

160

Circular  
Técnica

Brasília, DF  
Setembro, 2017

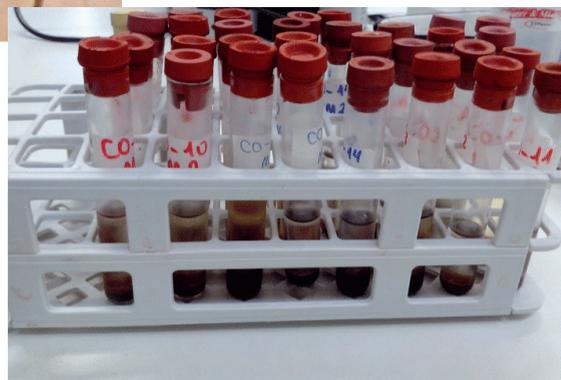
## Autores

Iriani Rodrigues Maldonado  
Engenheira de alimentos,  
doutora em Ciência de  
Alimentos, pesquisadora  
na Embrapa, Brasília, DF

Eleuza Rodrigues Machado  
Bióloga, doutora em  
Parasitologia, professora  
da Faculdade Anhanguera  
de Brasília, Brasília, DF

## Protocolo para determinação de enteroparasitos em hortaliças

Fotos: Eleuza Rodrigues Machado



As parasitoses intestinais são consideradas um grave problema de saúde pública com ampla distribuição em áreas urbanas e rurais, principalmente nos países em desenvolvimento, devido às condições de saneamento básico deficiente e a má educação sanitária, sendo um dos fatores debilitantes da população (COOPER et al., 2006).

A maioria das enteroparasitoses é assintomática, porém, nos casos sintomáticos podem provocar desnutrição e obstrução intestinal, levando muitas crianças ao óbito como *Ascaris lumbricoides* (LI et al., 2014), anemia por deficiência de ferro e prolapso retal, devido às infecções por Ancilostomídeo e *Trichura trichiura* (ZEEHAIDA et al., 2015) respectivamente, além de abscesso extraintestinal, diarreia e má absorção de nutrientes como por *Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia* (THAMIZHMANI et al., 2017). Na maioria dos casos, essas manifestações são proporcionais à carga parasitária, a intensidade e a duração da infecção, porém em indivíduos imunossuprimidos, crianças e idosos, mesmo com baixas cargas parasitárias podem gerar doenças graves e levá-los a óbito (BRASIL, 2005; TULU et al., 2016).

Dentre as principais vias de infecção para essas enteroparasitoses, destacam-se o consumo de alimentos como as frutas e hortaliças contaminadas, com formas evolutivas de parasitos. Assim, a ingestão de hortaliças mal higienizadas é um dos principais fatores de riscos para infecção humana e animais com parasitoses intestinais. Apesar das hortaliças *in natura* terem grande valor nutricional para a saúde pública, elas podem constituir, uma das principais via de transmissão de enteroparasitos ao homem, devido à presença de cisto, ovos e larvas infectivas de helmintos nelas (SILVA et al., 2014).

A hortaliça pode ser contaminada durante as várias etapas da cadeia produtiva, desde a manipulação delas pelos agricultores nos locais de cultivo até por funcionários responsáveis pela reposição nos pontos de comercialização. Porém, a principal via de transmissão de parasitos intestinais deve-se à água utilizada na irrigação e/ou solo contaminado por adubos com dejetos fecais de humanos ou de animais (ESTEVES; FIGUEIRÔA, 2009; KRAUSE et al., 2017).

Dois enteroparasitos, *G. lamblia* e *E. histolytica*, são muito frequentes no homem. Eles apresentam duas formas evolutivas: trofozoítos e cisto. Ambos causam diarreia, desnutrição e perda de peso, sendo mais comuns em crianças (FRANCO; CORDEIRO, 1996). Esses parasitos podem ser transmitidos pela ingestão de água e alimentos contaminados por cistos, que também são veiculados por insetos (moscas e baratas) e roedores, podendo passar sobre os alimentos contaminando-os (RIVERA et al., 2002). No caso de infecções por *E. histolytica*, a doença pode ser severa e levar o indivíduo a morte, sendo a segunda causa de morte por enteroparasitoses (REY, 2008). As amebas parasitam o tecido do hospedeiro provocando necrose e, em outros casos, apresenta amebíase intestinal crônica, apendicite amebiana e amebíase hepática (PATRÍCIO et al., 2014).

Ascariíase é causada pelo helminto *A. lumbricoides*. A infecção do homem ocorre pela ingestão de ovos presentes na água, no solo, e alimentos. As larvas são liberadas no intestino delgado, de onde atravessam as paredes intestinais, caem na circulação sanguínea, alcançando o coração, pulmões, podendo ser liberadas para o meio ambiente no escarro, ou serem deglutidas alojando-se no intestino delgado, aonde se transformam em machos e fêmeas (NEVES, 2012). As manifestações mais comuns dessa parasitose são decorrentes de problemas intestinais e pulmonares como dor epigástrica, má digestão, vômitos, sono inquieto, perda de apetite e sensação de coceira no nariz. Nessa parasitose podem ocorrer casos de complicações como obstrução intestinal, deficiências nutricionais e pneumonite, podendo ser fatais (INNOCENTE et al., 2009).

*Necator americanus* e *Ancylostoma duodenale* são helmintos intestinais que causam a doença conhecida por amarelão, devido à anemia intensa

que os indivíduos infectados apresentam (REY, 2008). As formas adultas desses parasitos habitam o intestino delgado, onde se fixam e fazem espoliação, nutrindo-se do sangue do hospedeiro. A infecção ocorre quando as larvas infectivas penetram a pele do indivíduo, quando estes entram em contato com o solo contaminado com larvas (REY, 2008; NEVES et al., 2012; LOUKAS et al., 2016).

Outro helminto de importância na saúde pública, cuja infecção ocorre via penetração ativa de larvas infectivas na pele ou mucosa da pessoa, é o *Strongyloides stercoralis*. Esse nematoda, em pacientes com imunidade baixa, pode causar infecções generalizadas, cujas larvas e vermes adultos podem ser encontrados em todos os órgãos. A estrogilodíase, caso não seja diagnosticada e tratada adequadamente, pode levar mais de 50% dos indivíduos ao óbito (MACHADO; COSTA-CRUZ, 1998).

As larvas infectivas dos ancilostomídeos e de *S. stercoralis* podem contaminar água e verduras e serem ingeridas pelas pessoas, que se infectarão, através da penetração ativa das larvas na mucosa oral e intestinal, fechando o ciclo evolutivo deles (REY, 2008).

O diagnóstico de enteroparasitos em hortaliças é de grande importância para a saúde pública, pois fornece dados sobre a falta de condições higiênicas e sanitárias durante a produção, armazenamento, transporte e manuseio desses produtos, sendo um fator de risco para os consumidores (SILVA et al., 2005; AMOAH et al., 2017). A padronização das análises é de grande importância, a fim de que estas análises sejam realizadas da mesma forma, para padronização de procedimentos. Tendo um protocolo, o grau de contaminação de diferentes produtos poderá ser comparado mais eficazmente. Além, disso será uma ferramenta que a ANVISA poderá usar para realizar o controle de qualidade das hortaliças que estão sendo comercializadas no Brasil. Neste contexto, através do projeto CNPq/ANVISA N° 23/2012, foram realizados ensaios com a finalidade de se padronizar um protocolo nacional.

O objetivo desse protocolo é divulgar uma metodologia já descrita na literatura com modificações para determinação de enteroparasitos em amostras de hortaliças, e mostrar a importância da padronização e implantação dela na rotina de

Laboratórios de Microscopia de Alimentos. Portanto, eles não foram padronizados para esse tipo de trabalho.

## Metodologia

O exame para diagnóstico de enteroparasitos em hortaliças será o método modificado de sedimentação espontânea (REY, 2008; NEVES, 2012). Por esse método é possível identificar cistos de protozoários, ovos e larvas de helmintos. No entanto, os procedimentos da etapa de lavagem dependerão do tipo de hortaliças a ser analisada: folhosa, fruto, tubérculo e hortaliças minimamente processadas.

## Coleta das amostras de hortaliças

As hortaliças devem ser coletadas no campo de produção ou no ponto de venda, fazendo-se uso de luvas cirúrgicas, e acondicionadas em sacos plásticos estéreis, identificadas e armazenadas em caixas térmicas em temperatura refrigerada. A amostragem deve ser feita com pelo menos cinco unidades colhidas, aleatoriamente, em um determinado canteiro, segundo esquema de coleta de amostra em zig-zag (MALDONADE; GUIMARÃES, 2017) ou nas gôndolas dos mercados. Essas amostras devem ser encaminhadas ao Laboratório de parasitologia para análises parasitológicas. Se não forem processadas de imediato, elas devem ser mantidas refrigeradas a 4°C, até serem analisadas.

## Lavagem das hortaliças

Esta etapa é muito importante para este tipo de análise, pois é na água da lavagem que os ovos e larvas dos parasitos serão recolhidos. O procedimento da lavagem deve ser feito usando água limpa e filtrada, e as superfícies das hortaliças escovadas, usando uma escova limpa para remoção dos cistos de protozoários e as larvas e ovos dos helmintos.

### Hortaliças frutos/tubérculos

Para hortaliças frutos e tubérculos são necessárias pelo menos cinco unidades amostrais (NEUSELY et al., 2010), que devem ser obtidas de cada amostra

representativa de uma população, realizadas no campo ou nos pontos de vendas.

Em seguida, efetuar a lavagem das hortaliças frutos (morangos, berinjela, e tomate) ou tubérculos (batata) utilizando-se uma cuba de vidro, com uma pisseta contendo 250 mL de água destilada. A amostra deve ser exaustivamente escovada usando um pincel ou escova (Figura 1). Em seguida, os frutos pré-lavados devem ser enxaguados com 50 mL de água destilada, totalizando 300 mL de água destilada para cada hortaliça frutos lavados. Após esse procedimento, o líquido resultante da lavagem deve ser colocado em cálices para sedimentação por 24 horas (sedimentação espontânea). Após esse período, o líquido sobrenadante deve ser descartado, deixando 5 mL do sedimento, que serão coletados e acondicionados em tubo de 15 mL, e mantidos em temperatura de 4°C, até o momento das análises, usando microscópio óptico (M.O.), com objetivas de 20 e 40x (item 3.0).

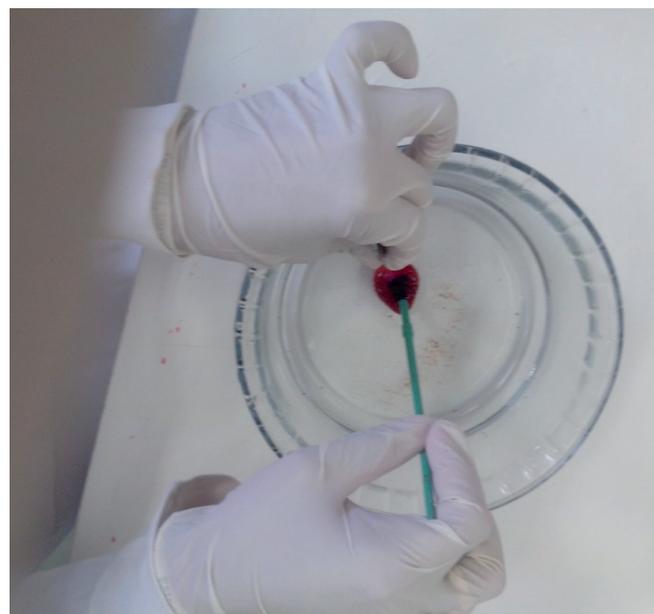


Foto: Eleuza Rodrigues Machado

**Figura 1.** Lavagem do morango com água destilada usando um pincel. O líquido resultante dessa lavagem é usado para o diagnóstico parasitológico.

### Hortaliças folhosas

As folhas devem ser cuidadosamente lavadas com água destilada, com um pincel ou escova de cerdas macias, com 300 mL de água destilada. O líquido resultante da lavagem deve ser coletado para ser analisado após 24 h de sedimentação.

Após este período, o líquido sobrenadante deve ser descartado, enquanto 5 mL do sedimento serão coletados e acondicionados em tubo de 15 mL, em temperatura de 4°C, até o momento das análises, usando microscópio óptico (M.O.), objetivas de 10 e 40x (item 3.0).

### Hortaliças folhosas minimamente processadas

No caso de hortaliças folhosas minimamente processadas, a amostragem deve ser composta por pelo menos cinco embalagens da hortaliça, cuja amostra final será formada por 200 g (NEUSELY et al., 2010). As folhas da amostra deverão ser acondicionadas em saco plástico, onde serão adicionados 200 mL de solução aquosa contendo detergente neutro 1,0% (v/v), o qual deverá ser agitado por 1 minuto (homogeneizador *Stomacher*). As amostras devem ser mantidas nesse líquido por 30 minutos. Após esse período, a solução deve ser filtrada e reservada, sendo que as folhas processadas devem ser enxaguadas com 100 mL de água destilada. Os líquidos resultantes (300 mL) da lavagem (solução filtrada e reservada) e do enxágue dessas amostras serão analisados, usando um M.O., após a sedimentação espontânea (item 3.0).

### Sedimentação espontânea

O líquido oriundo da lavagem das hortaliças será filtrado com uso de gazes em cálices (Figura 2). Após a filtragem, os cálices contendo os líquidos devem ser mantidos em temperatura ambiente por um período de 18 a 24 horas para sedimentação.



Foto: Eleuza Rodrigues Machado

**Figura 2.** Método de sedimentação espontânea usado nas lavagens de hortaliças.

Findo esse tempo, o sobrenadante deve ser desprezado, enquanto que 5 mL do sedimento serão acondicionados em tubos de 15 mL, onde serão adicionados 3,0 mL de formol a 10%. Esses devem ser mantidos em temperatura de 4°C até o momento das análises.

No momento da análise das amostras, 3,0 mL do sobrenadante devem ser descartados, deixando 5,0 mL do sedimentado, que serão usados para o diagnóstico das formas evolutivas de enteroparasitos, conforme descrito na literatura (SILVA et al., 2014).

### Leitura das amostras

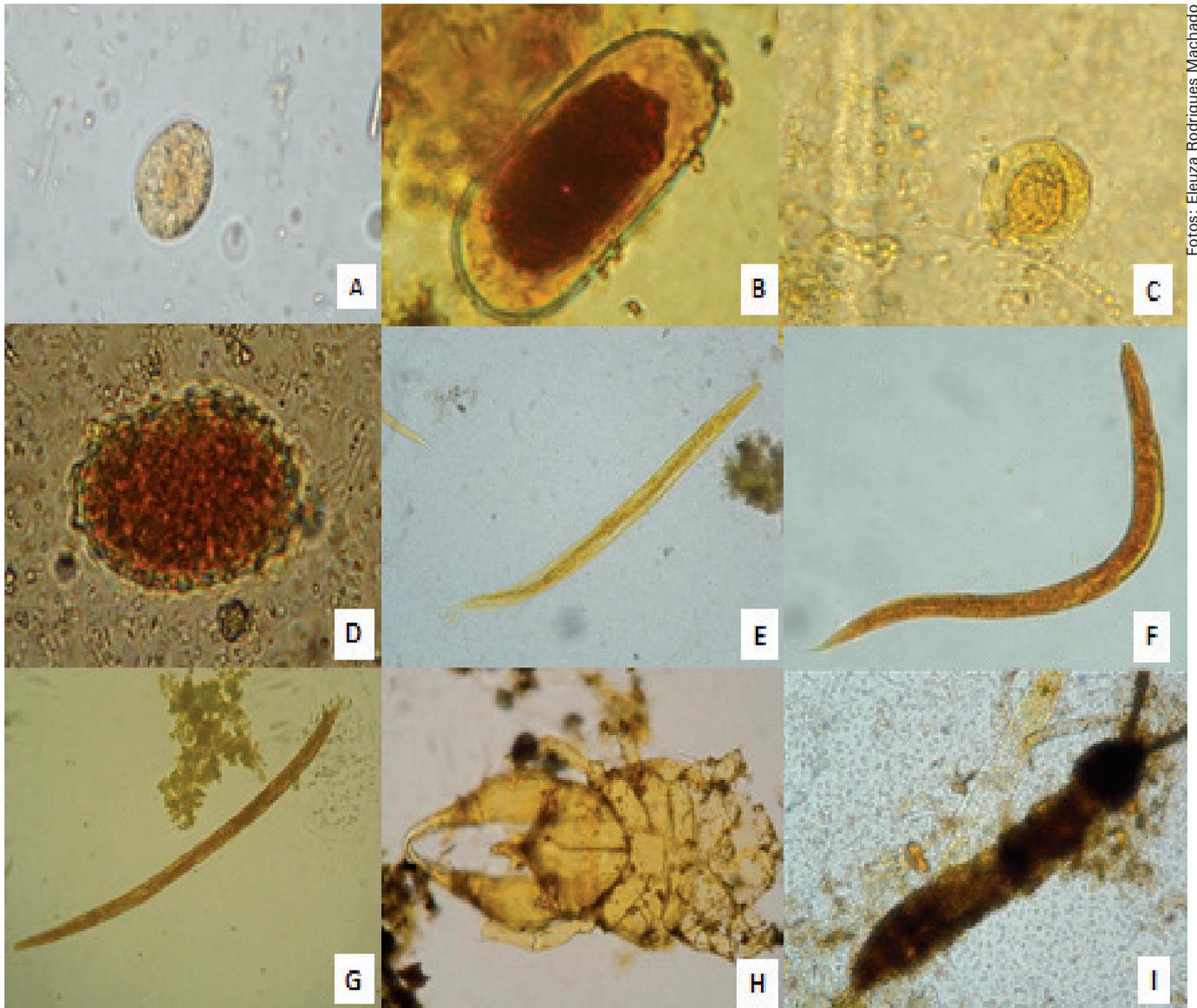
Aproximadamente 5,0 mL do sedimento das amostras devem ser analisadas para assegurar um bom diagnóstico. Frações das amostras do sedimento obtidas devem ser depositadas sobre lâminas microscópicas e em seguida coradas com uma gota de lugol e cobertas com lamínulas. As leituras devem ser realizadas em microscópio óptico, com objetivas de 20x e 40x para observação das formas evolutivas de enteroparasitos protozoários e helmintos, além de espécimes de artrópodes. Os 5,0 mL do sedimento devem ser examinados por esgotamento.

### Fotos para identificação de enteroparasitos

Para identificação das formas evolutivas dos parasitos, recomenda-se utilizar como referência livros (REY, 2008; NEVES, 2012) e Atlas (DE CARLI, 2001) para auxiliar na comparação e identificação entre as amostras analisadas no microscópio e as fotos ou imagens da referência adotada. Hoje em dia, existem vários atlas de parasitologia disponíveis eletronicamente, o que facilita a identificação de ovos e larvas de parasitos humanos.

A Figura 3 apresenta imagens microscópicas registradas dos principais enteroparasitos encontrados em hortaliças folhosas minimamente processadas, que foram analisadas da região do Distrito Federal, Brasil.

As etapas dos procedimentos das análises estão representadas no fluxograma das Figuras 4 e 5.



Fotos: Eleuza Rodrigues Machado

Figura 3. Imagens microscópicas de enteroparasitos encontrados em hortaliças folhosas minimamente processadas. Cisto de *Entamoeba* sp. (A), ovos e larvas (B, E e D) e macho de Ancylostomidae (G) respectivamente, Ovos (C e D) de nematodae, Ácaro (H) e mosquito (I). Coloração pelo lugol. Diagnóstico usando Microscópio óptico (objetiva 20x).

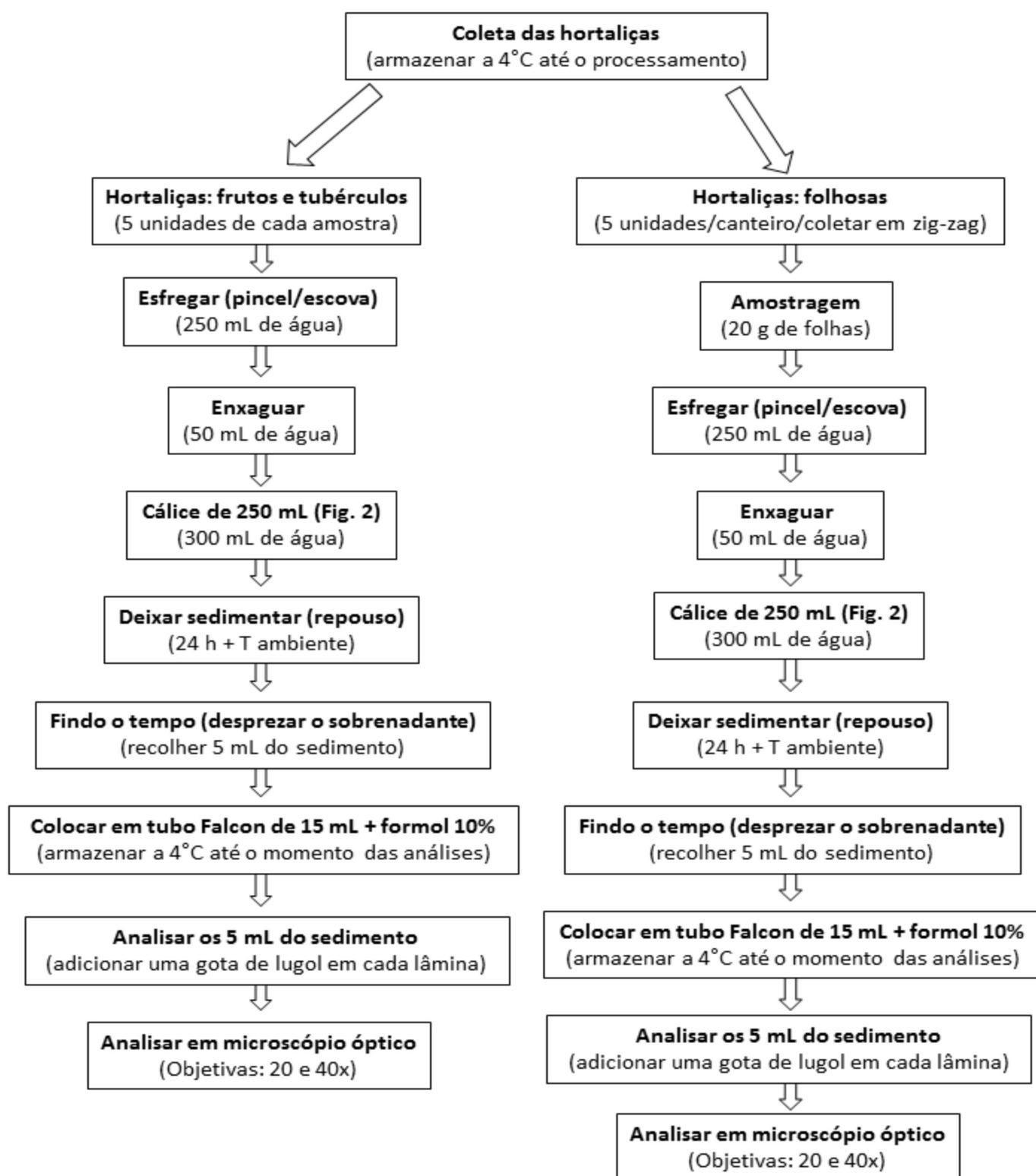


Figura 4. Fluxograma das etapas das análises de enteroparasitos em hortaliças frutos, tubérculos e folhosas.

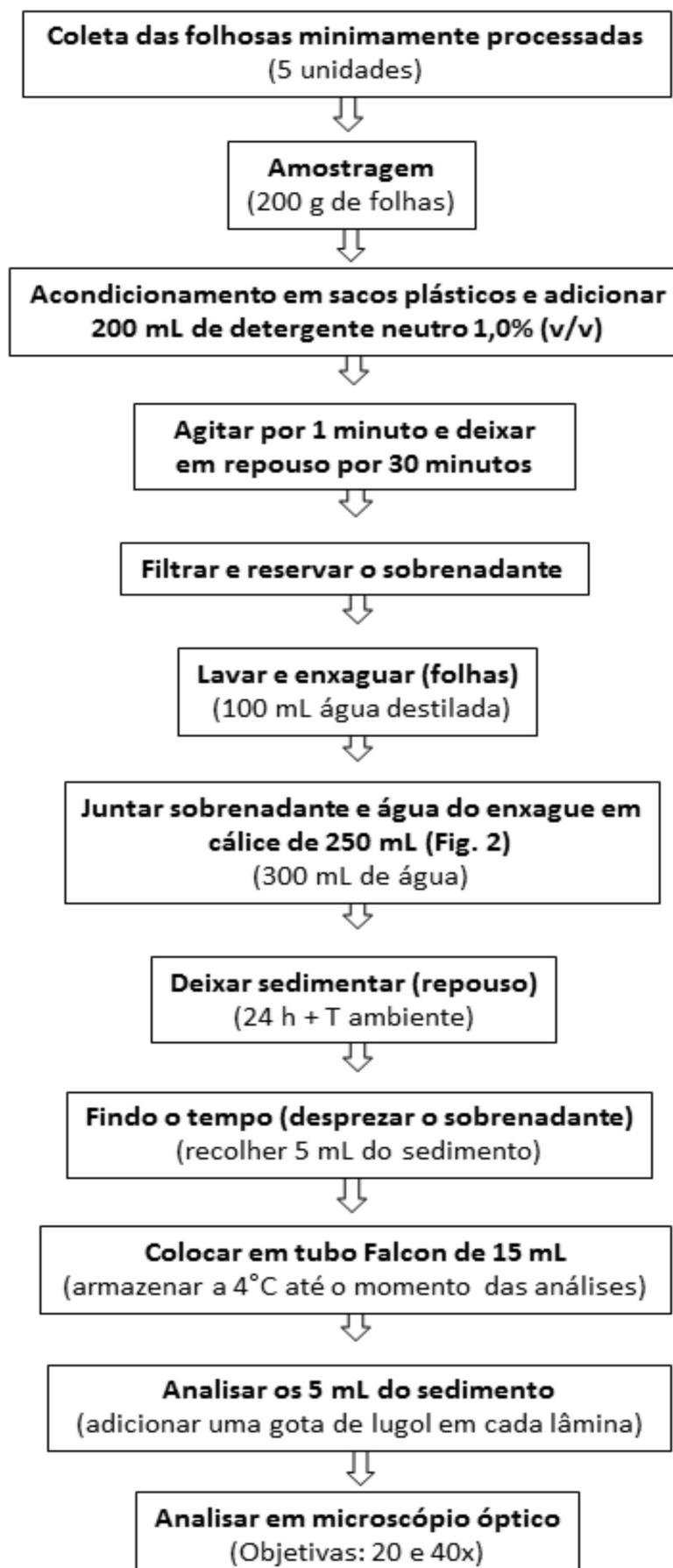


Figura 5. Fluxograma das etapas das análises de enteroparasitos em hortaliças minimamente processadas.

## Referências

- AMOAHA, I. D.; SINGH, G.; STENSTRÖM, T. A.; REDDY, P. Detection and quantification of soil-transmitted helminths in environmental samples: A review of current state-of-the-art and future perspectives. **Acta Tropical**, v. 169, p. 187-201, May 2017.
- COOPER, P. J.; BARRETO, M. L.; RODRIGUES, L. C. Human allergy and geohelminth infections: a review of the literature and a proposed conceptual model to guide the investigation of possible causal associations. **British Medical Bulletin**, v. 79/80, n. 1, p. 203-218, June 2006.
- DE CARLI, G. A. **Parasitologia clínica: seleção de métodos e técnicas de laboratório para o diagnóstico das parasitoses humanas**. São Paulo: Atheneu, 2001.
- ESTEVES, M. A. F.; FIGUEIRÔA, O. E. Detecção de Enteroparasitas em Hortaliças Comercializadas em Feiras Livres do Município de Caruaru (PE). **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 33, n. 2, p. 184-193, abr./jun. 2009. Disponível em: < <http://files.bvs.br/upload/S/0100-0233/2009/v33n2/a004.pdf> > Acesso em: 20 nov. 2017.
- FRANCO, R. M.; CORDEIRO, N. da S. Giardíase e criptosporidíose em creches no município de Campinas-SP. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 29, n. 6, p. 585-591, nov./dez. 1996. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&nrm=iso&lng=pt&tlng=pt&pid=S0037-86821996000600010](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&nrm=iso&lng=pt&tlng=pt&pid=S0037-86821996000600010) > Acesso em: 20 nov. 2017.
- INNOCENTE, M.; OLIVEIRA, L. A.; GEHRKE, C. Surto de ascaridíase intradomiciliar em região central urbana, Jacareí, SP, Brasil, junho de 2008. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 62, n. 6, p. 12-16, 2009.
- KRAUSE, R. J.; KOSKI, K. G.; PONS, E.; SANDOVAL, N.; SINISTERRA, O.; SCOTT, M. E. Ascaris and hookworm transmission in preschool children from rural Panama: role of yard environment, soil eggs/larvae and hygiene and play behaviors, **Parasitology**, v. 142, n. 12, p. 1543-54, Oct. 2017.
- LI, Q. Y.; ZHAO, D. H.; QU, H. Y.; ZHOU, C. N. Life-threatening complications of ascariasis in trauma patients: a review of the literature. **World Journal of Emergency Medicine**, v. 5, n. 3, p.165-70, 2014.
- LOUKAS, A.; HOTEZ, P. J.; DIEMERT, D.; YAZDANBAKHS, M.; MCCARTHY, J. S.; CORREA-OLIVEIRA, R.; CROESE, J.; BETHONY, J. M. Hookworm infection. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, p.1-16, 2016.
- MACHADO, E. R.; COSTA-CRUZ, J. M. *Strongyloides stercoralis* and other enteroparasites in children at Uberlândia city, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 2, p. 161-164, mar./abr. 1998.
- MALDONADE, I. R.; GUIMARÃES, J. A. Procedimentos para coleta de amostras de pimentão para análises microbiológicas e de resíduos de agrotóxicos. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2017. (Embrapa Hortaliças. Comunicado Técnico, 116). Disponível em: < <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1069254> > Acesso em: 20 nov. 2017.
- NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11ª ed. São Paulo: Atheneu, 2012.
- PATRÍCIO, C.; AMARAL, .P.; LOURENÇO, J. An uncommon case of hepatopulmonary amoebiasis. **BJM Case Reports**, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4154031/?tool=pubmed> > Acesso em: 20 nov. 2017.
- REY, L. **Bases da parasitologia médica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 84-88, 228, 243, 253.
- RIVERA, M.; PARTE, M. A.; FURTADO, P.; MAGALDI, L.; COLLAZO, M. Giardiasis Intestinal. Mini-Revisión. **The Journal Clinical Investigation**, v. 43, n. 2, p. 19-128, abr. 2002. Disponível em: < [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0535-51332002000200007](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0535-51332002000200007) > . Acesso em: 20 nov. 2017.
- 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. **Ciências da Saúde Coletiva**, v. 10, p. 63-

69, set./dez. 2005. Suplemento. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413-81232005000500009](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232005000500009)>. Acesso em: 20 nov. 2017.

SILVA, S. R. M.; MALDONADE, I. R.; GINANI, V. C.; LIMA, S. A.; MENDES, V. S.; AZEVEDO, M. L. X.; GURGEL-GONCALVES, R.; MACHADO, E. R. Detection of intestinal parasites on field-grown strawberries in the Federal District of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 6, p. 801-805, nov./dez. 2014. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&nrm=iso&lng=pt&tlng=pt&pid=S0037-86822014000600801](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&nrm=iso&lng=pt&tlng=pt&pid=S0037-86822014000600801)>. Acesso em: 20 nov. 2017.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análises microbiológica de alimentos e água**. 4<sup>a</sup> ed. São Paulo: Varela, 2010. p. 15-50.

THAMIZHMANI, R.; SUGUNAN, A. P.; RAMYA, R. P.; VIJAYACHARI, P. Intestinal parasitic infestation among paediatric diarrhoea patients attending hospitals in Port Blair, Andaman and Nicobar Islands. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 41, n. 2, p. 584-589, 2017.

TULU, B.; TAYE, S.; ZENEBE, Y.; AMSALU, E. Intestinal parasitic infections and nutritional status among primary school children in Delo-mena District, South Eastern Ethiopia. **Iran Journal of Parasitology**, v. 11, n. 4, p. 549-558, Oct./Dec. 2016.

ZEEHAIDA, M.; ZUETER, A.; ZAIRI, N. Z.; ZUNULHISHAM, S. *Trichuris* dysentery syndrome: do we learn enough from case studies? **Tropical Biomedicine**, v. 32, n. 3, p. 545-550, 2015.

**Circular  
Técnica, 160**

**Embrapa Hortaliças**

**Endereço:** Rodovia BR-060, trecho Brasília-Anápolis,  
km 9, Caixa Postal 218, CEP 70275-970,  
Brasília-DF,

**Fone:** (61) 3385-9000

**Fax:** (61) 3556-5744

**SAC:** [www.embrapa.br/fale-conosco/sac](http://www.embrapa.br/fale-conosco/sac)

[www.embrapa.br/hortalias](http://www.embrapa.br/hortalias)

**Embrapa**

Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento



1ª edição

1ª impressão (2017): 1.000 exemplares

**Comitê de  
Publicações**

**Presidente:** Jadir Borges Pinheiro

**Editora Técnica:** Mariana Rodrigues Fontenelle

**Secretária:** Gislaíne Costa Neves

**Membros:** Carlos Eduardo Pacheco Lima

Raphael Augusto de Castro e Melo

Ailton Reis

Giovani Olegário da Silva

Iriani Rodrigues Maldonade

Alice Maria Quezado Duval

Jairo Vidal Vieira

Rita de Fátima Alves Luengo

**Expediente**

**Supervisora Editorial:** Caroline Pinheiro Reyes

**Bibliotecária:** Antônia Veras de Souza

**Editoração eletrônica:** André L. Garcia