com os resíduos e sujidades durante o processo de lavagem contribuindo para uma baixa recuperação (ROBERTSON e GJERDE, 2001b).

Com relação ao volume da solução de lavagem dos vegetais tem sido proposta a diminuição do volume, minimizando as perdas dos protozoários durante os processos de centrifugação (ROBERTSON e GJERDE, 2001b). Cook et al. (2006a) em seus estudos visando a padronização de um método de detecção de oocistos de *Cryptosporidium* em alface, utilizaram um volume de 200ml de extractante para testar a pulsificação, método alternativo de homogeneização de amostras de alface. Os autores demonstraram, em função

da desagregação dos parasitos das folhas de alface, que a pulsificação e a homogeneização produziram melhores resultados de recuperação comparativamente à agitação orbital e/ou rolling.

Uma das dificuldades relacionadas à detecção dos protozoários patogênicos em amostras de alface, foi a utilização de duas membranas para filtrar 100mL da água de lavagem dos vegetais (solução de eluição). Durante a filtração a grande quantidade de detritos e sujidades causou um impedimento parcial ou total da passagem da solução de eluição através das membranas causando grande impacto, e geralmente a necessidade efetiva do uso de duas membranas para a filtração completa do eluente.

Neste estudo, nos ensaios controle das hortaliças com oocistos/cistos, a maior eficiência de recuperação foi obtida quando se utilizou um volume de 100ml da solução de eluição, volume este que permitiu uma melhor recuperação dos parasitos, possivelmente em função do tipo de extração mecânica dos protozoários, realizada em um tipo de membrana menor que os filtros empregados por Cook et al. (2006a).

Nos experimentos de contaminação artificial, este estudo apresentou uma eficiência de recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. de até 63,15% obtida para alimentos; este resultado mostra-se bastante significativo quando comparado ao método padronizado por Cook et al.(2006b) para oocistos com eficiências de recuperação de 59,0% nos ensaios intra-laboratório e, nos testes colaborativos, o método proposto foi de 44,3%.

Além disso, estes protocolos acarretaram maior recuperação de *Cryptosporidium* spp. em relação a *Giardia* spp., certamente em função dos cistos apresentarem uma maior hidrofobicidade, e com isso uma maior adesão ao vegetal, em relação ao *Cryptosporidium* spp. Também se evidenciou melhores resultados quando comparados aos métodos convencionais, tais como centrífugo-flutuação em sulfato de zinco.

Muitos estudos visando a detecção de parasitos foram realizados empregando-se o método de centrífugo-flutuação em sulfato de zinco ou de Faust havendo positividade (TAKAYANAGUI et al., 2000; COELHO et al., 2001); porém, nesta investigação o mesmo não foi observado. A utilização da metodologia de Faust não detectou a presença dos parasitos em quaisquer das amostras de hortaliças.

Nesta pesquisa apesar do pequeno número de amostras positivas, o método de filtração em membrana simultâneo a imunofluorescência direta foi mais eficiente quanto à detecção de cistos de *Giardia* spp. comparativamente ao método de Faust; o uso de microscopia de imunofluorescência e de anticorpos monoclonais conferiu maior sensibilidade à metodologia. Devido ao pequeno número de amostras positivas, não foi possível a realização de análise estatística.

O encontro de uma menor porcentagem de cistos de *Giardia* spp. poderia ser explicado pelo efeito das propriedades de adesão do parasito às superficiais sólidas, considerando que a agregação dos cistos/oocistos é um fator importante para a otimização dos processos de remoção da metodologia proposta.

Segundo Dai & Boll et al. (2004), a hidrofobicidade e a carga superficial desempenham ambas, papel relevante na adesão da *Giardia* spp. às superfícies sólidas, porém, a hidrofobicidade é mais influente que a carga superficial no caso dos cistos. Esses pesquisadores atribuíram a considerável perda de cistos em seus ensaios, ao fato da *Giardia* spp apresentar um comportamento hidrofóbico mais forte que o *Cryptosporidium* spp.

Contudo, a diferença nas eficiências de recuperação entre os parasitos pode também estar relacionada com o tamanho (cistos são maiores que oocistos) simultaneamente às diferenças morfológicas na sua superfície, permitindo que eles fiquem enredados na membrana de filtração, ou seja, capturados junto com os resíduos durante o processo de

lavagem contribuindo para uma baixa recuperação (ROBERTSON e GJERDE, 2001b). Além disso, uma outra diferença morfológica entre oocistos e cistos reside no formato destes o qual poderia estar associada às variações nas taxas de recuperação dos parasitos. Dai et al (2004) sugerem que os cistos de *Giardia* spp. possuem um raio maior, diferentemente dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. que são quase esféricos. A *Giardia* spp. por possuir raio maior, forma uma associação mais forte que os organismos portadores de um raio menor.

Com vistas à otimização futura do método utilizado neste estudo para a recuperação dos oocistos/cistos propõe-se a realização de uma agitação (homogeneização) constante das amostras em contato com a solução de eluição, com a finalidade de desagregar os parasitos, o que talvez pudesse facilitar uma recuperação mais efetiva dos cistos de *Giardia*.

Nas amostras de alimentos as diferenças nas eficiências de recuperação dos oocistos/cistos pode ser produzida pela composição da amostra e pelo tipo de solução empregada para o isolamento dos parasitos (SMITH & ROSE, 1990). Tais características justificam a facilidade de aderência dos oocistos e cistos, e alertam para o tempo que estes protozoários parasitas permanecem em contato com as partículas na amostra (THOMAS et al., 2001; HSU & HUANG 2002; BUTKUS et al., 2003; DAÍ & BOLL, 2003; DAÍ et al., 2004; DAVIES et al., 2005; SEARCY et al., 2005).

Nesse estudo, para a investigação quantitativa dos oocistos e cistos, foi utilizada durante os procedimentos, uma solução hidrofílica para a lavagem e extração mecânica dos parasitos, o que possivelmente tenha influenciado na adesão dos cistos às superfícies, impedindo assim uma porcentagem maior de recuperação.

Cook et al (2006a) desenvolveram um método para isolamento dos oocistos de *Cryptosporidium parvum* presentes em alface e framboesas, com base na eluição,

empregando a homogeneização (durante 1 minuto) com 200mL de solução contendo Glicina 1M pH 5,5, seguida da separação imunomagnética (IMS) e marcação dos oocistos com anticorpos monoclonais anti-*Cryptosporidium*. Os ensaios controle com a adição de oocistos em alfaces produziram eficiências de recuperação de 59 %. No entanto, o Tween 80 não figura entre os surfactantes empregados por Cook et al. (2006a), nas etapas de dissociação dos parasitos das amostras de alface.

Neste estudo, utilizou-se a homogeneização com 100mL de uma solução de eluição contendo Tween 80 (1 %), os resultados dos ensaios controle (Tabela 7) produziram uma grande variação nas taxas de recuperação dos protozoários entre 3,33 % a 63,15 % e 1,19 % a 29,35 % para oocistos e cistos, respectivamente. A eficiência de recuperação obtida com a metodologia empregada nos nove experimentos controle foi maior com oocistos de *Cryptosporidium* quando comparado com cistos de *Giardia*. Mesmo quando foi inoculado um baixo número de oocistos (42) houve uma alta taxa de recuperação de *Cryptosporidium* (45,23%), pressupondo que a metodologia pode ser eficiente mesmo quando o parasito está presente em pequenas concentrações nas amostras de alimentos. Deve-se ressaltar que a notável variação nas taxas de recuperação dos parasitos possivelmente ocorra devido às características inerentes às amostras ambientais provenientes de vegetais (detritos, sujidades, viscosidades), esta questão foi amenizada por Cook et al. (2006a) com o emprego da etapa de dissociação com separação imunomagnética (IMS).

A detecção de cistos de *Giardia* spp. em cinco das quinze propriedades agrícolas selecionadas para este estudo ocorreu nos períodos de maior intensidade de chuvas, este fato associado a algumas características higiênico-sanitárias pode ter contribuído para a disseminação de cistos nestas propriedades.

Alguns resultados obtidos no presente estudo, levam a considerar alguns aspectos observados nas Unidades de Produção Agrícola – UPAs, nas quais foi detectada a presença dos cistos de *Giardia* spp., como fatores de risco à saúde dos seres humanos que a utilizam, tais como: ausência de instalações sanitárias para uso de trabalhadores temporários nas UPAs de números II, III e IX ou a presença de lixão a céu aberto na UPA de número I. A situação mais crítica foi observada na UPA de nº IX onde não havia casa de moradia ou moradores, portanto sem a presença de instalações sanitárias o que levava os trabalhadores a realizarem suas necessidades fisiológicas a céu aberto, além da inexistência de água potável para uso dos trabalhadores, sendo que a água utilizada para consumo próprio dos mesmos se encontrava armazenada em uma caixa de amianto sem cobertura, soma-se a essa situação o fato da presença do lixo oriundo de embalagens de produtos químicos descartadas também a céu aberto.

A inexistência de alguns fatores de proteção que são preconizados como de grande importância para a preservação da saúde, em quatro das cinco propriedades envolvidas nesse estudo nas quais os cistos de *Giardia* spp. foram detectados, sugere que este tipo de investigação é relevante, contribuindo para o controle de doenças como a giardiose.

Embora tenha sido baixa a prevalência de cistos nas amostras investigadas “*in natura*” (6,6 % e 1,6 % das amostras de alface e rúcula respectivamente) o número de cistos detectados em 50g de amostras de alface (que variou de 180 a 230/50g.) é muito expressivo e as chances da ocorrência de infecções é enorme ao considerarmos que a dose infectante deste protozoário patogênico é baixa, ao redor de 10 cistos. Em suma, esta questão representa grandes riscos em Saúde Pública associados com a transmissão de *Giardia* spp., particularmente quando se encontra associada aos alimentos frequentemente ingeridos crus.

6.3. Presença de fitonematóides nas Unidades de Produção Agrícola – UPAs.

Foi detectada a presença de grande quantidade de fitonematóides nos exemplares de hortaliças especialmente no primeiro período de colheita das amostras, correspondente a altos índices de umidade relativa, e em menor quantidade no período caracterizado como sendo de estiagem. Excepcionalmente, por ocasião do quarto período de colheitas, ocorreram chuvas intensas, que levaram a um atraso do início das análises para que não fosse descaracterizado o período de estiagem, nesse período foi observada grande quantidade de exemplares de fitonematóides (Tabelas 2 a 5).

Fato este que corrobora com as variações sazonais associadas a estes fitonematóides e observadas por Simões et al.(2001). Estes pesquisadores afirmam que os ovos de helmintos podem permanecer viáveis por períodos mais longos em ambientes úmidos. Estas observações são consistentes com os resultados obtidos neste estudo, em que a chuva foi associada à sobrevivência dos parasitos nos vegetais.

Considerou-se que as larvas de nematódeos são encontradas comumente no solo, existindo assim na forma de vida livre, e não necessariamente indicam contaminação fecal (SIMÕES et al., 2001), visto que as larvas encontradas foram analisadas, e identificadas como pertencentes à família *Pratylenchidae* que se desenvolvem bem em temperaturas que variam de 24°C a 28°C, quando completam o seu ciclo vital em um período de aproximadamente quatro semanas, com a temperatura do solo em torno de 28°C. Estes nematóides possuem a forma filiforme em todos os estágios do ciclo de vida, e depositam seus ovos em número variável de acordo com as condições ambientais, em lesões incitadas nos tecidos vegetais.

Segundo Charchar (1999) o plantio contínuo de espécies suscetíveis de hortaliças , no decorrer de todo o ano, resulta na multiplicação rápida destes nematóides, que são

disseminados principalmente pela água de irrigação contaminada, sementes e materiais propagativos infectados tais como: máquinas e implementos agrícolas e ventos fortes. Este fato é concordante com a situação observada nas UPAs investigadas, onde os produtores cultivam suas hortaliças durante todo o ano.

Os nematóides causam sérios problemas na produtividade de hortaliças em diversas regiões do mundo. No Brasil, as perdas anuais variam de acordo com o manejo adotado pelo produtor (ZAMBOLIM et al., 2000). O grau de danos depende da susceptibilidade da cultura, das condições ambientais, da presença de outros patógenos, que podem interagir com os nematóides, e da densidade populacional desses patógenos. Essa densidade populacional pode variar durante todo o ano nos climas tropicais, em face das variações de temperatura e da umidade do solo, podendo até no período frio ou de seca ocorrer a dormência dos mesmos (LORDELLO, 1964).

As concentrações de fitonematóides detectadas em alface e rúcula foram variáveis nos quatro períodos dessa pesquisa (Tabela 2 a 5). As amostras de alface foram mais frequentemente contaminadas que as rúculas. Esta diferença poderia estar relacionada ao fato que as alfaces possuem uma folhagem mais densa que oferece uma superfície maior para a contaminação, e também protegeria os ovos e larvas contra os fatores hostis do meio ambiente.

Os problemas causados por nematóides em hortaliças são intensificados no Brasil pela existência de grandes áreas de cultivo, pela carência de cultivares resistentes, pela falta de pessoal treinado em técnicas nematológicas para orientação e utilização de práticas adequadas de manejo e controle, e por falta de legislação enérgica de quarentena para prevenir a introdução e disseminação de fitonematóides por meio de sementes e de outros materiais de propagação vegetativa (CHARCHAR, 1999).

Em suma, as hortaliças, quando cultivadas na mesma área sem que medidas de controle sejam utilizadas, são severamente afetadas por fitonematóides e muitas vezes não sobrevivem ao intenso ataque destes fitoparasitas resultando em até 100 % de perdas (CHARCHAR, 1999).

6.4. Água de irrigação.

Os parâmetros físico-químicos observados com relação à água de irrigação foram: temperatura, pH, condutividade elétrica, turbidez e a cor, sendo os três últimos avaliados a partir do segundo período de colheitas (Tabela 9).

A temperatura é um fator determinante no direcionamento das reações que afetam os processos químicos, físicos e biológicos, exercendo, assim, uma enorme influência na atividade biológica e no crescimento de organismos aquáticos. De certo modo, um aumento na temperatura dos corpos d'água acarreta aumento da atividade biológica dos organismos vivos. Conforme as variações da temperatura se distanciam de seu grau de preferência, o número de indivíduos das várias espécies diminui por migração ou até mesmo por morte (HERMES e SILVA 2004).

Nas análises da água de irrigação prevaleceram temperaturas entre 20°C a 25°C observadas nos tanques de irrigação de treze das propriedades, sendo que em duas delas, a temperatura foi inferior, observadas entre 15°C a 16°C, possivelmente por serem poços artesianos. Altas temperaturas também diminuem a quantidade de oxigênio na água, o que pode provocar situações de risco caso as águas recebam descargas de dejetos orgânicos, contribuindo para a eutrofização do corpo hídrico.

O potencial hidrogeniônico, ou pH representa a concentração de íons hidrogênio H⁺, dando uma indicação sobre as condições de acidez, neutralidade e alcalinidade da água.

Suas origens naturais são as dissoluções de rochas, absorção de gases da atmosfera, oxidação da matéria orgânica e da fotossíntese. A faixa de pH considerada ideal para a água de irrigação está entre 6,5 a 8,5, sendo que lagos ou reservatórios de água podem mostrar uma variação mais ampla de pH, dependendo das condições ambientais do local (PELCZAR, 1996).

Os valores de pH anotados para água de irrigação das UPAs, foram concordantes com a faixa de pH ideal, sugerida por Pelczar (1996), para muitos organismos aquáticos, mas não ideal para a sobrevivência de protozoários. Oocistos e cistos, que possuem cargas negativas sob condições ambientais (DROZD e SCHWARTZBROD, 1996), apresentam cargas superficiais dependentes do pH, com os potenciais zeta se tornando menos negativos à medida que o pH é reduzido (ácido).

A adsorção de oocistos e cistos das sujidades e partículas é determinada pelas características da carga superficial e hidrofóbica de cada um deles, e influenciada pelas forças iônicas e o pH do meio de suspensão. Visto que, em muitos ambientes “*in natura*”, muitas partículas têm carga negativa, o grau de repulsão eletrostática é determinado pela resistência iônica do meio. Aumentando-se esta resistência iônica ocorrerá um decréscimo na repulsão eletrostática, bem como um aumento da hidrofobicidade dos oocistos e cistos, portanto, promovendo a agregação dos parasitos aos materiais particulados.

O conhecimento sobre as variações da carga superficial dos oocistos e cistos com relação às variações do pH em diferentes meios, são de grande importância, pois em alguns casos a adsorção das partículas pode ser invertida simplesmente com a modificação do pH, significando que a carga poderia ser totalmente invertida. Na verdade, o pH correspondente à adsorção favorável depende do ponto isoelétrico da célula microbiana e do material adsorvente, ou seja, as interações entre as células e as partículas adsorventes (suspensas em

um líquido), dependem não apenas do pH, mas também da resistência iônica do meio envolvente (DROZD & SCHWARTZBROD, 1996).

A capacidade da água de conduzir uma corrente elétrica, ou a condutividade elétrica, depende da concentração dos íons presentes na solução: cátions e ânions, mas depende também da temperatura e, por isso, estas medidas devem estar sempre associadas. Cada corpo d'água tende a ter um grau relativamente constante de condutividade que, uma vez estabelecido, pode ser usado para comparação com medidas regulares do mesmo ponto de condutividade (HERMES e SILVA, 2004). Mudanças significativas podem ser indicadores de que processos de poluição estão ocorrendo com a descarga de material na água.

Sabe-se que a condutividade elétrica, k , é a medida da capacidade de uma solução aquosa conduzir correntes elétricas. Isso depende da presença de íons, suas concentrações, mobilidade e valência, bem como da temperatura durante sua análise. Soluções com altas concentrações de compostos orgânicos que não se dissociam em soluções aquosas são bem inferiores na condução de correntes elétricas (EATON et al., 1998). Como citado anteriormente a presença de íons em meio líquido é um dos principais fatores que afetam o metabolismo microbiano.

Os valores da condutividade obtidos para as águas das UPAs, mostraram-se constantes durante os três períodos em que foram avaliados, sendo que em duas delas os valores foram bastante altos. Altos índices de condutividade são ocasionados por fontes não-pontuais, no meio rural, ocasionado efetivamente pela água de drenagem de sistemas de irrigação e escoamento superficial de áreas agrícolas, principalmente em regiões áridas e semi-áridas, onde a evapotranspiração excessiva causa o acúmulo de sais (HERMES e SILVA, 2004).

Sabe-se que quanto maior a quantidade de material em suspensão na água, mais turva ela estará, caracterizando também, mudanças na sua cor. As maiores fontes causadoras da turbidez são argila, areia, resíduos orgânicos, material mineral, detritos e plânctons. Por outro lado, o ferro segundo metal mais abundante na crosta terrestre, é comumente encontrado na água subterrânea e superficial. A presença de ferro na água de irrigação e conseqüentemente nos vegetais, pode também ser proveniente da dissolução deste elemento a partir das tubulações utilizadas nos sistemas de irrigação localizada, ou no caso de poços artesianos, do próprio solo, afetando características importantes dos oocistos e cistos como a agregação. Segundo Yakub & Stadterman-Knauer (2000) os oocistos de *Cryptosporidium* spp. são dez vezes mais sensíveis ao ferro que os cistos de *Giardia* pp.

A água de irrigação apresentou-se significativamente turva na maioria das UPAs. Uma questão importante foi o encontro de grande quantidade de algas na superfície dos tanques de irrigação das UPAS, não permitindo que a luz penetrasse nas camadas superiores da água.

Neste estudo, a alta turbidez, partículas suspensas encontradas na água, levou ao uso de um número maior de membranas durante os procedimentos de filtração da água de irrigação. Tal situação influenciou no número de membranas utilizadas, sendo que na maioria das análises foi necessário em média quatro membranas para a efetiva filtração do volume de água proposto para o estudo.

Esta questão é relevante em se tratando da metodologia empregada para a detecção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., cujos oocistos e cistos são encontrados em pequenos números no ambiente, isso pode determinar uma redução na detecção e recuperação destes patógenos frente à turbidez e presença de algas ou cianobactérias,

levando a possíveis perdas dos parasitos ocorridas em função de um número maior de etapas para a efetiva filtração da água de irrigação.

O método de filtração em membranas (FRANCO et al., 2001b) empregado neste estudo tem sido amplamente utilizado para detecção de protozoários patogênicos em diferentes tipos de amostras ambientais como: águas superficiais (FRANCO et al., 2001a), água mineral (FRANCO & CANTUSIO NETO, 2002) e efluente de esgoto (CANTUSIO NETO et al., 2006),

Em amostras de água, a adoção da etapa de imunofluorescência direta acarretou um incremento na eficiência de recuperação de oocistos/cistos (ao redor de doze vezes) quando comparada aos métodos parasitológicos convencionais (centrífugo-concentração de grandes volumes de água, seguido de purificação em solução saturada de sais e visualização com adição de lugol) (SANTOS, 2007).

A eficiência de recuperação obtida com a metodologia empregada nos experimentos controle para a água de irrigação foi maior em relação aos cistos de *Giardia* spp. quando comparado aos oocistos de *Cryptosporidium* spp (Tabela 8).

Segundo Fricker & Crabb (1998) a efetividade dos métodos publicados para a detecção dos estágios de transmissão dos parasitos em águas superficiais, exibem acentuada variabilidade.

Em relação à água utilizada na irrigação, poucos dados foram obtidos sobre esta questão e, estes reportam que os métodos empregados ainda estão sujeitos a baixos índices de recuperação (ROSEN et al., 2000).

Em suma, é possível que a contaminação das hortaliças por cistos de *Giardia* spp. seja proveniente da manipulação após colheita, já que cistos não foram encontrados na água empregada na irrigação.

Novas tecnologias de prevenção serão cruciais para a segurança alimentar no futuro. Os tratamentos que hoje são empregados no processamento e distribuição dos alimentos, o destino seguro dos dejetos de animais usados na agricultura, assim como o monitoramento da água utilizada na irrigação deverão ser redefinidos e padronizados.

Os esforços internacionais de colaboração e cooperação entre os países serão cruciais para os novos desafios a serem enfrentados nos dias de hoje, e isto significa que a vigilância epidemiológica voltada à saúde pública, à investigação cuidadosa dos novos problemas emergentes, à atenção voltada para a segurança alimentar da fazenda a mesa do consumidor, e as parcerias para a produção de novas medidas de controle serão necessários para um futuro próximo (TAUXE, 2002).

7. CONCLUSÕES

1. Apenas em 4 propriedades rurais analisadas foram encontrados fatores de risco para contaminação de protozoários patogênicos.
2. Das 120 amostras de hortaliças analisadas, apenas 4,1% foram positivas para cistos de *Giardia* spp., em cinco das 15 propriedades investigadas.
3. Do total de 60 amostras de alface analisadas, 6,6 % (4 amostras) continham cistos de *Giardia* spp., cuja densidade de parasitos variou de 180 a 230cistos/50g de alface, e nenhuma amostra positiva para oocistos de *Cryptosporidium* spp.
4. Do total de 60 amostras de rúcula analisadas, 1,6 % (1 amostra) continham cistos de *Giardia* spp., cuja densidade de parasitos foi de 180cistos/50g de rúcula, e e nenhuma amostra positiva para oocistos de *Cryptosporidium* spp.
5. Cistos de outros protozoários intestinais não foram detectados nas amostras de hortaliças analisadas por quaisquer dos métodos empregados (filtração em membrana mais reação de imunofluorescência direta e Faust).
6. A eficiência média de recuperação de cistos de *Giardia* spp. em alface, pelo método de filtração em membranas, com eluição empregando solução de Tween 80 a 0,01 %, seguida de reação de reação de imunofluorescência direta, nos experimentos controles foi de 11,7%,

variando de 1,1 % a 29,3 %, em relação aos cistos de *Giardia* spp. e para oocistos de *Cryptosporidium* spp. foi de 20,7 %, variando de 2,3 % a 45,2 %.

7. A eficiência média de recuperação de cistos de *Giardia* spp. em rúcula, pelo método de filtração em membranas, com eluição empregando solução de Tween 80 a 0,01 %, seguida de reação de reação de imunofluorescência direta, nos experimentos controles foi de 12,5 %, variando de 4,7 % a 27,0 %, em relação aos cistos de *Giardia* spp. e para oocistos de *Cryptosporidium* spp. foi de 38,7 %, variando de 9,1 % a 63,1 %.

8. O método de filtração em membrana e reação imunofluorescência direta mostrou-se superior à técnica de Faust para a detecção de cistos de *Giardia* spp. em amostras de alface e rúcula.

9. Quando utilizada a técnica de Faust nenhuma das amostras de hortaliças foi positiva para protozoários. Porém, ovos (68 %) e larvas (46 %) de fitonematóides foram observados. Do total de 15 propriedades investigadas durante os 4 períodos, 83 % (12,5) continham ovos e 55 % (8,25) continham larvas de fitonematóides.

10. Do total de 15 propriedades investigadas durante os 4 períodos 83 % (12,5) continham ovos e 55 % (8,25) continham larvas de fitonematóides.

11. Do total de 120 hortaliças analisadas durante esse estudo 68 % (82) das amostras continham ovos, e 46 % (56) das amostras continham larvas. Em 60 amostras de alface analisadas 70 % (42) amostras continham ovos e 48 % (29) das amostras continham larvas

de fitonematóides. Em 60 amostras de rúcula analisadas 66 % (40) amostras continham ovos e 45 % (27) amostras continham larvas de fitonematóides.

12. Os resultados da análise da água de irrigação não revelam a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em todas as amostras.

13. O método de filtração em membrana e reação imunofluorescência direta na avaliação da água de irrigação nos experimentos controle, demonstrou maior recuperação de cistos de *Giardia* spp. em relação aos oocistos de *Cryptosporidium* spp.

14. O método de filtração em membrana empregado durante a avaliação da água de irrigação nos experimentos controles, demonstrou maior recuperação de cistos de *Giardia* spp. em relação aos oocistos de *Cryptosporidium* spp., e foi variável de 23,68% e 6,08% para a água armazenada em tanques de irrigação e 25,83 e 15,0% da água oriunda dos poços semi-artesianos, para cistos e oocistos respectivamente.

15. As boas condições higiênico-sanitárias encontradas nas propriedades rurais analisadas contribuíram para a baixa positividade encontrada para os cistos de *Giardia* spp. e para a negatividade dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. em relação às amostras de hortaliças e da água de irrigação.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCARINI, J.H.; MAZOCATO, M.A.; COSTA, O.G.P; LUENGO, R.F.A.. Hortigranjeiros - crescimento exponencial: o setor cresce a taxas elevadas no Brasil. **Agroanalysis**, Rio de Janeiro, v.19, n.12, p.26-34, 2000a.

ADAM, R.D.. The biology of *Giardia* spp. **Rev. Microbial.** v.55, p.706-732, 1991.

AL SALEM, S.S. & TARAZI, H.M.. Wastewater reuse and helminth infestation in Jordan: a case study. Regional Wastewater Treatment and Reuse **Workshop**, February, CEHA6, WHO6, Amman, 1992.

AMENT, M.E. & RUBIN, C.E.. Relation of giardiasis to abnormal intestinal structure and function in gastrointestinal immunodeficiency syndromes. **Gastroenterology**. v.62, p.216-226, 1972.

ANTONIALI, S.. Resfriamento rápido com ar forçado para conservação pós-colheita de alface. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual de Campinas, p.98, 2000.

AQUINO, D.B.; GANDER, R.. *Cyclospora cayetanensis* e surtos de diarreia em seres humanos veiculados por alimentos., 2000. Disponível em: <http://www.microbelibrary.org/images/aquino/htmlpages/caycyst-Portuguese.htm>.

ARROWOOD, M.. In vitro cultivation of *Cryptosporidium* species. **Clin. Microbiol. Rev.** Julho, p.390-400, 2002.

BARBIERI, D.; DEBRITO, T.; HOSHIMO, T.; NASCIMENTO, S.; MARTINS-CAMPOS, F.O.B.; QUARENTEI, G.; MARCONDES, E.. Giardiasis in childhood. Absorption tests and biochemistry, histochemistry, light and electronmicroscopy of jejunal mucosa. **Arch. Dis. Child.** v.45, p.466-472, 1970.

BERGAMASCO, S.M.P.P.; BLANC-PAMARD, C.; CHONCHOL, M.E.. Por um atlas dos assentamentos brasileiros: espaços de pesquisa. Rio de Janeiro: **DL/Brasil**, 1997.

BERN, C.; ORTEGA, Y.; CHECKLEY, W.; ROBERTS, M.; LESCANO, A. G.; CABRERA, L.; VERASTEGUI, M.; BLACK, R.E.; STERLING, C.; GILMAN, R.H.. Epidemiologic Differences Between Cyclosporiasis and Cryptosporidiasis in Peruvian Children. **Emerg. Infect. Dis.**, v.8, n.6, p.581-585, 2002.

BINGHAM, A.K. & MEYER, E.A.. *Giardia* excystation can be induced *in vitro* in acidic solutions. **Nature**. v.277, p.301-302, 1979.

BLANS, M.C.A.; RIDWAN, B.U.; VERWEIJ, J.J.; ROSEMBERG-ARSKA, M.; VERHOEF, J.. Cyclosporiasis outbreak Indonesia. **Emerg. Infect. Dis.** v.11, n.9, p.1453-1455, 2005.

BLISKA JR., A.. Alfaca (*Lactuca sativa* L.): distintos sistemas de produção, conservação e avaliação pós-colheita. **Dissertação de Mestrado**. p.64, 1998.

BOTERO, J.H.;CASTAÑO, A.; MONTOYA, M.N.; OCAMPO, N.E.; HURTADO, M.I.; LOPERA, M.M.. A preliminary study of the prevalence of intestinal parasites in imunocompromised patients with and without gastrointestinal manifestations. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**. v.45, n.4, p.197-200, 2003.

BOUHOUM, K. & SCHWARTZBROD, J.. Epidemiological study of intestinal helminthiasis in a Marrakech new sewage spreading zone. **Z. Hyg. Umwelt.** p.200-253, 1997.

BRADFORD, S.A. & SCHIJVEN, J.. Release of *Cryptosporidium* and *Giardia* from dairy calf manure: impact of solution salinity. **Environ. Sci. Technol.** v.36, p.3916-3923, 2002.

BRADY E.M.; MARGOLIS, M.L.; KORZENIOWSKI, O.M.. Pulmonary cryptosporidiosis in acquired immune deficiency syndrome. **J. Amer. Assoc.** v.252, p.89-90, 1984.

BRANCO, N.. Avaliação da Presença de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em Águas Minerais Naturais de Nascentes e Enteroparasitoses em duas Comunidades Rurais da Cidade de Campos do Jordão, S P, Brasil, Universidade Estadual de Campinas, 2006.

BROOKES, J.D.; ANTENUCCI, J.; HIPSEY, M.; BURCH, M.D.; ASHBOLT, J.; FERGUSON, C.. Fate and transport of pathogens in lakes and reservoirs. **Environ. Int.** v.30, p.741-759, 2004.

BRUSH, C.F.; WALTER, M.F. ANGUISH, L.J.; GHIORSE, W.C.. Influence of pretreatment and experimental conditions on electrophoretic mobility and hydrophobicity of *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Appl. Environ. Microbiol.** v.64, p.4439-4445, 1998.

BUCHEL, L.A.; GORENFLOT, A.; SAVEL,C.; GOBERT, J.G.. In vitro excystation of *Giardia* from humans: A scanning electron microscopy study. **J. Parasitol.** v.73, p.487-493, 1987.

BUKHARI, Z. & SMITH, H.V.. Effect of three concentration techniques on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts recovered from bovine feces. **J. Clin. Microbiol.** v.33, p.2592-2595, 1995.

BUKHARI, Z.; SMITH, H.V.; SKYES, N.; HUMPHREYS, S. W.; PATON, C.A.; GIRDWOOD, R.W.A.; FRICKER, C.R.. Ocorrence of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia* spp. cysts in sewage influents and effluents from plants in England. **Water Sci. Tec.** v.35, n.11-12, p.385-390, 1997.

BURET, A.; GALL, D.G.; OLSON, M.E.. Effects of murine giardiasis on growth, intestinal morphology, and disaccharidase activity. **J. Parasitol.** v.76, p.403-409, 1990.

BUTKUS, M.A.; BAYS J.T.; LABARE, M.P.. Influence of Surface Characteristics on the Stability of *Cryptosporidium parvum* Oocysts. **Appl. Environ. Microbiol.**v.69, n.7, p.3819-3825, 2003.

C.. Understanding the fate of *Cryptosporidium* and *Giardia* in storage reservoirs: a legacy of Sydney's water contamination incident. **Aqua (Oxford)**. v.49, n.6, p.289-306, 2000.

CACCIÒ, S.M.; THOMPSON, A.C.; McLAUHLIN, J.; SMITH, H.V.. Unraveling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. **Trends in Parasitology**. V.21, n.9, p.430-437, 2005.

CALBO, C.A.. Alface. Disponível em: <http://www.enph.embrapa.br>, 1999.

CALHEIROS, R.O.; ARRUDA, F.B. SAKAI, E. *et al.*. Estudo da irrigação nas bacias do Piracicaba, Capivari e Jundiaí, 5ª Unidade de Gerenciamento dos Recursos Hídricos – UGRHI 5.. **XXXI Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola – COBEA 2002**.

CAMPANHOLA, C..Avanços na pesquisa agropecuária brasileira. **Rev. USP**. n.64, p.68-75, 2004-2005.

CAMPBELL, A.T. & WALLIS, P.. The effect of UV irradiation on human-derived *Giardia lamblia* cysts. **Water Res.** v.36, p.963-969, 2002.

CAMPBELL, A.T.; ROBERTSON, L.J.; SMITH, HV. Viabilidade of *Cryptosporidium parvum* oocysts: correlation of in vitro excystation with inclusion or exclusion of fluorogenic vital dyes. **Appl. Environ. Microbiol.** 58:3488-3493, 1992.

CAMPBELL, I.; TZIPORI, S.; HUTCHISON, G.E.; ANGUS, K.W.. Effect of disinfectants on survival of *Cryptosporidium* oocysts. **Vet. Rec.** 3: p.414-5, 1982.

CANTUSIO NETO, R.; SANTOS, J.U.; FRANCO, R.M.B.. Evaluation of activated sludge treatment and the efficiency of the disinfection of *Giardia* species cysts and *Cryptosporidium* oocysts by UV at a sludge treatment plant in Campinas, south-east Brazil. **W. Sci. Tech.** v.54, n.3, p.89-94, 2006.

CARRARO, E.; FEA, E.; SALVA, S.; GILLI, G.. Impact of a wastewater treatment plant on *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts occurring in surface water. **W. Sci. Technol.** v.41, n.7, p.31-37, 2000.

CASTRO-HERMIDA, J.A.; PORS, I.; MÉNDEZ-HERMIDA, F.; ARES-MAZÁS, E.; CHARTIER, C.. Evaluation of two commercial disinfectants on the viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Vet. J.**, 2005.

CATI/Projeto Lupa (1995-96)

CATTANEO, M. Desafios para o abastecimento de água. **Sci. Americ. Brazil**. Dezembro, p.76, 2007.

CAVALIER-SMITH, T..Eucarites with no mitochondria. **Nat. (London)**. v.326, p.332-333, 1987.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Giardiasis Surveillance. United States, 1992-1997. **Morb. Mortal Wkly Rep.** v.49, no. SS-7, 2000.

CEASA. Campinas investe na modernização. **Correio Popular**. Campinas, 1999. Disponível em: www.ipv.pt.htm

CEASA. Disponível em: (www.ceasacampinas.com.br).

CEDILLO-RIVERA, R.; DARBY, J.M.; ENCISO-MORENO, J.A.; ORTEGA-PIERRES, G.; EY, P.L.. Genetic homogeneity of axenic isolates of *Giardia intestinalis* derived from acute and chronically infected individuals in México. **Parasitol. Res.** v.90, p.119-123, 2003.

CERMEÑO, Z.S. Cultivo de plantas hortícolas em estufa. **Ed. Litexa**, Portugal, p.368, 1977.

CHANES, J.W.; BALDERAS, F.V.; MALO, A.L.. Minimally processed foods – state of the art and future. In: FITO, P.; RODRIGUEZ, E.O.; CÁNOVAS, G.V. (Ed). **Food Eng.** 2000. New York, NY: CHAPMAN & HALL. cap.11, p.181-212, 1997.

CHARCHAR, J.M.. Nematóides em hortaliças. Circular técnica. **Embrapa**. ISSN 1415-3033, 1999.

CHAURET, C.; CHEN, P.; SPRINGTHORPE, S.. Effect os envirommental stressors on the survival of *Cryptosporidim* oocysts. **Proc. AWWA W. Qual. Technol. Conf.**, p.1567-85, 1995.

CHAURET, C.; SPRINGTHORPE, S.; SATTAR, S.. Fate of *Cryptosporidium* oocysts, *Giardia* cysts, and microbiol indicators during wastewater treatment and anaerobic sludge digestion. **Can. J. Microbiol.** v.45, n.3, p.257-262, 1999.

CHIEFFI, P.P.; SENS, Y.A.S.; PASCHOALOTTI, M.A.; MIORIN, L.A.; SILVA, H.G.C.; JABUR, P.. Infection by *Cryptosporidium parvum* in renal patients submitted to renal transplant or hemodialysis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.31, n.4, p.333-337, 1998.

CIFUENTES, E.; BLUMENTHAL, U.; RUIZ-PALACIOS, G.; BENNET, S.. Biological health risks associated with the composting of wastewater plant sludge. **J. W. Pollut. Cont. Fed.** 56:1269-1276, 1992.

CIFUENTES, E.; GOMEZ, M.; BLUMENTHAL, U.; TELLEZ-ROJO, MM.; ROMIEU, I.; RUIZ-PALACIOS, G.; RUIZ-VELASCO, S.. Risk factors for *Giardia intestinalis* infection in agricultural villages practicing wastewater irrigation in Mexico. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.62, p.388-392, 2000.

CLANCY, J.L.; BUKHARI, Z.; McCUIN,; MATHESON, Z.; FRICKER, C.R.. USEPA method 1622 This method for analyzing *Cryptosporidium* in water has proved to be a significant improvement over the Information Collection Rule method. **J. AWWA**, v.91, p.60-68, 1999.

COELHO, L.M.P.S.; DE OLIVEIRA, S.M., MILMAN, M.H.S.; KARASAWA, K.; DE SANTOS, R. P.. Detection enteroparasites transmissible forms in water and raw vegetables consumed in pré-schools from Sorocaba, São Paulo State, Brazil. **Rev. Soc. Med. Trop.**, v.34, n.5, 2001.

CONBOY, M.J. & GOSS, M.J.. Natural protection of groundwater against bacteria of fecal origin. **J. Contam. Hydrol.** 43:1-24, 2000.

CONSIDINE, R.F.; DIXON, R.; DRUMMOND, C.J.. Oocysts of *Cryptosporidium parvum* and model sand surfaces in aqueous solutions: an atomic force microscope (AFM) study. **Water Res.** v.36, p.3421-3428, 2002.

COOK, N.; PATON, C.A.; WILKINSON, N.; NICHOLAS, R.A.B.; BARKER, K.; SMITH, H.V.. Towards standard methods for the detection of *Cryptosporidium parvum* on lettuce and raspberries. Parte 1: Development and optimization of methods. **Int. J. Food Microbiol.**, v.109, p.215-221, 2006a.

COOK, N.; PATON, C.A.; WILKINSON, N.; NICHOLAS, R.A.B.; BARKER, K.; SMITH, H.V.. Towards standard methods for the detection of *Cryptosporidium parvum* on lettuce and raspberries. Parte 2: Validation. **Int. J. Food Microbiol.**, v.109, p.222-228, 2006b.

COOLEN, W.A. & D'HERDE, C.J.. A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. Ghent; State Agricultural Research Center, 77p, 1972.

CORLISS, J.O.. An interim utilitarian (“user friendly”) hierarchical classification and characterization of the protists. **Acta Protozool.** v.33, p.1-51, 1994.

CRAIK, S.A.; FINCH, G.R.; BOLTON JR.; BELOSEVIC, M.. Inactivation of *Giardia muris* cists using medium-nessure ultra violet radiation in filtered drining water. **Wat. Res.**v.34, n.18, p.4325-4332, 2000.

CRAUN, G.F.; HUBBS, S.A.; FROST, F.; CALDERON, R.L.;VIA, S.H.. Waterborne outbreaks of Cryptosporidiosis. **J. AWWA.** p.81-91, 1998.

CURRENT, W. L.. Human cryptosporidiosis. **N. Engl. J. Med.** v.309, p.1326-1327, 1983.

CURRENT, W.L.. Cryptosporidiosis: a protozoologists view of an emerging zoonosis. **Microecol. Ther.** v.15, p.165, 1985.

CURRENT, W.L.. The biology of *Cryptosporidium*. **Am. Soc. Microbiol. News**, v.54, p.605, 1988.

DA SILVA, C.G.M.; ANDRADE, S.A.C.; STAMFORD, T.L.M.. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. e outros parasitas em hortaliças consumidas “*in natura*”, no Recife. **Ciênc. Saud. Col.** v.10, suppl. 0, 2005.

DA SILVA, E. & IACCARINO, M.. Emerging diseases: a global threat. **Biotec. Advances**, v.17, p.363-384, 1999.

DA SILVA, J.G.. O novo rural brasileiro. Campinas: Unicamp. 1999.

DAI, X. & BOLL, J.. Evaluation of Attachment of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* to Soil Particles. **J. Envirol. Qual.** v.32, p.296-304, 2003.

DAI, X.; BOLL, J.; HAYES, M.E.; ASTON, D.E.. Adhesion of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* to solid surfaces: the role of surface charge and hydrophobicity. **Col. Surf.** v.34, p.259-263, 2004.

DAVIES, C.M.; KAUCNER, C.; DEERE, D.; ASHBOLT, N.J.. Recovery and Enumeration of *Cryptosporidium parvum* from Animal Fecal Matrices. **Appl. Environ. Microbiol.**v.69, n.5, p.2842-2847, 2005.

DAWSON, D.. Foodborne protozoan parasites. **Int. J. Food Microbiol.**, v.103, p.207-227, 2005.

DAWSON, D.. Foodborne protozoan parasites. **Int. J. Food Microbiol.**, v.103, p.207-227, 2005.

DE REGNIER, D.P.; COLE, L.; SCHUPP, D.; ERLANDSEN, S.L.. Viability of *Giardia* cysts suspended in Lake, River, and tap water.. **Appl. Environ. Microbiol.** May., p.1223-1229, 1989.

DE SOUZA, L.R.; RODRIGUES, M.A.M; MORCELI, J.; KEMP, R.; MENDES, R.P.. Cryptosporidiosis of the biliary tract mimicking pancreatic cancer in an AIDS patient.

DECKER, H.. Plant nematodes and their control (Phytonematology). **New Delhi: N. N. Sveshinikova**, 540p, 1989.

DEEN, A.; CRAIG, R.; ANTENUCCI, J.P.. The study water contamination incident of 1998 – monitoring and modeling. In: Hydro 2000, 3rd Int. **Hidrology and Water Res. Symp.** v.1, IEAUST, Australia: Inst. Eng. Australia, p103-109, 2000.

DENG, M.Q.; CLIVER, D.O.; MARIAN, T.W.. Immunomagnetic capture PCR to detect viable *Cryptosporidium parvum* oocysts in environmental samples. **Appl. Environ. Microbiol.** v.63, p.3114-3138, 1997.

DI GIOVANNI, G.D.; HASHEMI, F.H.; SHAW, N.J.; ABRAMS, F.A.; LECHEVALLIER, M.W.; ABBASZADEGAN, M.. Detection of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in surface and filter backwash water samples by

immunomagnetic separation and integrated cell culture-PCR. **Appl. Environ. Microbiol.** August, p.3427-3432, 1999.

DILLINGHAM, R.A.; LIMA, A.A.; GUERRANT, R.L.. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. **Microbiol. Infect.** v.4, p.1059-1066, 2002.

Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822004000200015&1..., 2004.

DROZD, C. & SCHWARTZBROD, J.. Hydrophobic and Electrostatic Cell Surface Properties of *Cryptosporidium parvum*. **Appl. Environ. Microbiol.** v.62, n.4, p.1227-1232, 1996.

DUPONT, H.; CHAPPEL, C.; STERLING, C.R.; OKHUYSEN, P.C.; ROSE, J.B. & JAKOBOWSKI, W.. The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. **N. Engl. J. Med.**, v.332, p.855, 1995.

EATON, A.D., GREENBERG, A.E., CLESCERI, L.S., **Standard methods for examination of water and wastewater.** APHA. Washington DC, 20 ed., 1998.

ENEMARK, H.L.; JUEL, C.D.; CACCIÓ, S.. Effects of environmental conditions on *Cryptosporidium* oocysts viability: a pilot stud. Disponível em: <http://www.teagasc.ie/publications/2003/conferences/cryptosporidiumparvum/paper04.htm>, 2003.

ERDOGRUL, O. & SENER, H.. The contamination of various fruit and vegetable with *Enterobius vermicularis*, *Ascaris* eggs, *Entamoeba histolytica* cysts and *Giardia* cysts. **Food Control.** v.16, p.559-562, 2005.

ESTEBAN J.G.; AGUIRRE, C.; FLORES, A.; STRAUSS, W.; ANGLES, R.; MASCOMA, S.. High *Cryptosporidium* prevalences in healthy Aymara children from the northern Bolivian Altiplano. **Amer. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.58, n.1, p.50-55, 1998.

EY, P.L.; MANSOURI, M.; KULDA, J.; NOHÝNKOVÁ, E.; MONIS, P.T.; ANDREWS, R.; MAYRHOFER, G.. Genetic analysis of *Giardia* from hooved farm animals reveals artiodactyl-specific and potentially zoonotic genotypes. **J. Euk. Microbiol.** v. 44, p.626-635, 1997.

FALAVIGNA, L.M.; FREITAS, C.B.R.; MELO, G.C.; NISHI, L.; ARAÚJO, S.M.; FALAVIGNA-GUILHERME.. Qualidade de hortaliças comercializadas no noroeste do Paraná, Brasil. **Parasitol. Latinoam.** v.60, p.144-149, 2005.

FARIAS, E.W.C.; GAMBA, R.C.; PELLIZARRI, V.H.. Detection of *Cryptosporidium* spp. Oocysts in raw sewage and creek water in the city of São Paulo, Brazil. **Braz. J. Microbiol.**, v.33, n.1, 2002.

FAUBERT, G.. Immune response to *Giardia duodenalis*. **Clin. Microbiol. Rev.** v.13, p.35-54, 2000.

- FAUBERT, G.M. & LITVINSKY, Y.. Natural transmission of *Cryptosporidium parvum* between dams and calves on a dairy farm. **J. Parasitol.** v.86, n.3, p.495-500, 2000.
- FAYER, R. & NERAD, T.. Effects of low temperatures on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Appl. Environ. Microbiol.** v.62, n.4, p.1431-1433, 1996.
- FAYER, R.. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. **CRC Press**. New York, 1997.
- FAYER, R.. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. **Vet. Parasitol.** v.126, p.37-56, 2004.
- FAYER, R.. Effect of high temperature on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water. **Appl. Environ. Microbiol.** v.60, n.8, p.2732-2735, 1994.
- FAYER, R.; DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.. Zoonotic protozoa: from land to sea. **Trends Parasitol.**, v.20, n.11, p.531-536, 2004.
- FAYER, R.; MORGAN, U. & UPTON, S.J.. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **Int. J. Parasitol.**, v.30, p.1305-1322, 2000.
- FEACHEM, R.G.; BRADLEY, D.J.; GARELICH, H.; MARA, D.D.. Sanitation and disease: health aspects of excreta and wastewater management. New york: **John Wiley**, p. 501 (World bank in studies in water supply and sanitation,3), 1983.
- FELTUS, D.C.; GIDDING, C.W.; SCHNECK, B.L.; MONSON, T.; WARSHAUER, D.; MCEVOY.. Evidence supporting zoonotic transmission of *Cryptosporidium* spp. In Wisconsin. **J. Clin. Microbiol.** v.44, n.12, p.4303-4308, 2006.
- FERGUSON, A.; GILLON, J.; MUNRO, G.. Pathology and pathogenesis of intestinal mucosal damage in giardiasis. In "Giardiasis" (E.A. Meyer, ed) **Hum. Parasit. Dis.** v.3, p.153-174, 1990.
- FERNANDES, A.A.; MARTINEZ, H.E.P.; PEREIRA, P.R.G.; FONSECA, M.C.M. Produtividade, acúmulo de nitrato e estado nutricional de cultivares de alface, em hidroponia, em função de fontes de nutrientes. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 2, p.195-200, 2002.
- FILGUEIRA, F.A.R.. Manual de olericultura: cultura e comercialização de hortaliças. 2ª edição. São Paulo: **Ed. Agronômica Ceres**. p.77-86, 1982
- FILGUEIRA, F.A.R. Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 2ª ed., **UFV**, 2003.
- FORD, T.E. & COLWELL, R.R.. A global decline in microbiological safety of water: a call for action. **American Academy of Microbiology**. 1996.
- FORSYTHE, S.J.. Microbiologia da segurança alimentar. Ed. Artmed. Porto Alegre. p.424, 2002.

FRANCO, R.M.B. & CORDEIRO, N. DA S. Giardiose e criptosporidiose em creches no município de Campinas, SP. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.29, p.585-591, 1996.

FRANCO, R.M.B.; CANTUSIO NETO, R.; BRANCO, N.. Detecção de *Cryptosporidium* sp. e *Giardia* sp. em água pela técnica de filtração em membrana: estudo comparativo entre diferentes técnicas de eluição. **J. Bras. Patol.** v.37, n.4, p.205, 2001b.

FRANCO, R.M.B.; ROCHA-EBERHARDT, R.; CANTUSIO NETO, R.. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw water from Atibaia River, Campinas, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.** v.43, p.109-111, 2001a.

FRANCO, R.M.B. & CANTUSIO NETO, R.. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in bottled mineral water commercialized in the city of Campinas, State of São Paulo, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.97, p.207, 2002.

FRICKER, C.R. & CRABB, J.H.. Advances in Parasitology. **Academic Press Limited.** v.40, p.242-278, 1998.

FUNASA/IBGE. Fundação Nacional da Saúde; Ministério da Saúde. No Brasil: cenário atual caracterizado pela deficiência do sistema de esgotamento sanitário, 2000.

GAMBA, R.C.; CIAPINA, E.M.P.; ESPÍNDOLA, R.S.; PACHECO, A.; PELLIZARI, V.H.. Detection of *Cryptosporidium* sp. Oocysts in groundwater for human consumption in Itaquaquecetuba city, S.P. – Brazil.. **Braz. J. Microbiol.** v.31, p.151-153, 2000.

GARDNER, T.B. & HILL, D.R.. Treatment of giardiasis. **Clin. Microbiol Rev.** v.14, p.114-128, 2001.

GIANG, T.T.; POLLACK, G.; KOTLER, D.P.. Cryptosporidiosis of the nasal mucosa in a patient with aids. **Aids.** v.8., p.555-565, 1994.

GILLIN, F.D. & REINER, D.S.. Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. **Ann. Rev. Microbiol.** v.50, p.679-705, 1996.

GILLIN, F.D. & REINER, D.S.; GAUT, D.S.; DOUGLAS, H.; WUNDERLICH, S.; SAUCH, J.F. . Encystation and expression of cyst antigens by *Giardia lamblia* in vitro **Ann. Rev. Microbiol.** v.50, p.679-705, 1987.

GILLIN, F.D.; BOUCHER, S.E.; REINER, D.S.. *Giardia lamblia*: the roles of bile, lactic acid, and pH in completion of the life cycle *in vitro*. **Exp. Parasitol.** v.69, p.164-174, 1989.

GLABERMAN, S.; MOORE, J.; LOWERY, C.; CHALMERS, RM.; SULAIMAN, I.; ELWIN, K.; ROONEY, PJ.; MILL, BC.; DOOLEY, JSG.; LAL, AA.; XIAO, L.. Three drinking-water-associated Cryptosporidiosis outbreaks, Northern Ireland. **Emerg. Infect. Dis.**, v.8, n.6, p.631-633, 2002.

GRACZYK, T.K.; MARCOGLIESE, D.J.; LAFONTAINE, Y.; DA SILVA, A.J.; MHANGAMI-RUWENDE, B.; PIENIAZEK, N.J.. *Cryptosporidium parvum* oocysts in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): evidence from the St. Lawrence River. **Parasitol. Res.**, v.87, p.231-234, 2001.

GRIFFITHS, J.K.; MOORE, R.; DOOLEY, S.; KEUSCH, G.T.; TZIPORI, S.. *Cryptosporidium parvum* infection of Caco-2 cell monolayers induces an apical monolayer defect, selectively increases transmonolayer permeability, and causes epithelial cell death. **Infect. Immun.** v.62, p.4506-4514, 1994.

GUERRANT, R.L.. Cryptosporidiosis: an emerging, highly infectious threat. **Emerg. Infect. Dis.** v.3, p.51-57, 1997.

GUIMARÃES, S. & SOGAYAR, M.I.. Detection of anti-*Giardia lamblia* serum antibody among children of day care centers. **Rev. Saud. Pub.** v.36; n.1, p.63-68, 2002.

HUNTER & THOMPSON. The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. **Int. J. Parasitol.** n.35, p.1181-1190, 2005.

HARICH, E.M.; GALVANI, A.T.; PADULA, J.A.; SANTOS, A.I.P.; MENEGON, N.; SATO, M.I.Z.. Detecção de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas superficiais captadas para consumo humano. **Anais. XX Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Salvador/BA, p.17, 1999.

HARTONG, W.A.; GOURLEY, W.K.; ARVANITAKIS, C.. Giardiasis: clinical spectrum and function-structural abnormalities of the small intestinal mucosa. **Gastroenterology**. v.77, p.61-69, 1979.

HAWKINS, P.R.; SWANSON, P.; WARNECKE, M.; SHANKER, S.R.; NICHOLSON,

HAYES, E.B.; MATTE, T.D.; O'BRIEN, T.R.; MC-KINLEY, T.W.; LOGSDON, G.S.; ROSE, J.B.; UNGAR, B.L.P.; WORD, D.M.; PINSKY, P.F.; CUMMINGS, M.L.; WILSON, M.A.; LONG, E.G.; HURWITZ, E.S.; JURANEK, D.D.. Large community outbreak of cryptosporidiosis due to contamination of a filtered public water supply. **N. Engl. Med.** 320:1372-6, 1989.

HAYES, S.L.; RICE, E.W.; WARE, M.W.; SCHAEFER III, F.W.. Low pressure ultraviolet studies for inactivation of *Giardia muris* cysts. **J. Appl. Microbiol.** v.94, p.54-59, 2003.

HERMES, L.C. & SILVA, A.S.. Avaliação da qualidade das águas. **Embrapa**. p.1-55, 2004.

HERWALDT, B.L.. *Cyclospora cayentanensis*: A Review, Focusing on the Outbreaks of Cyclosporiasis in the 1990s. **Clin. Infect. Dis.**, v.31, p.1040-1057, 2000.

HILL, D.R.. Lymphocyte proliferation in Peyer's patches of *Giardia muris* - infected mice. **Infect. Immun.** v.58, p.2683-2685, 1990.

HOMAN, W.L. & MANK TG.. Human giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology. **Int. J. Parasitol.**, v.31, p.822-6, 2001.

HOMAN, W.L.; GILSING, M. BENTALA, H.. Characterization of *Giardia duodenalis* by polymerase-chain-reaction fingerprinting. **Parasitol. Res.** v.84, p.707-714, 1998.

HOORNSTRA, E. & HARTOG, B..A quantitative risk assessment on *Cryptosporidium* in food and water. Disponível: www.teagasc.ie/publications/2003/conferences/cryptosporidiumparvum/paper05.htm., 2003.

HOPKINS, R.M.; MELONI, B.P.; GROTH, D.M.; WETHERALL, J.D.; REYNOLDS, J.A.; THOMPSON, R.C.. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. **J. Parasitol.** v.83, p.44-51, 1997.

HSU, B.M. & HUANG, C.P.. Influence of ionic strength and pH on hydrophobicity and zeta potential of *Giardia* and *Cryptosporidium*. **Col. Surf.** v.201, p.201-206, 2002.

HUNTER, P.R. & THOMPSON, A.R.C.. The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. **Int. J. Parasitol.** v.35, p.1181-1190, 2005.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Dados sobre municípios brasileiros que não contam com saneamento básico. Rio de Janeiro, Censo 2000. Disponível: www.ibge.gov.br .

IBGE. **Produção Agrícola Municipal (PAM)**. Rio de Janeiro, 2005. Disponível: www.sidra.ibge.gov.br .

JAKUBOWSKI, W.; BOUTROS, S.N.; FABER, W.; FAYER, R.; GHIORSE, W.; LECHEVALLIER, M.; ROSE, J. SCHAUB, S.; SINGH, A.; STEWART, M.. Environmental methods for *Cryptosporidium*. **J. AWWA.** p.107-121, 1996.

JAKUBOWSKI, W.; BOUTROS, S.N.; HARRIS, S.L.; HURST, C.J.; LECHEVALLIER, M.W.; MOYER, N.P.; ROCHELLE, P.A.; ROSE, J.B.. **Standard Methods Committee**, 2001.

JAKUBOWSKI, W.; SYKORA, J.L.; SORBER, C.A.; CASSON, L.W.; GAVAGHAN, P.D.. Determining giardiasis prevalence by examination of sewage. **Water Sci. Technol.** v.24, p.173-178, 1991.

JENKINS, M.B.; BOWMAN, D.D.; FOGARTY, E.A.; GHIORSE, W.C.. *Cryptosporidium parvum* oocyst inactivation in three soil types at various temperatures and water potentials. **Soil Biol. Bioch.** v.34, p.1101-1109, 2002.

JENKINS, W.R.. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter.** v.48, n.9, p.692-695, 1954.

KABNICK, K.S. & PEATTIE, D.A.. *It situ* analyses reveal that the two nuclei of *Giardia lamblia* are equivalent. **J. Cell. Sci.** v.95, p.353-360, 1990.

KARAMAN, M.E.; PASHLEY, R.M.; BUSTAMANTE, H.; SHANKER, S.R.. Colloids Surf. **A: Physicochem. Eng. Aspects.** v.146, p.217-225, 1999.

KARAMAN, M.E.; PASHLY, R.M.; BUSTAMANTE, H.; SHANKER, S.R.. Microelectrophoresis of *Cryptosporidium parvum* oocysts in aqueous solutions of inorganic and surfactant cations. **Colloid Surf. A.** v.146, p.217-225, 1999.

KIRBY, R.M.; BARTRAM, J.; CAAR, R.. Water in food production and processing: quantity and quality concerns. **Food Control.** v.14, p.283-299, 2003.

KUCZYNSKA, E. & SHELTON, D.R.. Methody for detection and enumeration of *Cryptosporidium parvum* oocysts from feces, manure, and soils. **Appl. Environ. Microbiol.** v.65, p.2820-2826, 1999.

KUCZYNSKA, E.; SHELTON, D.R.; PACHEPSKY, Y.. Effect of Bovine Manure on *Cryptosporidium parvum* Oocyst Attachment to Soil. **Appl. Environ. Microbiol.** v.71, n.10, p.6394-6397, 2005.

KULDA, J. & NOHÝHOVÁ, E.. *Giardia* in humans and animals. In Parasitic protozoa. (Julius P. Kreier, ed.). **Academic Press.** P. 225-442, 1995.

LABARCA, J.L.; TAGLE, V.R.; ACUÑA, G.L.; ODDÓ, D.B.; PÉREZ, C.C.; GUZMAN, S.B.. Colecistitis aguda alitiasica por *Cryptosporidium* en un paciente con SIDA. **Revista Médica de Chile.** v.120, p.789-793, 1992.

LABERGE, I.; GRIFFITHS, MW.; GRIFFITHS, MW.. Prevalence, detection and control of *Cryptosporidium parvum* in food. **Int. J. Food Microbiol.** v.31, p.1-26, 1996.

LAMARCHE, H.. A agricultura familiar: comparação internacional. Tomo I. Trad. TIJIWA, Ângela Maria Naoko. Campinas: **Ed. da UNICAMP**, 1993.

LARKIN, E.P.; TIEMEY, J.T.; LOVETT, J.; VAN DONSEL, D.; FRANCIS, D.W.; JACKSON, G.J.. Land application of sewage wastes: potencial for contamination of foodstuffs and agricultural soils by viruses, bacterial pathogens and parasites. In: Me Kim, H.L. (Ed.), **Stat. Know. L. Treat.Wast.** v.2, U.S. Army Corps of Engineers, CRREL, Hanover, NH, p.215-223, 1978.

LECHEVALLIER, M.W.; NORTON, W.D.. *Giardia* and *Cryptosporidium* in raw water and finished water. **J. Americ. W. W. Assoc.** v.87, p.54-68, 1995.

LECHEVALLIER, M.W.; NORTON, W.D.; LEE, R.G.. Ocurrance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in surface water samples. **Appl. Environ. Microbiol.** v.57, p.2610-2616, 1991.

LEVINE, N.D..The protozoan phylum apicomplexa. **CRC Press, Inc.**, Boca Raton, Florida. 1988.

LEVINE, W.C.; WILLIAM, T.. Waterborne Disease Outbreaks, 1986-1988. **M.M.W.R.**, v.39(SS-1), p.1-9, 1990.

LORDELLO, L.G.E.. Contribuição ao conhecimento dos nematóides que causam galhas em raízes de plantas do Estado de São Paulo e estados vizinhos. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, Piracicaba. v.21, p.182-188, 1964.

LORENZO-LORENZO, M.J.; ARES-MAZAS, M.E.; MATURANA, V.M.; DURAN-OREIRO, D.. Effect of ultraviolet disinfection of drinking water on the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. **J. Parasitol.** v.79, n.1, p.67-70, 1993.

LOURENZANI, A.E.B.S.; SILVA, A.L.. Um estudo da competitividade dos diferentes canais de distribuição de hortaliças. **Gestão & Produção**. V.11, n.3, p.385-398, 2004.

LUPA - Levantamento Censitário de Unidades de Produção Agrícola – 1997/1998.

MAC DONALD, T.T. & SPENCER, J.. Evidence that activated mucosal T cells play a role in the pathogenesis of enteropathy in human small intestine. **J. Exp. Med.**, v.167, p.1341-1349, 1988.

MACKENZIE, W.R.; HOXIE, N.J.; PROCTOR, M.E.; GRADUS, S.; BLAIR, K.A.; PETERSON, D.E.; KAZMIERCZAK, J.J.; ADDISS, D.G.; FOX, K.R.; ROSE, J.B.; DAVID, J.P.. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. **New Engl. J. Med.** v.331, p.161-167, 1994.

MACLER, B.A.; MERKLE, J.C.. Current Knowledge on groundwater microbial pathogens and their control. **Hydrog. J.** v.8, p.29-40, 2000.

MALTA, R.C.G.; WAIB, C.M.; BRANCO, JR., A.C.. Investigação epidemiológica sobre enteroparasitos em crianças em idade pré-escolar no município de Lins (SP). **Rev. Patol. Trop.** v.31, n1, p.109-120, 2002.

MATURAMA, V.M.I.; ARES-MAZÁS, M.E.; DURAN-OREIRO, D.; LORENZO-LORENZO, M.J.. Efficacy of activated sludge in removing *Cryptosporidium parvum* oocysts from sewage. **Appl. Environm. Microbiol.** v.58, n.11, p.3514-3516, 1992.

MAYER, J.D..Geography, ecology and emerging infectious diseases. **Soc. Sci. Med.**, v.50, p.937-952, 2000.

MCLAUCHLIN, J.; AMAR, C.; PEDRAZA-DIAZ, S.; NICHOLS, G.L.. Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp.. In the United Kingdom: results of genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1,705 fecal samples from humans and 105 fecal samples from Livestock animals. **J. Clinic. Microbiol.** v.38, p.3984-3990, 2000.

MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; MC CAIG, L.F.; BRESEE, J.S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V.. Food-related illness and death in the United States. **Emerg. Infect. Dis.**, v.5, n.5, p.607-625, 1999.

MEDEMA, G.J.; SCHETS, F.M.; TEUNIS, P.F.M.; HAVELAAR, A.H.. Sedimentation of free and attached *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water. **Appl. Environ. Microbiol.** v.64, n.11, p.4460-4466, 1998.

MELO, P.C.T. & VILELA, N.J.. Importância da cadeia produtiva brasileira de hortaliças. **13ª reunião Ordinária da Câmara Setorial da Cadeia Produtiva de Hortaliças/MAPA**, Brasília, DF., 2007.

MESQUITA, VCL.; SERRA, CMB.; BASTOS, OMP.; UCHÔA, CMA.. Intestinal parasites contamination from vegetables commercialized in Niterói and Rio de Janeiro cities, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.32, n.4, p.363-366, 1999.

MILLAR, B.C.; FINN, M.; XIAO, L.; LOWERY, C.J.; DOOLEY, J.S.G.; MOORE, J.E.. *Cryptosporidium* in foodstuffs-an emerging aetiological route of human foodborne illness. **Food Sci Technol.**, v.13, p.168-187, 2002.

MINTZ, E.D.; HUDSON-WRAGG, M.; MSHAR, P.; CARTTER, M.L.; HADLER, J.L.. Foodborne giardiasis in a corporate office setting. **J. Infect. Dis.** 167:250-253, 1993.

MONGE, R. & ARIAS, M.L.. Presence of various pathogenic microorganisms in fresh vegetables in Costa Rica. **Archivo Latinoamericano de Nutrición.** v.46, p.292-294, 1996

MONGE, R. & CHINCHILLA, M.. Presence of *Cryptosporidium* oocysts in fresh vegetables. **J. Food Protec.** v.59, p.202-203, 1996.

MONIS & THOMPSON.. *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses: fact or fiction? **Infect. Genet. Evol.** v.3, p.233-244, 2003.

MORGAN, U.M.; FORBES, D.A.; THOMPSON, C.A.. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium parvum* infection. **Europ. J. Parasitol.** v.34, p.262-266, 1998.

MORITA, S.; NAMIKOSHI, A.; HIRATA, T.; OGUMA, K.; KATAYAMA, H.; OHGAKI, S.; MOTOYAMA, N.; FUJIWARA, M.. Efficacy of UV Irradiation in Inactivating *Cryptosporidium parvum* Oocysts. **App. Environ. Microbiol.** p.5387-5393, 2002.

MUSIAL, C.E.; ARROWOOD, J.M.; STERLING, C.R.; GERBA, C.P.. Detection of *Cryptosporidium* in water by using polypropylene cartridge filters. **Appl. Environ. Microbiol.** v.53, p.687-692, 1987.

NANDURI, J.; WILLIAMS, S.; AJI, T.; FLNIGAN, T.P.. Characterization of an immunogenic glycocalyx on the surfaces of *Cryptosporidium parvum* oocysts and sporozoites. **Infect. Immun.** v.67, p.2022-2024, 1999.

NICKLE, W.R.. Manual of agricultural nematology. New York: Marcel Dekker Inc. 1035p, 1991.

NIEMINSKI , E.C.; SCHAEFER, F.W.; ONGERTH, J.E.. Comparasion of two methods for detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water. **Appl. Environ. Microbiol.** v.61, p.1714-1719, 1995.

NIME, FA.; BUREK, JD.; PAGE, DL.; HOLSCHER, MA.; YARDLEY, JH.. Acute enterocolitis in a human being imfected with the protozoan *Cryptosporidium*. **Gastroent.**, v.70, p.592-598, 1976.

O' HANDLEY, R.M.; OLSON, M.E.; FRASER, D.; ADAMS, P.; THOMPSON, R.C.. Prevalence and genotypic characterization of *Giardia* in dairy calves from Western Australia and Western Canada. **Vet. Parasitol.** v.90, p.193-200, 2000.

OLIVEIRA, C.A.F. & GERMANO, P.M.L..Study of the occurrence of intestinal parasitoses vegetables comercially traded in the metropolitan area of S. Paulo, SP – Brazil II – Research into protozoan cysts. **Rev. Saud. Publ. S.P.** v.26, n.5, p.332-335, 1992.

OLSEN, S.J.; MACKINNON, L.C.; GOULDING, J.S.; BEAN, N.H.; SLUTSKER, L.. Surveillance for foodborne-disease outbreaks - United States, 1993-1997. In: CDC - **Morb. Mortal Wkly Rep.**, v.49, n.SS-1, 2000.

OMS. “I Seminário Estadual de Vigilância Epidemiológica das Doenças deTransmissão Hídrica e Alimentar” – Natal, RN, Dez/2005

ORTEGA, Y.R. & ADAM, R.D.. *Giardia*: Overview and update. **Clin. Infect. Dis.**, v.25, p.545-50, 1997b.

ORTEGA, Y.R.; ROXAS, C.R.; GILMAN, R.H.; MILLER, N.J.; CABRERA, L.; TAQUIRI, C.; STERLING, C.R.. Isolation of *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis* from vegetables collected in markets of an endemic region in Peru. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.57, p.683-686, 1997a.

PAULA, P.; RODRIGUES, P.S.S.; TÓRTORA, J.C.O.; UCHÔA, C.M.A.; FARAGE, S.. Contaminação microbiológica e parasitológica em alfaces (*Lactuca sativa*) de restaurantes self-service, de Niterói, RJ. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.36, n.4, p.535-537, 2003.

PELCZAR Jr.,J.M.; REID,R.; CHAN,E.C.S.. Microbiologia conceitos e aplicações, 2^a ed, **Ed Makron Books do Brasil**, São Paulo – SP, vol 2, 1996.

PENG, M.M.; XIAO, L.; FREEMAN, A.R.; ARROWOOD, M. J.; ESCALANTE, A.A.; WELTMAN, A.C.; ONG, C.S.L.; MAC KENZIE, W.R.; LAL, A.A.; BEARD, C.B.. Genetic polymorphhism among cryptosporidium parvum isolates: evidence of two distinct human transmission cycles. **Emerg. Infect. Dis.** 3, 567-573, 1997.

PINTO, L.A.C.. A população do rural contemporâneo de Campinas. **XIII Encontro da Associação de Estudos Populacionais**. Ouro Preto/MG, Brasil, 2002.

PORTER, J.D.; GAFFINEY, C.; HEYMAN, D.; PARKIN, W.. Food-borne outbreak of *Giardia lamblia*. **Americ. J. Public. Health.** v.80, n. 10, p.1259-1260, 1990.

POWER, D.W.. The immunophysiology of intestinal electrolyte transport. Frizzell, R.A.; Field, M. [editors]. Absorptive and secretory processes of intestine. Handbook of Physiology, The Gastrointestinal System. IV. Bethesda, MD: **Amer. Physiol. Soc.** p.591-641, 1991.

REINER, D.S.; MACCAFFERY, M.; GILLIN, F.D.. Sorting of cyst wall proteins to a regulated secretory pathway during differentiation of the primitive eukaryote, *Giardia lamblia*. **Eur. J. Cell. Biol.** v.53, p.142-153, 1990.

ROACH, P.D.; OLSON, M.E.; WHITLEY, G.; WALLIS, P.M.. Waterborne *Giardia* and *Cryptosporidium* oocysts in the Yukon, Canadá. **Appl. Environ. Microbiol.** 59:67-73, 1993.

ROBERTSON, L.J. & GJERDE, B.K.. Factors affecting recovery efficiency in isolation of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from vegetables for standard method development. **J. Food Protection**, v.64, n.11, p.1799-1805, 2001b.

ROBERTSON, L.J. & GJERDE, B.K.. Isolation and enumeration of *Giardia* cysts, *Cryptosporidium* oocysts, and *Ascaris* eggs from fruits and vegetables. **J. Food Protec.**, v. 63, n.6, p.775-778, 2000.

ROBERTSON, L.J. & GJERDE, B.K.. Occurrence of *Cryptosporidium* oocyst and *Giardia* cysts in raw waters in Norway. **Scand. J. Public Health**, v.29, p.200-207, 2001a.

ROBERTSON, L.J.; JOHANNESSEN, G.S.; GJERDE, B.K.; LONCAREVIC, S.. Microbiological analysis of seed sprouts in Norway. . **Int. J. Food Microbiol.** v.75, p.119-126, 2002.

ROBERTSON, L.J.; PATON, C.A.; CAMPBELL, A.T.; SMITH, P.G.; JACKSON, M.H.; GIMOUR, R.A.; BLACK, S.E.; STEVENSON, D.A.; SMITH, H.V.. *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts at sewage treatment works in Scotland, UK. **Wat. Res.** v. 34, n.8, p.2310-2322, 2000.

ROBERTS-THOMSON, I.C. & MITCHELL, G. F.. Giardiasis in mice. Prolonged infections in certain mouse strains and hypotymic (nude) mice. **Gastroenterology**. v.75, p.42-46, 1978.

ROCKWELL, R.L.. *Giardia lamblia* and giardiasis with particular attention to Sierra Nevada. Disponível: http://www.biosci.ohio-state.edu/~parasite/giardia_sem.html, 2002.

RODRIGUES, R.. Terra, gente e tecnologia impulsionam crescimento do agronegócio brasileiro. **Rev. Usp**, São Paulo, n.64, p.50-57, 2005.

ROSE, J.B. & SLIFKO, T.R.. *Giardia*, *Cryptosporidium*, and *Cyclospora* and their impact on foods: a review. **J. Food. Protection**, v. 62, n.9, p.1059-1070, 1999.

ROSE, J.B. DARBIN, H.; GERBA, C.P.. Correlations of the protozoa, *Cryptosporidium* and *Giardia*, with water quality variables in watershed. **Wat. Sci. Technol.** v.20, p.271-276, 1988.

ROSE, J.B. Occurrence and control of *Cryptosporidium* in drinking water. In: **Drink. W. Microbial.** New York: Springer-Verlag, p.294-321, 1990.

ROSEN, B.H.; CROFT, R.; ATWILL, E.R.; STEHMAN, S; WADE, S.. Waterborne pathogens in agricultural watersheds. **WSSI – USDA.** Technical note 2, p.1-62, 2000.

SAASP. SAS Institute, INC/SP Repensando a agricultura paulista. São Paulo, p.43, 1997.

SANTOS, L.U.. Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. em uma Estação de Tratamento de Esgoto: avaliação das eficiências do processo de lodo ativado na remoção e de desinfecção por luz ultra violeta na inativação desses patógenos. **Tese de Doutorado.** p.132, 2007.

SANTOS, L.U.; BONATTI, T.R.; CANTUSIO NETO, R.; FRANCO, R.M.B.. Occurrence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in activated sludge samples in Campinas, SP. Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.** 46(6):309-313, 2004.

SCHNACK, F.J.; FONTANA, L.M.; BARBOSA, P.R.; DA SILVA, L.S.M.; BAILLARGEON, C.M.M.; BARICHELLO, T.; PÓVOA, M.M.; CAVASINI, C.E.; MACHADO, R.L.D.. Enteropatógenos associados com diarreia infantil (<5 anos de idade) em amostras da população da área metropolitana de Criciúma, Santa Catarina, Brasil. **Cad. Saud. Pub.** Agosto, v.19, n.4, 2003.

SCHUPP, D.G.; JANUSCHKA, M.M.; SHERLOCK, L.A.F.; STIBBS, H.H.; MEYER, E.A.; BEMRICK, W.J.; ERLANDSEN, S.L.. Production of viable *Giardia* cysts *in vitro*: determination by fluorogenic dye staining excystation, and animal infectivity in the mouse and mongolian gerbil. **Gastroenterology.** v.95, p.1-10, 1988.

SCOTT, K.G.; LOGAN, M.R.; KLAMER, G.M.; TEOH, D.A.; BURET, A.G.. Jejunal brush border microvillous alterations in *Giardia muris* – infected mice: role of T lymphocytes and interleukin-6. **Infec. Immun.** v.68, p.3412-3418, 2000.

SEARCY, K.E.; PACKMAN, A.I.; ATWILL, E.R.; HARTER, T.. Association of *Cryptosporidium parvum* with Suspended Particles: Impact on Oocyst Sedimentation. **Appl. Environ. Microbiol.** v.71, n.2, p.1072-1078, 2005.

SHEWFELT, R.L.. Postharvest treatment for extending the shelf life of fruit and vegetables. **Food Technol.** v.40, n.5, 1986.

SIGRIST, J.M.M.. Estudos fisiológicos e tecnológicos de couve-flor e rúcula minimamente processadas. **Tese de Doutorado.** Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, p.112, 2002.

SIMÕES, M.; PISANI, B.; MARQUES, E.G.L.; PRANDI, M.A.G.; MARTINI, M.H.; CHIARINI, P.F.T.; ANTUNES, J.L.F.; NOGUEIRA, A.P.. Hygienic-sanitary conditions of vegetables and irrigation water from kitchen gardens in the municipality of Campinas, SP. **Braz. J. Microbiol.**, v.32, p.331-333, 2001.

SMITH, H.V. & ROSE, J.B. Waterborne cryptosporidiosis. **Parasitol. Today**. v.6, p.8-12, 1990.

SMITH, H.V.; CAMPBELL, B.M.; PATON, C.A.; NICHOLS, R.A.B.. Significance of enhanced morphological detection of cryptosporidium sp. Oocysts in water concentrates determined by using 4',6'-Dimidino-2-Phenylindole and immunofluorescence microscopy. **Appl. Environ. Microbiol.** p.5198-5201, 2002..

SMITH, J.L.. *Cryptosporidium* and *Giardia* as agents of foodborne disease. **J. Food Protect.** v.56, p.451-461, 1993.

SMITH, P.D.. Pathophysiology and immunology of giardiasis. **Annu. Rev. Med.** v.36, p.295-307, 1985.

SMITH, P.D.; LANE, H.V.; GILL, J.F.; MANISCHEWITZ, G.V.; QUINNAN, A.S.; FAUCI, A.S.; MASUR, H.. Intestinal infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). **Ann. Intern. Med.** v.108, p.328-333, 1988.

SODRÉ, F.C. & FRANCO, R.M.B.. Novos aspectos sobre um tema bem conhecido: *Cryptosporidium*. **RBAC.**, v.33, n.2, p.97-107, 2001.

STINER, T.; MATUSAN, A.; HINES, K.; SANDERY, M.. Detetion of a single viable *Cryptosporidium parvum* oocyst in envirionmental water concentrantesby reverse transcription-PCR. **Appl. Environ. Microbiol.** v.62, p.3385-3390, 1996.

STOTT, R.; MAY, E.; MATSUSHITA, E.;WARREN, A.. Protozoan predation as mechanism for the removal of *Cryptosporidium* oocysts from wastewaters in constructed wetlands. **W. Sci. Tech.** v.44, n.11-12, p.191-198, 2001.

STUKEL, T.A.; GREENBERG, E.R.; DAIN, B.J.; REED, F.C.; JACOBS, N.J.. A longitudinal study of rainfall and coliform contamination in small community drinking water supplies. **Environ. Sci. Technol.** 24:571-5, 1990.

STUMM, W. & MORGAN, J.. Aquatic chemistry, 3rd ed. **Wiley Inter. Sci.** New York, 1996.

TAKAYANAGUI, O.; FEBRÔNIO, L.H.P.; BERGAMIN, A.M.; OKINO, M.H.T.; CASTRO E SILVA, A.A.M.C.; SANTIAGO, R.; CAPUANO, D.N.; OLIVEIRA, M.A.; TAKAYANAGUI, A.M.M.. Fiscalização de hortas produtoras de verduras do município de Ribeirão Preto, SP.. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.33, n.2, p.169-174, 2000.

TAUXE, R.V.. Emerging foodborne pathogens. **Int. J. Food Microbiol.**, v.78, p.31-41, 2002.

TAVARES, S.A.; SANTOS, F.F.; MATOS, M.J.L.F.; MELO, M.F.; LANA, M.M.. Hortaliças: rúcula. **Correio Brasiliense**. Brasília, DF, p.3 (Encarte Especial), 2000.

THEODOS, C.M.. Innate and cell-mediated immune responses to *Cryptosporidium parvum*. **Adv. Parasitol.** v.40, p.88-121,1998.

THOMAS, F.; BARD, E.; ROUILLIER, M.C.; PRÉLOT, B.; MARTHIEU, L.. Filtration-elution of *Cryptosporidium* oocysts assisted by electrostatic interactions. **Col. Surf.** v.195, p.135-142, 2001.

THOMPSON, R.C.A.. Giardiasis as a re-emerging disease and its zoonotic potencial. **Int. J. Parasitol.** v.30, p.1259-1267, 2000.

THOMPSON, R.C.A.. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. **J. Parasitol.** p.89, 2003.

THOMPSON, R.C.A.. The zoonotic significance and molecular epidemiology of giardia and giardiasis. **Vet. Parasitol.** v.126, p.15-35, 2004.

THOMPSON, R.C.A.; REYNOLDSON, J.A.; MENDIS, A.H.W.. *Giardia* and giardiasis. **Ad. Parasitol.** v.32, p.72-160, 1993.

TILLEY, M.; UPTON, S.J.; FAYER, R.. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. **CRC Press.** Boca Raton, p. 163-180, 1997.

TOLBOOM, J.J.M.; KABIN, T.; MOLATSELL, P.; ANDERSON, J.; AREUS, T.; FERNANDES, J.. Lactose malabsorption and giardiasis in Basotho school children. **Acta Paediatr. Scand.** v.76, p.60-65, 1987.

TRANI, P.E.& PASSOS, F.A.. Rúcula (Pinchão). Instruções agrícolas para as principais culturas econômicas. **IAC**, Campinas: Boletim 200, p.241-242, 1998.

TRAUB, R.J.; MONIS, P.; ROBERTSON, I.; IRWIN, P.; MENCKE, N.; THOMPSON, R.C.A.. Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living the same community. **Parasitol.** v.128, p.253-262, 2004.

THURSTON-ENRIQUEZ, J.A.; WATT, P.; DOWD, S.; ENRIQUEZ, R.; PEPPER, I.L.; GERBA, C.P.. Detection of Protozoan and Microsporidia in Irrigation Waters Used for Crop Production. **J. Food Protec.** v.65, n.2, p.378-382, 2002.

TZIPORI & WARD..Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. **Microb. Infect.**, v.4, p.1047-1058, 2002.

UPCROFT, P. & UPCROFT, J.A.. Drug resistance and *Giardia*. **Parasitol. Today.** v.9, p.187-190, 1993.

UPCROFT, P. & UPCROFT, J.A.. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. **Clin. Microbiol. Rev.** v.14, p.150-164, 2001.

VAN KESSEL, J.S. & REEVES III. Nitrogen mineralization potential of dairy manures and its relationship to composition. **Biol. Fertil. Soils.** v.36, p.118-123, 2002.

VESEY, G.; GRIFFITHS, K.R.; DEERE, D.K.; WILLIAMS, K.L.; VEAL, D.A.. Simple and rapid measurement of *Cryptosporidium* excystation using flow cytometry. **Int. J. Parasitol.** v.27, p.1353-1359, 1997.

VILELA, N.J. & HENZ.. Situação atual da participação das hortaliças no agronegócio brasileiro e perspectivas futuras. **Caderno de Ciências e Tecnologia.** Brasília, v.17, n.1, p.71-89, 2000.

WALKER, M.; LEDDY, K.; HAGAR, E.. Effects of combined water potential and temperature stresses on *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Appl. Environ. Microbiol.** v.67, n.12, p.5526-5529, 2001.

WANDERLEY, M.N.B.. Em busca da modernidade social: uma homenagem a Alexander V. Chayanov. In: para pensar: outra agricultura. FERREIRA, Â.D.; BRANDENBURG, A. (Orgs). Curitiba: **Ed. da UFPR.**, 1998.

WEBER, R.; BRYAN, R.T.; BISHOP, H.S.; WAHIQUIST, S.P.; SULLIVAN, J.J. & JURANEK, D.D.. Threshold of detection of *Cryptosporidium* oocysts in human stool specimens: evidence for low sensitivity of current diagnostic methods. **J. Clin. Microbiol.** 29:1323-1327, 1991.

WEIR, S.C.; POKORNY, N.J.; CARRENO, R.A.; TREVORS, J.T.; LEE, H.. Efficacy of common laboratory disinfectants on the infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in cell culture. **Appl. Environ. Microbiol.** v.68, n.5, p.2576-2579, 2002.

WIREMAN, M.; JOB, C.. Determining the risk to public water supply wells from infective microorganisms. **W. Well. J.** March:63-67, 1998.

WRIGHT, S.G., TOMKINS, A.M.; RIDLEY, D.S.. Giardiasis clinical and therapeutic aspects. **Gut.** v.18, p.343-350, 1977.

XIAO, L. & HERD, R.P.. Quantitation of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in fecal samples by Direct Immunofluorescence Assay. **J. Clin. Microbiol.** p.2944-2946, 1993.

XIAO, L.; SINGH, A.; LIMOR.; GRACZYK, T.K.; GRADUS, S.; LAL, A.. Molecular characterization of *Cryptosporidium* oocysts in samples of raw surface water and wastewater. **Appl. Environ. Microbiol.** p.1097-1101, 2001.

XUNDE, LI.; EDWARD, R.A.; LISSA, A.D.; TED JONES; JIMMY, H.; KENNETH, W.T.. Seasonal temperature fluctuations induces rapid inactivation of *Cryptosporidium parvum*. **Environ. Sci. Technol.** v.39, p. 4484-4489, 2005.

YAKUB, G.P. & STADTERMAN, K.L.. Evaluation of immunomagnetic separation for recovery of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* from high-iron matrices. **Appl. Environ. Microbiol.** v.66, n.8, p.3628-3631, 2000.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R.; COSTA, H.. Controle de doenças de plantas – Hortaliças. **Sup. Graf. Ed.** Viçosa MG.. v.2, 2000.

ZU, SX.; LI, JF.; BARRETT, LJ.; FAYER, R.; SHU, SY.;McAULIFFE, JF.; ROCHE, JK.; GUERRANT, R.. Seroepidemiologic study of *Cryptosporidium* infection in children from rural communities of Anhui, China and Fortaleza, Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.51, n.1, p.1-10, 1994.

Anexos

Anexo 1: Inquérito Epidemiológico: características das UPAs – Unidades de Produção

Agrícola

INQUÉRITO EPIDEMIOLÓGICO

Data da entrevista: ____/____/____

Propriedade n°: _____

Tipo de propriedade: _____ Área total (ha): _____

Nome da propriedade: _____

Endereço: _____

Município: _____

Nome do proprietário: _____ Telefone: _____

Número de trabalhadores: _____ Tipo de trabalhador: () fixo () temporário

Número de moradores: _____ Tempo de residência nesta área: _____

1. Características das propriedades:

1.1. Tipo de adubação usada na propriedade:

() orgânica () química

1.2. Tipo de irrigação usada na propriedade:

() superficial () aspersão () localizada

1.3. Tipo de captação de água para a irrigação:

() manancial () nascente local

() poço () poço artesiano

() açude () outra

() tanque

2. Presença de animais na propriedade:

() sim () não

Quais? () cães () bovinos () suínos () eqüinos ()
aves

Outros: _____

() jogado em terreno baldio () jogado em corpo d'água () outro

5. Tipo de abastecimento de água da propriedade:

Com canalização interna: () rede geral () poço ou nascente

Sem canalização interna: () rede geral () poço ou nascente

Outra forma: _____

5.1. Existência de reservatório (caixa) de água na propriedade? () sim () não

Localização: _____

Estado geral (aspecto): _____

Cobertura (que tipo)? _____

Em relação ao relevo: () baixo () alto

5.2. Algum curso d'água passa na propriedade?

() sim () não

Qual? _____

5.3. A área cultivada está sujeita a inundações/enchentes?

() sim () não

5.4. Presença de lixão ou similar próximo? () sim () não

6. Indivíduos mantêm contato direto com os alimentos produzidos na propriedade ?

() sim () não

Em que situação? _____

Onde? () residência () horta () lavoura (manipulação) () escola

7. Os vegetais após colheita são lavados? () sim () não

Qual a origem da água _____

Armazenada em reservatório? () sim () não

Qual o tipo de reservatório? _____

Possui cobertura (que tipo)? _____

Qual a periodicidade de troca desta água? _____

Observações: _____

Anexo 2: Autorização dos indivíduos para realização dos estudos epidemiológicos

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO DOS INDIVÍDUOS QUE PARTICIPARÃO DO INQUÉRITO EPEDEMIOLÓGICO.

Pela presente concordo em participar de um estudo realizado na UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS – Unicamp, que tem por objetivo avaliar a ocorrência de protozoários parasitas em hortaliças, sua relação com os trabalhadores (moradores, funcionários fixos e temporários) e com a área agrícola, nas propriedades rurais da região metropolitana de Campinas.

Este estudo está sob a responsabilidade da aluna de pós-graduação Mirna Aparecida Pereira, podendo encontrá-la no telefone 3788-7651, Departamento de Parasitologia, IB da UNICAMP.

Participo de livre e espontânea vontade, sabendo que caso não desejasse participar do estudo não haveria nenhum tipo de prejuízo para mim ou meus familiares.

Participo deste estudo sabendo que as pessoas da minha família, inclusive os menores de idade, por meio de entrevistas e inquéritos forneceremos informações sobre as condições sanitárias vigentes da propriedade ocupada descrevendo a qualidade das instalações sanitárias dessas propriedades e das condições sócio-culturais minha e de meus familiares.

Nome do agricultor e data da entrevista

Anexo 3. Ordem do sorteio para investigação das UPAs – Unidades de Produção

Agrícola

ORDEM DO SORTEIO PARA INVESTIGAÇÃO DAS UPAs – UNIDADES DE PRODUÇÃO AGRÍCOLA							
1º PERÍODO		2º PERÍODO		3º PERÍODO		4º PERÍODO	
Nº	Propriedade agrícola	Nº	Propriedade agrícola	Nº	Propriedade agrícola	Nº	Propriedade agrícola
I	Sítio São Benedito	IX	Chácara Pazetti	XIV	Sítio Monte Azul	IX	Chácara Pazetti
II	Chácara São Pedro	VII	Horta Do Lima	I	Sítio São Benedito	XIII	Horta José Franco
III	Sítio Mendonça	I	Sítio São Benedito	XIII	Horta José Franco	XV	Sítio Santa Beatriz
IV	Sítio São Francisco	XIV	Sítio Monte Azul	III	Sítio Mendonça	VI	Sítio Boa Esperança
V	Sítio Regina	XII	Sítio Jatobá	VII	Horta Do Lima	XII	Sítio Jatobá
VI	Sítio Boa Esperança	VIII	Horta Do Edinho	VIII	Horta Do Edinho	VII	Horta Do Lima
VII	Horta Do Lima	V	Sítio Regina	V	Sítio Regina	VIII	Horta Do Edinho
VIII	Horta Do Edinho	VI	Sítio Boa Esperança	X	Chácara Boa Esperança	X	Chácara Boa Esperança
IX	Chácara Pazetti	XIII	Horta José Franco	XII	Sítio Jatobá	XIV	Sítio Monte Azul
X	Chácara Boa Esperança	IV	Sítio São Francisco	IX	Chácara Pazetti	III	Sítio Mendonça
XI	Horta Assentamento I	III	Sítio Mendonça	IV	Sítio São Francisco	IV	Sítio São Francisco
XII	Sítio Jatobá	X	Chácara Boa Esperança	XI	Horta Assentamento I	I	Sítio São Benedito
XIII	Horta José Franco	XV	Sítio Santa Beatriz	VI	Sítio Boa Esperança	V	Sítio Regina
XIV	Sítio Monte Azul	XI	Horta Assentamento I	II	Chácara São Pedro	II	Chácara São Pedro
XV	Sítio Santa Beatriz	II	Chácara São Pedro	XV	Sítio Santa Beatriz	XI	Horta Assentamento I

ANEXO 4

Informações		Prop. 1	Prop. 2	Prop. 3	Prop. 4	Prop. 5	Prop. 6	Prop. 7	Prop. 8
Número de trabalhadores		2	2	2	5	5	4	5	8
Número de moradores		10	4	8	12	4	5	12	15
Tempo de residência nesta área		3 anos	30 anos	20 anos	50 anos	10 anos	40 anos	15 anos	50 anos
Tipo de trabalhador	Fixo						x	x	x
	temporário	x	x	x	x	x	x		
1. Característica das propriedades									
1.1 Adubação da propriedade	Orgânica	x	x	x	x	x	x	x	x
	Química	x	x	x	x	x	x	x	x
1.2 Tipo de irrigação usada	Superficial								
	Aspersão	x	x	x	x	x	x	x	x
	Localizada								
1.3 Tipo de captação de água para a irrigação	Manancial								
	Poço								
	Açude								
	Tanque	x	x	x	x	x		x	x
	Nascente local								
	Poço Artesiano						x		

	Outra								
2. Presença de animais									
2.1 Existem?	Sim	x	x	x	x	x	x	x	x
	Não								
2.1 Quais?	Cães	x	x	x	x	x	x	x	x
	Bovinos								
	Suínos								
	Eqüinos								
	Aves	x			x			x	
3. Instalações									
3.1 Instalações para confinamento	Sim								
	Não	x	x	x	x	x	x	x	x
3.2 Outras Edificações	Estábulo								
	Cocheira para eqüinos								
	Galinheiro	x			x	x		x	
	Pocilga					x			
	Silo								
	Barracão aberto	x	x	x	x		x		x
	Galpão	x	x	x	x	x	x	x	x
	Casa de moradia habitada	x	x	x	x	x	x	x	x
	Casa de moradia abandonada								

	Casa própria				X	X			
	casa arrendada	X							
3.3 Delimitador de propriedade	Muro								
	Cerca de arame	X	X	X	X	X	X	X	X
	Nenhum								
4. Tipo de instalação sanitárias na propriedade									
4.1 Instalações sanitárias	Rede geral			X		X	X	X	X
	Vala negra								
	Fossa séptica	X			X				
	Outra		X						
	Não Tem								
4.2 Uso das instalações sanitárias	Só no domicílio		X	X					
	Comum a todos os trab.	X			X	X		X	X
	não tem						X		
	Só no domicílio e não utiliz. pelos trabalhadores								
4.3 Destino do esgoto	Encanado			X		X	X	X	X
	Céu aberto								
	Fossa negra		X						
	Fossa séptica	X			X				

4.4 Destino do lixo	Coletado					x			
	Queimado	x	x	x	x		x	x	x
	Enterrado	x	x	x				x	
	Jogado em terreno baldio								
	Jogado em corpo d'água								
	Outro								
5. Tipo de abastecimento de água da propriedade									
5.1 Com canalização interna	Rede geral		x			x		x	x
	Poço ou nascente	x		x	x		x		
5.2 Sem canalização interna	Rede geral								
	Poço ou nascente								
5.3 Existência de reservatório (caixa) de água na propriedade	Sim	x	x	x	x	x	x	x	x
	Não								
5.4 Localização do reservatório	Próxima a residência	x	x	x	x	x	x	x	x
	Longe da residência								
5.5 Estado geral do reservatório	Regular	x	x	x	x	x	x	x	x
	Irregular								
5.6 Possui cobertura	Sim	x	x	x	x	x	x	x	x
	Não								

6. Sobre o relevo									
6.1 Passa curso d'água na propriedade?	Sim				x		x		x
	Não	x	x	x		x		x	
6.2 Área sujeita a inundações ou enchentes?	Sim			x					
	Não	x	x		x	x	x	x	x
6.3 Presença de lixão ou similar próximo?	Sim			x		x	x		
	Não	x	x		x			x	x
6.4 Indivíduos mantém contato direto com os alimentos produzidos na propriedade	Sim	x	x	x	x	x	x	x	x
	Não								
6.5 Em que situação?	Produção	x	x	x	x	x	x	x	x
	Armazenamento								
	Transporte								
7. Características sobre o vegetal após a colheita									
7.1 São lavados?	Sim	x	x	x	x	x	x	x	x
	Não								
7.2 Origem da água da lavagem	Nascente	x	x	x	x		x	x	x
	Rede Geral					x			

7.3 Armazenada em reservatório	Sim	x	x	x	x	x	x	x	x
	Não								
7.4 Tipo do reservatório	Caixa de amianto	x	x	x	x	x	x	x	x
7.5 Possui cobertura	Sim		x	x			x	x	x
	Não	x			x	x			
7.6 Periodicidade de troca desta água	1 dia	x	x	x	x	x	x		
	2 dias								
	3 dias							x	x
	5 dias								

Informações		Prop. 9	Prop. 10	Prop. 11	Prop. 12	Prop. 13	Prop. 14	Prop. 15	Quant	Média
Número de trabalhadores		4	8	7	6	8	6	8	80	10
Número de moradores		0	10	0	0	12	12	15	119	7,93
Tempo de residência nesta área		4 anos	21 anos	22 anos	4 anos	20 anos	10 anos	30 anos		25,27 an
Tipo de trabalhador	Fixo					x	x		5	33%
	Temporário	x	x	x	x	x		x	12	80%
									0	0
1. Característica das propriedades									0	0
									0	0
1.1 Adubação da	Orgânica	x	x	x	x	x	x	x	15	100%

propriedade	Química	x	x	x	x	x	x	x	15	100%
									0	0
1.2 Tipo de irrigação usada	Superficial								0	0
	Aspersão	x	x	x	x	x	x	x	15	100%
	Localizada								0	0
									0	0
1.3 Tipo de captação de água para a irrigação	Manancial								0	0
	Poço								0	0
	Açude								0	0
	Tanque	x	x	x	x	x	x		13	86,60%
	Nascente local								0	0
	Poço Artesiano							x	2	13,30%
	Outra								0	0
									0	0
2. Presença de animais									0	0
									0	0
2.1Existem?	Sim	x	x		x	x	x	x	14	93,30%
	Não			x					1	6,60%
									0	0
2.1 Quais?	Cães	x	x		x	x	x	x	14	93,30%
	Bovinos								0	0
	Suínos		x						1	6,00%
	Eqüinos								0	0
	Aves					x			4	26,60%
									0	0
3. Instalações									0	0
									0	0

3.1 Instalações	Sim								0	0
para confinamento	Não	x	x	x	x	x	x	x	15	100%
									0	0
3.2 Outras Edificações	Estábulo								0	0
	Cocheira para equinos								0	0
	Galinheiro					x			5	33,30%
	Pocilga		x						2	13,30%
	Silo								0	0
	Barracão aberto		x		x	x	x	x	11	73,30%
	Galpão	x	x	x	x	x	x	x	15	100%
	Casa de moradia habitada		x			x	x	x	12	80,00%
	Casa de moradia abandonada								0	0
	Casa própria								2	13,30%
	casa arrendada								1	6,6%
									0	0
3.3 Delimitador	Muro								0	0
de propriedade	Cerca de arame	x	x	x		x		x	13	86,60%
	Nenhum				x		x		2	13,30%
									0	0
4. Tipo de instalação sanitárias									0	0
na propriedade									0	0
									0	0
4.1 Instalações sanitárias	Rede geral					x		x	7	46,60%
	Vala negra								0	0,00%
	Fossa séptica		x	x		x			5	33%
	Outra				x				2	13,3
	Não Tem	x							1	6%

									0	0
4.2 Uso das instalações sanitárias	Só no domicílio					x	x	x	5	33,30%
	Comum a todos os trab.		x	x	x				8	53,30%
	não tem	x							2	13,30%
	Só no domicílio e não utiliz.								0	0
	pelos trabalhadore								0	0
									0	0
4.3 Destino do esgoto	Encanado					x		x	7	47%
	Céu aberto	x							1	6%
	Fossa negra				x				2	13,30%
	Fossa séptica		x	x			x		5	33,30%
									0	0
4.4 Destino do lixo	Coletado			x		x		x	4	26,60%
	Queimado		x		x		x		10	67%
	Enterrado						x		5	33,30%
	Jogado em terreno baldio	x							1	6,60%
	Jogado em corpo d'água								0	0
	Outro								0	0
									0	0
5. Tipo de abastecimento de água da propriedade									0	0
									0	0
5.1 Com canalização interna	Rede geral					x	x		6	40,00%
	Poço ou nascente			x				x	6	40,00%
									0	0
5.2 Sem canalização interna	Rede geral								0	0
	Poço ou nascente	x			x				2	13,30%
									0	0

5.3 Existência de reservatório	Sim					x	x	x	11	73,30%
(caixa) de água na propriedade	Não	x	x	x	x				4	26,60%
									0	0
5.4 Localização do reservatório	Próxima a residência					x	x	x	11	73,30%
	Longe da residência								0	0
									0	0
5.5 Estado geral do reservatório	Regular					x	x	x	11	73,30%
	Irregular								0	0
									0	0
5.6 Possui cobertura	Sim					x	x	x	11	73,30%
	Não			x	x				2	13,30%
									0	0
6. Sobre o relevo									0	0
									0	0
6.1 Passa curso d'água na propriedade?	Sim	x	x					x	7	46,60%
	Não			x	x	x			8	53,30%
									0	0
6.2 Área sujeita a inundações ou enchentes?	Sim					x			2	13,30%
	Não	x	x	x	x			x	13	86,60%
									0	0
6.3 Presença de lixo ou similar próximo?	Sim								3	20%
	Não	x	x	x	x	x	x	x	12	80%
									0	0
6.4 Indivíduos mantêm contato direto com os alimentos produzidos na propriedade	Sim	x	x	x	x	x	x	x	15	100%
	Não								0	0
									0	0

6.5 Em que situação?	Produção	x	x	x	x	x	x	x	15	100%
	Armazenamento						x		1	6,60%
	Transporte						x		1	6,60%
									0	0
7. Características sobre o vegetal após a colheita									0	0
									0	0
7.1 São lavados?	Sim	x	x	x	x	x	x	x	15	100%
	Não								0	0
									0	0
7.2 Origem da água da lavagem	Nascente	x	x	x	x			x	12	80%
	Rede Geral					x	x		3	20%
									0	0
7.3 Armazenada em reservatório	Sim	x	x	x	x	x	x	x	15	100%
	Não								0	0
									0	0
7.4 Tipo do reservatório	Caixa de amianto	x	x	x	x	x	x	x	15	100%
									0	0
7.5 Possui cobertura	Sim				x	x		x	8	53%
	Não	x	x	x			x		7	46%
									0	0
7.6 Periodicidade de troca desta água	1 dia							x	7	46%
	2 dias		x		x	x			3	20%
	3 dias	x					x		4	26,60%
	5 dias			x					1	6%