

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENFERMAGEM DE RIBEIRÃO PRETO

MARIANA FRARI RAGAZZI

Estudo comparativo da qualidade parasitológica e toxicológica entre hortaliças cultivadas com água de reuso e hortaliças comercializadas em Ribeirão Preto - SP.

Ribeirão Preto

2011

MARIANA FRARI RAGAZZI

Estudo comparativo da qualidade parasitológica e toxicológica entre hortaliças cultivadas com água de reuso e hortaliças comercializadas em Ribeirão Preto - SP.

Dissertação apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências, Programa de pós Graduação em Enfermagem em Saúde Pública

Linha de Pesquisa: Saúde Ambiental

Orientador: Profa Dra Susana Inés Segura Muñoz

Ribeirão Preto

2011

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação

Serviço de Documentação em Enfermagem

Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Ragazzi, Mariana Frari

Estudo comparativo da qualidade parasitológica e toxicológica entre hortaliças cultivadas com água de reuso e hortaliças comercializadas em Ribeirão Preto – SP. / Mariana Frari Ragazzi; orientador: Susana Inés Segura-Muñoz. – Ribeirão Preto, 2011.

116 f.

Dissertação (Mestrado) – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2011.

1. Reuso de água. 2. Agricultura. 3. Hortaliças 4. Parasitas. 5. Metais.

Ragazzi, M. F. **Estudo da qualidade parasitológica e toxicológica entre hortaliças cultivadas com água de reuso e hortaliças comercializadas em Ribeirão Preto – SP.** Dissertação apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre na área de concentração Enfermagem em Saúde Pública.

Aprovado em: ____/____/____.

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Dedicatória

Àquele cuja graça me alcançou e cujo amor tem sido meu sustento em todos os dias. A **Jesus Cristo**.

“Porque dele e por meio dele e para ele são todas as coisas. A ele, pois, a glória eternamente. Amém.”

Romanos 11.36.

Aos meus pais, **Wilson e Léa**, pelo amor incondicional, e pelo encorajamento sem o qual seria impossível a concretização deste trabalho.

Ao meu querido noivo e amigo, **Isaac**, por decidir todos os dias estar ao meu lado.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a **Deus**, por sempre dirigir meus passos e não me deixar esmorecer durante a jornada.

Aos meus pais, **Wilson e Léa**, por todo apoio, carinho e dedicação. Por sempre procurarem fazer parte da minha vida de todas as formas. Pai, obrigada por me acompanhar em todas as manhãs de segunda durante esses dois anos, e por me auxiliar nas coletas.

À minha irmã, **Camila**, por ser minha amiga de todas as horas e me ajudar nos momentos difíceis sempre com um sorriso no rosto. E também por me ajudar a revisar as referências!

Ao meu noivo **Isaac**, por sempre me falar o que eu preciso ouvir, por me amar sempre e independentemente de qualquer outra coisa, por ser sempre meu ombro amigo. Obrigada por decidir partilhar sua vida comigo!

À professora **Susana I. Segura Muñoz**, por acreditar em mim e orientar este trabalho. Por ser uma profissional dedicada e zelosa, com quem aprendi muito nos últimos anos.

Aos meus tios **César e Sueli**, e meus primos **Emílio e Alice**. Tios, obrigada por me acolherem em sua casa durante esses dois anos, sempre me incentivando e aconselhando. Alice, obrigada pela maravilhosa companhia, pelo sorriso sincero e pelo abraço cheio de amor. Emílio, obrigada por me emprestar seu quarto!

Aos meus avós, **Delfino e Sebastiana**, pelo amor, carinho e incessantes orações. Aos meus avós **Luiz e Joana**, que sempre me amaram e cuidaram de mim.

Aos queridos **Ana Lúcia, Cairbar e Sarah**, por sempre me incentivarem e torcerem por mim. Obrigada pelo carinho!

À **Brisa Fregonesi**, por ter me ajudado incansavelmente durante a execução deste trabalho. Sem você eu não teria conseguido! Obrigada!

Aos colegas de laboratório **Carolina, Renato, Fabiana, Karina, Cássio e Maralna**, e ao **Osmar**, que hoje não está mais no LEPA. Obrigada a todos pelas muitas caronas, pelo companheirismo e amizade, pela competência e por fazerem do LEPA um ótimo lugar para se trabalhar.

Aos queridos irmãos da **Comunidade Cristã de Monte Alto**, pelo carinho, compreensão e pelas orações.

À **Ambient, Serviços Ambientais de Ribeirão Preto**, por permitir que esse e vários outros trabalhos fossem realizados na Estação de Tratamento de Esgotos de Ribeirão Preto.

Ao coordenador operacional da ETE-RP, **Felix Antônio de Moura**, pela preciosa contribuição para a execução deste trabalho.

Às engenheiras **Karina e Taís**, do Laboratório de Análises da ETE-RP. Obrigada pelo apoio e prestatividade.

Ao funcionário **Edvaldo**, da ETE-RP, pelo carisma, simpatia, e auxílio na preparação e manutenção dos canteiros.

Ao **José Antônio Padula**, pelo auxílio na leitura das lâminas, pela simpatia e cordialidade.

Aos **funcionários e alunos do Laboratorio de Toxicologia y Salud Ambiental** da Unidersitat Rovira i Virgili, Espanha.

Ao **Programa de Pós Graduação em Enfermagem em Saúde Pública** da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, pela oportunidade de realizar esse trabalho.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** pelo auxílio financeiro e concessão da Bolsa de Mestrado.

A todos que participaram direta ou indiretamente da realização deste trabalho e colaboraram para que eu vencesse mais uma etapa de minha jornada pessoal e profissional.

Muito obrigada!

*“O temor do SENHOR é o princípio do
conhecimento; mas os loucos desprezam
a sabedoria e a instrução”*

Provérbios 1.7

RESUMO

RAGAZZI, M. F. **Estudo comparativo da qualidade parasitológica e toxicológica entre hortaliças cultivadas com água de reuso e hortaliças comercializadas em Ribeirão Preto – SP.** 2011. 116 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Várias regiões do planeta sofrem com escassez natural de água potável, o aumento da população e a contaminação ambiental desse recurso têm agravado esse quadro. Nesse contexto, práticas de reuso de água na agricultura vêm sendo difundidas em diversos países. O objetivo deste trabalho foi comparar a qualidade parasitológica e toxicológica entre hortaliças cultivadas com água de reuso e hortaliças comercializadas em feiras livres do município de Ribeirão Preto – SP. Para tanto, foram coletadas 20 amostras de alface (*Lactuca sativa*) e 20 de rúcula (*Eruca sativa*) nas feiras livres do município e na horta experimental construída na Estação de Tratamento de Esgotos de Ribeirão Preto, onde as hortaliças foram irrigadas com efluente tratado e clorado a 0,1 mgL⁻¹. No total foram coletadas 80 amostras. Para análise parasitológica foram utilizadas a Técnica de Sedimentação Espontânea e a Técnica de Separação Imunomagnética com utilização de Microscopia de Imunofluorescência e Contraste de Fase (método 1623 USEPA), para análise de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. A leitura das concentrações de metais foi realizada por Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS). Os resultados obtidos evidenciaram que tanto as verduras coletadas nas feiras livres quanto as produzidas na horta experimental apresentaram positividade para contaminação parasitológica, especialmente helmintos. Especificamente para *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp., o método 1623 mostrou que houve contaminação por *Giardia* spp. apenas nas hortaliças procedentes da horta experimental, com densidades que variaram de 6 a 15 cistos/50g. e por *Cryptosporidium* spp., com densidade de 3 oocistos/50g. As análises de metais mostraram que houve diferença significativa dos metais Cd, Pb, Mn e Fe, em alface e rúcula, sendo as concentrações maiores nas amostras procedentes da horta experimental. O Pb apresentou concentrações máximas próximas ou superiores ao Limite Máximo de Tolerância, segundo o Decreto 55871/1965, nos dois grupos de hortaliças analisados. Concluiu-se que a cloração do efluente tratado a uma concentração de 0,1 mgL⁻¹ não elimina os agentes patogênicos persistentes ao tratamento convencional. Para viabilizar a utilização de águas residuárias tratadas na cultura de hortaliças é necessário buscar uma forma de tratamento complementar que elimine microrganismos patogênicos presentes no efluente. Evidenciou-se também, a necessidade de monitoramento constante das concentrações de metais no efluente e na hortaliça produzida considerando as variações temporais que caracterizam o esgoto urbano, pois esses elementos podem ser transferidos para a cadeia alimentar. Torna-se evidente a necessidade de continuar buscando usos alternativos ao reuso da água, visando contornar os problemas já existentes de escassez de água garantindo a preservação de fontes de água no futuro.

Palavras-chave: Reúso de água. Agricultura. Hortaliças. Parasitas. Metais.

ABSTRACT

RAGAZZI, M. F. **Comparative study of the toxicological and parasitological quality of vegetables grown with wastewater and vegetables sold in Ribeirão Preto – SP.** 2011. 116 f. Dissertation (Master's Degree) – College of Nursing of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Several regions of the planet suffer from a shortage of natural drinking water. However, population growth and environmental pollution have aggravated this situation. In that context, a practice to use wastewater in the agriculture has been extend in several countries. The aim of this study was to compare the parasitological and toxicological quality of vegetables grown with recycled water and vegetables sold in street markets in the city of Ribeirão Preto – SP. To this end, we collected 20 samples of lettuce (*Lactuca sativa*) and 20 of rocket salad (*Eruca sativa*) in a streets markets and experimental garden built in the Sewage Treatment Station of Ribeirão Preto, where the vegetables were irrigated with treated and chlorinated effluent to $0,1 \text{ mgL}^{-1}$. In total, were collected 80 samples. For parasitological analysis we used the Spontaneous Sedimentations Technique and the Technique of Immunomagnetic Separation with use of Immunofluorescence Microscopy and Phase Contrast (USEPA, Method 1623) for analysis of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. Metals concentration was detected by Inductively Coupled Plasma with Mass Spectrometry (ICP-MS). The results showed that vegetables collected in free markets and those produced in the experimental garden were positive for parasitological contamination, especially helminths. Specifically for *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp., the Method 1623 showed that there was contamination by *Giardia* spp. only in the experimental garden vegetables, with densities ranging from 6 to 15 cists/50g. and *Cryptosporidium* spp. with a density of 3 oocysts/50g. Analyses of metals showed a significant difference of the metals Cd, Pb, Mn and Fe in lettuce and rocket salad, with higher concentrations in samples from experimental garden. The results showed Pb concentration near or above the Maximum Tolerance Limit, according to Federal Decree 55871/1965, in both vegetable groups analyzed. We concluded that the chlorination to $0,1 \text{ mgL}^{-1}$ of the treated effluent do not eliminated the persistent pathogens of conventional treatment. To enable the use of treated wastewater in the culture of vegetables is necessary to search a form of complementary treatment to eliminate pathogenic microorganisms present in the effluent. It also showed the need for constant monitoring of metal concentrations in the effluent and vegetables produced considering temporal variations that characterize the urban sewage, since these elements can be transferred to the food chain. This study highlights the need to continue seeking for alternative uses for recycled water, in order to correct existing problems of water scarcity and ensuring the preservations of water sources in the future.

Keywords: Wastewater use. Agriculture. Vegetables. Parasites. Heavy metals.

RESUMEN

RAGAZZI, M. F. **Estudio comparativo de la calidad parasitológica y toxicológica entre hortalizas cultivadas con agua de reúso y hortalizas comercializadas en Ribeirão Preto – SP.** 2011. 116 p. Tesis (Maestría) – Escuela de Enfermería de Ribeirão Preto, Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Varias regiones del planeta sufren con escasez natural de agua potable, el aumento de la población y la contaminación ambiental de ese recurso ha agravado ese cuadro. En ese contexto, prácticas de reutilización de agua en la agricultura vienen siendo difundidas en diversos países. El objetivo de este trabajo fue comparar la calidad parasitológica y toxicológica entre hortalizas cultivadas con agua de reúso y hortalizas comercializadas en el municipio de Ribeirão Preto – SP. Para eso, fueron colectadas 20 muestras de lechuga (*Lactuca sativa*) y 20 de rúcula (*Eruca sativa*) en ferias libres del municipio y en una huerta experimental construida en la Estación de Tratamiento de Efluentes de Ribeirão Preto, donde las hortalizas fueron irrigadas con efluente tratado y clorado a $0,1 \text{ mgL}^{-1}$. En total fueron colectadas 80 muestras. Para el análisis parasitológico fueron utilizadas la Técnica de Sedimentación Espontánea y la Técnica de Separación Imunomagnética con utilización de Microscopía de Inmunofluorescencia y Contraste de Fase (Método 1623 USEPA), para análisis de *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. Las concentraciones de metales fueron evaluadas por Espectrometría de Masa con Plasma Inductivamente Acoplado (ICP-MS). Los resultados obtenidos evidenciaron que tanto las verduras colectadas en ferias libres como las producidas en la huerta experimental presentaron positividad para contaminación parasitológica, especialmente helmintos. Específicamente para *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp., el método 1623 mostró que hubo contaminación por *Giardia* spp. solo en las hortalizas procedentes de la huerta experimental, con densidades que variaron de 6 a 15 cistos/50g. y por *Cryptosporidium* spp., con densidad de 3 oocistos/50g. Los análisis de metales mostraron que hubo diferencia significativa en las concentraciones de Cd, Pb, Mn y Fe, en lechuga y rúcula, siendo mayores la concentraciones en las muestras procedentes de la huerta experimental. El Pb presentó concentraciones máximas próximas o superiores al Limite Máximo de Tolerancia, según el Decreto 55871/1965, en los dos grupos de hortalizas analizados. Se concluyó que a cloración del efluente tratado a una concentración de $0,1 \text{ mgL}^{-1}$ no elimina los agentes patogénicos persistentes al tratamiento convencional. Para viabilizar la utilización de aguas residuales tratadas en la cultura de hortalizas es necesario buscar una forma de tratamiento complementar que elimine microorganismos patogénicos presentes en el efluente. Se evidenció también, la necesidad de monitoreo constante de las concentraciones de metales en el efluente y en la hortaliza producida considerando las variaciones temporales que caracterizan las aguas residuales urbanas, pues esos elementos pueden ser transferidos para la cadena alimentar. Se torna evidente la necesidad de continuar buscando usos alternativos para reúso de agua, con la finalidad de contornar los problemas existentes de escasez de agua garantizando la preservación de fuentes de agua en el futuro.

Palabras claves: Reutilización de agua. Agricultura. Hortalizas. Parásitos. Metales.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	O uso mundial de instalações sanitárias adequadas em 2008.....	29
Figura 2 -	Aplicações para o reuso da água.....	46
Figura 3 -	Localização do município de Ribeirão Preto.....	53
Figura 4 -	Coleta de amostras de alface (<i>Lactuca sativa</i>) e rúcula (<i>Eruca sativa</i>) nas feiras livres.....	54
Figura 5 -	Horta experimental cultivada em área cedida pela ETE-RP.....	55
Figura 6 -	Coleta de amostras de rúcula (<i>Eruca sativa</i>) na horta experimental na ETE-RP.....	56
Figura 7 -	Diagrama amostral das hortaliças adquiridas em feiras livres e coletadas na horta experimental.....	56
Figura 8 -	Controle positivo e negativo do bioindicador Sterikon® Plus Bioindicator após a esterilização, utilizado no Laboratório de Ecotoxicologia e Parasitologia Ambiental (LEPA), EERP/USP.....	57
Figura 9 -	Cálculos utilizados para a sedimentação das amostras durante a análise parasitológica.....	58
Figura 10 -	Representação da disposição da amostra na lâmina de três poços para fluorescência.....	60
Figura 11 -	Parasitas encontrados nas amostras de hortaliças e analisadas no LEPA. São especificadas as características morfológicas utilizadas como critérios de classificação.....	67
Figura 12 -	Distribuição da ocorrência de parasitas segundo a espécie em amostras de alface (<i>Lactuca sativa</i>) procedentes de feiras livres e da horta experimental.....	68
Figura 13 -	Distribuição da ocorrência de parasitas segundo a espécie em amostras de rúcula (<i>Eruca sativa</i>) procedentes de feiras livres e da horta experimental.....	69
Figura 14 -	Cisto de <i>Giardia</i> spp. observado através de diferentes filtros em leitura realizada no Laboratório de Ecotoxicologia e Parasitologia Ambiental (LEPA).....	75
Figura 15 -	Cistos de <i>Giardia</i> spp. e oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. pertencentes à amostra e ao teste <i>Color Seed</i> , identificados durante a análise realizada no LEPA.....	76
Figura 16 -	Concentração de Cd em amostras de alface (<i>Lactuca sativa</i>) provenientes da feira e da horta experimental.....	81

Figura 17 -	Concentração de Pb em amostras de alface (<i>Lactuca sativa</i>) provenientes da feira e da horta experimental.....	82
Figura 18 -	Concentração de Fe em amostras de alface (<i>Lactuca sativa</i>) provenientes da feira e da horta experimental.....	82
Figura 19 -	Concentração de Mn em amostras de alface (<i>Lactuca sativa</i>) provenientes da feira e da horta experimental.....	83
Figura 20 -	Concentração de Cu em amostras de alface (<i>Lactuca sativa</i>) provenientes da feira e da horta experimental.....	84
Figura 21 -	Concentração de Zn em amostras de alface (<i>Lactuca sativa</i>) provenientes da feira e da horta experimental.....	84
Figura 22 -	Concentração de Cd em amostras de rúcula (<i>Eruca sativa</i>) provenientes da feira e da horta experimental.....	85
Figura 23 -	Concentração de Pb em amostras de rúcula (<i>Eruca sativa</i>) provenientes da feira e da horta experimental.....	85
Figura 24 -	Concentração de Fe em amostras de rúcula (<i>Eruca sativa</i>) provenientes da feira e da horta experimental.....	86
Figura 25 -	Concentração de Mn em amostras de rúcula (<i>Eruca sativa</i>) provenientes da feira e da horta experimental.....	86
Figura 26 -	Concentração de Cu em amostras de rúcula (<i>Eruca sativa</i>) provenientes da feira e da horta experimental.....	87
Figura 27 -	Concentração de Zn em amostras de rúcula (<i>Eruca sativa</i>) provenientes da feira e da horta experimental.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais agentes biológicos que contaminam água e alimentos.....	31
Tabela 2 - Limites de detecção dos metais, analisados por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).....	64
Tabela 3 - Distribuição da frequência de parasitas em alface (<i>Lactuca sativa</i>) produzidas experimentalmente e comercializadas em Ribeirão Preto – SP.....	70
Tabela 4 - Distribuição da frequência de parasitas em rúcula (<i>Eruca sativa</i>) produzidas experimentalmente e comercializadas em Ribeirão Preto – SP.....	71
Tabela 5 - Distribuição (em porcentagem) dos parasitas identificados segundo o tipo e procedência das hortaliças.....	72
Tabela 6 - Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. encontrados em amostras de alface (<i>Lactuca sativa</i>) durante as análises realizadas no LEPA, utilizando o método 1623/EPA.....	76
Tabela 7 - Cistos de <i>Giardia</i> spp. encontrados em amostras de alface (<i>Lactuca sativa</i>) durante as análises realizadas no LEPA, utilizando o método 1623/EPA.....	77
Tabela 8 - Concentrações de metais em alfaces (<i>Lactuca sativa</i>) procedentes das feiras livres de Ribeirão Preto e cultivadas na horta experimental.....	80
Tabela 9 - Concentrações de metais em rúculas (<i>Eruca sativa</i>) procedentes das feiras livres de Ribeirão Preto e cultivadas na horta experimental.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABES	Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental
ANA	Agência Nacional das Águas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APHA	American Public Health Association
CDSP	European Health Committee
CNNPA	Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilidol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
EERP	Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto
ETE-RP	Estação de Tratamento de Esgotos de Ribeirão Preto
FAO	Food and Agriculture Organization
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluocromo Isotiocianato de Fluoresceína
HNO ₃	Ácido nítrico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado
IGC	Instituto Geográfico e Cartográfico
IPCC	Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas
LEPA	Laboratório de Ecotoxicologia e Parasitologia Ambiental
LMT	Limite Máximo de Tolerância
MPC-1	Concentrador de partículas magnéticas
MPC-M	Concentrador de partículas magnéticas
OMS	Organização Mundial da Saúde

ONU	Organização das Nações Unidas
PBS	Tampão salina fosfato
PNUD	Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento
RNA	Ácido ribonucléico
UNICEF	United Nations Children's Fund
USEPA	United States Environmental Protection Agency
USP	Universidade de São Paulo
WHO	World Health Organization

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
°C	graus Celsius
<	menor que
μL	microlitro
μm	micrômetro
®	marca registrada
a. C.	antes de Cristo
As	arsênio
Be	berílio
Cd	cádmio
Cu	cobre
Cr	cromo
Fe	ferro
g	grama
h	hora
hab/Km ²	habitantes por quilômetro quadrado
Hg	mercúrio
Km ²	quilômetro quadrado
MeHg	metilmercúrio
mgL ⁻¹	miligrama por litro
mm	milímetro
Mn	manganês
n°	número
nm	nanômetro
Ni	níquel
Pb	chumbo
ppm	parte por milhão
rpm	rotações por minuto
Sb	antimônio
Se	selênio
Sn	estanho

SP	São Paulo
sp.	espécie
spp.	espécies
Tl	tálio
V	vanádio
x	vezes
Zn	zinco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	25
2.1. Problemática da escassez de água no mundo e no Brasil.....	26
2.2. A água como determinante da saúde pública.....	27
2.3. Microrganismos transmitidos por água e alimentos.....	30
2.4. Agentes químicos presentes na água: foco para metais.....	36
2.5. Reuso de água.....	43
2.6. Reuso de água na agricultura.....	46
3. OBJETIVOS.....	50
3.1. Objetivo geral.....	51
3.2. Objetivos específicos.....	51
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	52
4.1. Local de Estudo.....	53
4.2. Amostras.....	54
4.2.1. Amostras de hortaliças comercializadas em Ribeirão Preto.....	54
4.2.2. Amostras da horta experimental.....	55
4.3. Coleta, preparo e análise das amostras.....	56
4.3.1. Coleta e preparo de amostras.....	56
4.3.2. Análise parasitológica.....	57
4.3.3. Análise de <i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>Giardia</i> spp.....	58
4.3.4. Análise de metais.....	63
4.4. Análise dos dados.....	64

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
5.1. Dados Parasitológicos.....	66
5.2. <i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>Giardia</i> spp.....	74
5.3. Concentração de metais.....	79
6. CONCLUSÕES.....	90
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	92
REFERÊNCIAS.....	94
APÊNDICES.....	109
APÊNDICE A – Concentrações de metais em amostras de alface (<i>Lactuca sativa</i>).....	110
APÊNDICE B – Concentrações de metais em amostras de rúcula (<i>Eruca sativa</i>).....	111
APÊNDICE C – Teste estatístico da ocorrência de parasitas em alface (<i>Lactuca sativa</i>) e rúcula (<i>Eruca sativa</i>) procedentes da horta experimental e das feiras livres.....	112
APÊNDICE D – Testes estatísticos das concentrações de metais em amostras de alface (<i>Lactuca sativa</i>) procedentes da horta experimental e das feiras livres.....	113
APÊNDICE E - Testes estatísticos das concentrações de metais em amostras de rúcula (<i>Eruca sativa</i>) procedentes da horta experimental e das feiras livres.....	115

1. Introdução

A água é a substância mais abundante na superfície do Planeta Terra, cobrindo aproximadamente 77% de sua extensão. Esse montante não está distribuído uniformemente, pois 97,5% do volume total da água existente encontra-se nos oceanos e apenas 0,76% aparece na forma de água doce. Por conta da movimentação da água no ciclo hidrológico, a quantidade de água nos reservatórios naturais tende a variar, havendo conseqüentemente regiões do Planeta que naturalmente contam com abundância de água disponível e outras apresentam escassez desse recurso (REBOUÇAS, 2006).

A falta de água sempre foi um fator limitante para a sobrevivência e para o desenvolvimento econômico e social da população mundial ao longo da história (PAZ; TEODORO; MENDONÇA, 2000). Naturalmente se observam diferenças no volume de água disponível de região pra região, porém, ao acrescentar a interferência desordenada do homem no ambiente, se desencadeia um desequilíbrio do ciclo hidrológico, que leva a um quadro de escassez de água para muitas populações humanas.

O Brasil é um país privilegiado por possuir grandes reservas de água doce, superficiais e subterrâneas. Contudo, a distribuição desta água não é uniforme. De acordo com a Agência Nacional das Águas - ANA (2010), apenas a bacia hidrográfica do rio Amazonas contribui com aproximadamente 73% do total de recursos hídricos do país. Entretanto, esta é a região menos povoada do Brasil, e em pelo censo 2010, conta apenas com 4,12 hab/km². Em contrapartida, na bacia hidrográfica do rio Paraná onde reside mais de 32% da população nacional, o crescimento dos grandes centros urbanos como São Paulo, Curitiba e Campinas em rios de cabeceira têm gerado uma grande pressão sobre os recursos hídricos. Isso porque enquanto aumentam as demandas, diminui a disponibilidade de água devido à contaminação por efluentes domésticos, industriais e drenagem urbana.

Tendo em vista que a água é essencial para a manutenção da vida em todas as suas formas, incluindo a humana, ter água de qualidade disponível à população é fundamental para que esta não venha a sofrer com doenças comumente transmitidas pela contaminação desse recurso. Além disso, o déficit hídrico também se relaciona com a falta de alimentos. Em países nos quais há falta de água, percebe-se a dependência externa de produtos agrícolas, que geralmente exigem uma alta quantidade de água em sua produção. Sendo assim, o problema de escassez de água se projeta como um problema de escassez de alimentos (BERNARDI, 2003).

A escassez de água traz ainda outras implicações. Quando não há acesso a água própria para consumo, ou este acesso é limitado, a necessidade inerente a esse recurso

acarreta no uso de água com qualidade inferior por parte da população, que é exposta a agravos decorrentes da contaminação por patógenos e contaminantes ambientais. Um grande número de agentes biológicos, de diversas espécies, é transmitido ao homem por meio da ingestão de água e alimentos contaminados. A ação desses agentes patogênicos depende da precariedade das condições higiênicas do meio, bem como da suscetibilidade do hospedeiro humano. Grande quantidade de parasitas e bactérias causadores de problemas como a diarreia são veiculados através da ingestão de alimentos contaminados, o que traz graves implicações para a saúde humana, pois a diarreia é um fator intrinsecamente ligado à mortalidade infantil (BALBANI; BUTUGAN, 2000).

Galal-Gorchev (1996) informou que nos países em desenvolvimento, grupo em que o Brasil está inserido, cerca de 80% das doenças e mais de um terço das mortes estão associadas ao consumo de água e alimentos contaminados. Isso revela a importância de destinar água de boa qualidade para abastecimento humano e de velar pela qualidade dos alimentos oferecidos à população, a fim de evitar surtos de doenças.

Somados aos agentes biológicos patogênicos, contaminantes ambientais, como metais pesados, também figuram entre os potenciais causadores de doenças e danos ambientais. Grande parte da contaminação de seres humanos por metais pesados ocorre por via oral, podendo ser causada pela ingestão de água ou alimentos contaminados. A contaminação dos alimentos ocorre geralmente através da água de irrigação ou do solo contaminado (NIKAIDO, 2009).

A escassez de água deixou de ser um problema exclusivo das regiões naturalmente áridas ou semi-áridas, e hoje também se encontra em áreas com maior disponibilidade natural de recursos hídricos por consequência da ação antrópica. O reúso de água e a conservação de mananciais passaram a ser práticas fundamentais para evitar futuros problemas (HESPANHOL, 2003). No Brasil o reúso de água tem diversas aplicações e, particularmente na agricultura, prática que mais utiliza água no Planeta, se apresenta como uma forma economicamente rentável e benéfica para o meio ambiente, desde que se observem as medidas necessárias para a preservação da qualidade ambiental.

Ter água de qualidade para consumo humano e para produção de alimentos é um dos fatores determinantes na saúde coletiva. Nesse sentido, o Ministério da Saúde através da Agenda Nacional de Prioridades de Pesquisa em Saúde (BRASIL, 2008), relaciona os seguintes tópicos como prioritários na Investigação em Saúde:

- Desenvolvimento de projetos de pesquisa para obtenção de modelos de produção mais limpos e menos perigosos em substituição à processos produtivos rurais e urbanos.
- Desenvolvimento de modelos, metodologias e sistemas de informação em saúde ambiental.
- Desenvolvimento de modelos de gestão em ambiente, saneamento e recursos hídricos com utilização de tecnologias de baixo custo, conscientização da população, e avaliação dos impactos sobre a saúde.
- Desenvolvimento de pesquisas relacionadas a saneamento, com ênfase no abastecimento de água, tais como: avaliação da relação saneamento e saúde, impactos e implicações da legislação no acesso da população à água de qualidade, uso de fontes alternativas de águas.
- Desenvolvimento de projetos para apropriação de novas tecnologias em engenharia de saúde pública e saneamento ambiental.

Com base no conteúdo exposto justifica-se o presente estudo, em que se comparou a qualidade de hortaliças comercializadas no município de Ribeirão Preto/SP com a qualidade de hortaliças produzidas com água reutilizada, gerando novos conhecimentos sobre reutilização da água na agricultura.

Ainda, este trabalho deu continuidade ao projeto de mestrado desenvolvido por Nikaido, intitulado: “Uso de águas residuárias tratadas na cultura de hortaliças: avaliação de enteroparasitas e metais pesados” (Processo FAPESP: 2006/59920-8). Este trabalho também colaborou para o avanço na consolidação do grupo de pesquisa do Laboratório de Ecotoxicologia e Parasitologia Ambiental (LEPA) da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, que iniciou suas atividades em agosto de 2008.

2. Revisão de Literatura

2.1. Problemática da escassez de água no mundo e no Brasil

Além de ser essencial para a sobrevivência de todas as espécies existentes no planeta, a água também é imprescindível para a manutenção da saúde coletiva e saneamento, para preservar a sustentabilidade geral de ciclos e processos e para um desenvolvimento sócio-econômico equilibrado. Problemas de escassez e degradação da qualidade da água vêm sendo apontados como preocupação global por diversas organizações e governos (TUNDISI, 2008).

Com base em dados geológicos pode-se estimar que a quantidade total de água da Terra permaneceu praticamente constante durante os últimos milhões de anos. Já os volumes estocados em cada um dos grandes reservatórios de água do Planeta – oceanos, calotas polares, geleiras e águas subterrâneas – podem ter variado consideravelmente ao longo das eras (REBOUÇAS, 2004). A distribuição das águas na superfície terrestre não é homogênea, o que acarreta escassez de água em algumas localidades e em abundância desse recurso em outras, sendo este um fenômeno natural.

A problemática da escassez de água se agrava à medida que a população humana aumenta e os recursos naturais são consumidos ou inutilizados pela poluição. De acordo com o Relatório do Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas - IPCC (2007), até 2080 é possível que entre 1,1 a 3,2 bilhões de pessoas sofram com a falta de água e de 200 a 600 milhões sejam afetadas pela escassez de alimentos.

A Organização das Nações Unidas (ONU) estima que em 2020, de 75 a 250 milhões de pessoas na África enfrentarão a escassez de água. Nessa região, o rendimento da agricultura pode cair em até 50%. Este quadro agrava ainda mais a questão da escassez, uma vez que a pouca quantidade de água disponível acaba comprometida pela contaminação. O Relatório da FAO (2011), intitulado “Mudança climática, água e segurança alimentar” aponta que o mundo sofrerá escassez de água para agricultura devido às mudanças climáticas, afetando a segurança alimentar.

Estima-se que na América Latina a produtividade da pecuária e de lavouras importantes sofrerá diminuição significativa até 2050 devido às mudanças climáticas, que acarretarão maior escassez de água para finalidades agrícolas. Espera-se o aumento do estresse hídrico em regiões da América do Sul que já sofrem com a seca, e essa situação, atrelada ao aumento da temperatura, pode tornar impróprios muitos lugares para diversas culturas que exigem um clima mais ameno, como o café (FAO, 2011).

O Brasil possui alta disponibilidade de água em seu território, mas está distribuída de forma desigual. No Nordeste do país, por exemplo, há grandes regiões que se caracterizam pela escassez natural de água, que lhes confere peculiar fauna e flora. Contudo, o agravante da situação se dá na medida em que a pressão sobre as bacias hidrográficas aumenta justamente onde a disponibilidade natural é menor. O Centro-Sul do país conta com grandes rios, mas a pressão antrópica sobre estas bacias em alguns pontos é preocupante e tem levado a algumas situações de escassez. De acordo com o IBGE (2000), algumas áreas da região Nordeste e Sul do país chegam a ter uma demanda de água de mais de 50% da disponibilidade do recurso na região. Isso limita o crescimento das regiões e traz sérios impactos ambientais e sociais associados.

O principal uso da água no Brasil é na agricultura, com cerca de 65% do total aplicado nas atividades antrópicas (TELLES; DOMINGUES, 2006). No país, o meio rural vem sofrendo severamente os impactos das atividades desenvolvidas tradicionalmente nas cidades, na medida em que são lançados esgotos domésticos não-tratados nos rios, os quais degradam a qualidade das águas que fluem por centenas de quilômetros (REBOUÇAS, 2001). Rios e lagos através de um sistema de autodepuração conseguem processar pequenas quantidades de resíduos, porém uma alta carga de poluentes excede a capacidade de autodepuração, levando, conseqüentemente, a águas de baixa qualidade que necessitam de um oneroso tratamento.

2.2. A água como determinante da saúde pública

Em 1948 a OMS definiu saúde como “estado de completo bem-estar físico, mental e social, e não simplesmente a ausência de doença ou enfermidade”. Apesar dos impasses gerados em termos específicos desse conceito, é salientado que, na sociedade moderna, a saúde não pode ser simplesmente caracterizada como a “ausência da doença”. Devem ser levados em conta os fatores externos ao indivíduo para melhor compreensão dos processos de saúde-doença e assim poder implantar solidamente políticas de promoção e educação para a saúde. A Declaração de Alma-Ata, em 1978 coloca como parte necessária dos cuidados primários de saúde, entre outros, a “previsão adequada de água de boa qualidade e saneamento básico”. Já a Carta de Ottawa, resultante da Primeira Conferência Internacional sobre Promoção da Saúde, em 1986, enuncia que “o acompanhamento sistemático do impacto que as mudanças no meio-ambiente produzem sobre a saúde – particularmente, nas áreas de

tecnologia, trabalho, produção de energia e urbanização – é essencial e deve ser seguido de ações que assegurem benefícios positivos para a saúde da população. A proteção do meio-ambiente e a conservação dos recursos naturais devem fazer parte de qualquer estratégia de promoção da saúde.”

As questões ambientais e a promoção de saúde estão intimamente relacionadas. Apenas a cobertura dos serviços de saúde não é suficiente para atender inteiramente as necessidades de saúde das populações humanas. A promoção da saúde e a prevenção de agravos são fundamentais, e não apenas a disponibilização de meios e recursos para tratamento de doenças. Para isso, é determinante a manutenção da saúde ambiental. A contaminação hídrica, atmosférica, alimentar e do solo afeta diretamente a saúde humana (MORAES; JORDÃO, 2002).

A água destinada ao consumo humano deve apresentar boa qualidade física, química e microbiológica, sendo esta uma condição fundamental para que a água se torne um veículo de vários agentes químicos e biológicos prejudiciais à saúde (CASTANIA, 2009).

Várias medidas são necessárias para a obtenção de água de qualidade, entre elas, o tratamento de águas para abastecimento humano, coleta e tratamento de esgotos e o tratamento de efluentes agrícolas e industriais. Estas medidas são ações promotoras do que chamamos de “saneamento”.

Classicamente, a OMS define saneamento como o “controle de todos os fatores do meio físico do homem, que exercem ou podem exercer efeitos deletérios sobre o seu estado de bem estar físico, mental ou social”. Neste contexto, é evidente a relação de saneamento com a qualidade ambiental. Observa-se uma aproximação entre saúde e ambiente, em que a área da saúde passa a valorizar o ambiente como fator determinante de agravos à saúde bem como a área ambiental passa a visualizar os impactos das alterações ambientais sobre a saúde humana. Surge uma importante relação entre saúde e ambiente que se fortalece na medida em que avançam as pesquisas nessas áreas (HELLER, 1998).

De acordo com o PNUD – Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento e a WHO/UNICEF (United Nations Children’s Fund), 75% da população brasileira contava com acesso a condições adequadas de esgotamento sanitário em 1997. Em países africanos como Angola ou Sudão, nesse mesmo ano, apenas 31 e 34% da população tinha acesso a esses serviços, respectivamente. Em 2010 a WHO/UNICEF em seu relatório intitulado “Progresso do Saneamento e Água Potável” aponta como problema de saneamento a falta de infra-

estrutura adequada referente às instalações sanitárias (Figura 1). O aumento da população atrelado à contaminação causada pela ausência de tratamento e destinação inadequada dos resíduos, sobretudo nos países em desenvolvimento agrava as projeções de escassez de água e traz implicações negativas à saúde humana e ambiental.

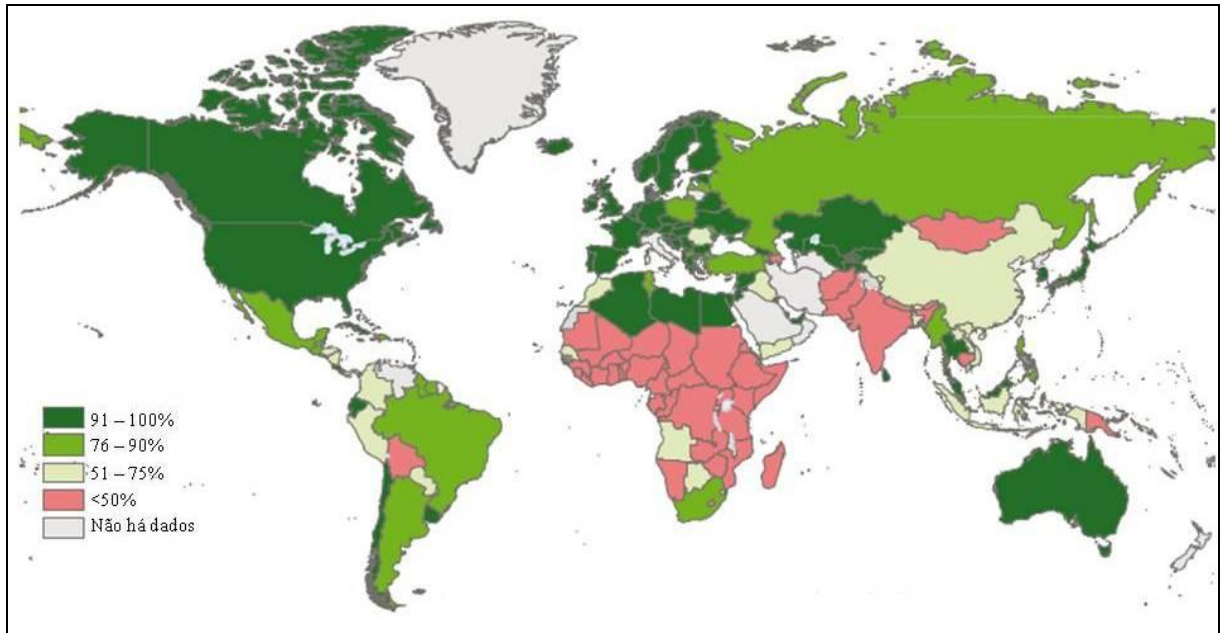


Figura 1 - O uso mundial de instalações sanitárias adequadas em 2008. Adaptado de: WHO/UNICEF 2010.

A ausência ou precariedade de serviços de saneamento traz como consequência a exposição de uma parcela significativa da população a condições precárias de saúde. Estas pessoas ficam expostas a diversas doenças de veiculação hídrica, como hepatite, cólera, diarreia, parasitoses intestinais e muitas outras. A falta de saneamento afeta significativamente as crianças, pois um ambiente contaminado por resíduos fecais favorece a disseminação de doenças diarreicas, que estão entre as principais causas de mortalidade entre crianças com menos de cinco anos (CASTANIA, 2009). Prüs-Üstun e Corvalán (2006) estimaram que até 94% dos casos de diarreia no mundo estão associados a fatores ambientais de risco, como utilização de água contaminada e condições precárias de saneamento. Cerca de 1,5 milhão de mortes por doenças diarreicas por ano que ocorrem no Planeta são atribuídas à fatores ambientais. Ainda, casos de ascaridíase, tricuriase, ancilostomíase, esquistossomose e doença de Chagas poderiam ser em grande parte evitados com melhorias na qualidade da água, higiene, saneamento e habitação.

Considerando todas as implicações para a saúde pública provenientes do consumo de água de baixa qualidade, o Ministério da Saúde apresenta a Portaria nº 518 de 2004, que estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, entre outras providências. A portaria orienta que sejam avaliados parâmetros físicos, químicos e microbiológicos para que uma determinada água possa ser avaliada como “potável”.

2.3. Microrganismos transmitidos por água e alimentos

A água possui a característica de ser solvente universal, ou seja, possui a capacidade de dissolver uma grande quantidade de substâncias e carrear muitos organismos e elementos, sendo fácil constatar a probabilidade de ingerir com ela substâncias indesejadas e organismos patogênicos (CASTANIA, 2009).

Com a globalização na produção de alimentos através das práticas de importação e exportação é crescente a preocupação com o controle de qualidade dos produtos comercializados. Se não forem observados rígidos cuidados na higiene durante a produção, transporte, embalagem e conservação, os alimentos contaminam-se e passam a transmitir diversas doenças (BALBANI; BUTUGAN, 2000). Alguns dos principais agentes biológicos que contaminam água e alimentos são listados na Tabela 1.

Tabela 1 - Principais agentes biológicos que contaminam água e alimentos

Agentes biológicos	
<p>Bactérias</p> <p>Produtoras de toxinas pré-formadas</p> <p><i>Clostridium botulinum</i></p> <p><i>Staphylococcus aureus</i></p> <p><i>Bacillus cereus</i></p> <p>Produtoras de toxinas na luz intestinal</p> <p><i>Vibrio</i> spp.</p> <p><i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica</p> <p>Invasoras do epitélio intestinal</p> <p><i>Salmonella</i> spp.</p> <p><i>Campylobacter</i> spp.</p> <p><i>Yersinia</i> spp.</p> <p><i>Shigella</i> spp.</p> <p><i>Listeria monocytogenes</i></p> <p><i>E. coli</i> enteroinvasiva</p> <p>Outras</p> <p><i>Aeromonas</i> spp.</p> <p><i>Plesiomonas shigelloides</i></p> <p><i>E. coli</i> enteropatogênica</p> <p>Fungos</p> <p><i>Aspergillus flavus</i></p> <p><i>Aspergillus parasiticus</i></p>	<p>Vírus</p> <p>Vírus da hepatite A</p> <p>Vírus da hepatite B</p> <p>Rotavírus</p> <p>Adenovírus (entérico)</p> <p>Protozoários</p> <p><i>Cryptosporidium</i> spp.</p> <p><i>Giardia</i> spp.</p> <p><i>Entamoeba histolytica</i></p> <p><i>Isospora belli</i></p> <p><i>Balantidium coli</i></p> <p><i>Dentamoeba fragilis</i></p> <p><i>Blastocystis hominis</i></p> <p>Helmintos</p> <p><i>Taenia solium</i></p> <p><i>Taenia saginata</i></p> <p><i>Hymenolepis nana</i></p> <p><i>Ascaris</i></p> <p><i>Trichuris</i></p> <p><i>Trichinella spiralis</i></p>

Fonte: Adaptado de Balbani e Butugan, 2000.

As causas das doenças veiculadas por águas e alimentos estão associadas ao ciclo de contaminação fecal/oral. Ocorrem, geralmente, tanto em áreas rurais quanto em áreas urbanas dos países em desenvolvimento devido às más condições sanitárias. Como exemplos de doenças transmitidas a partir da alimentação podem ser citadas as parasitoses intestinais, muito frequentes na população brasileira, e as hortaliças são citadas como um dos veículos de maior importância na transmissão dessas parasitoses (SLIFKO; SMITH; ROSE, 2000).

As infecções por helmintos e protozoários estão entre os mais frequentes agravos do mundo. As parasitoses intestinais constituem um grave problema de saúde pública, devido a sua elevada prevalência, diversidade de manifestações clínicas e pela resistência dos parasitas no meio ambiente. Alguns parasitas podem sobreviver até 25 dias no ambiente, como é o caso da *Entamoeba histolytica*. Alguns helmintos como o *Ascaris lumbricoides* podem

apresentar resistência média de até um ano no ambiente (ROWE; ABDEL, 1995; TONANI, 2008).

As enteroparasitoses são relevantes principalmente nos países em desenvolvimento, pois estão entre os fatores debilitantes da população, sendo associadas a quadros de diarreia crônica e desnutrição e ao comprometimento do desenvolvimento físico e intelectual das faixas etárias mais jovens. Em decorrência dos efeitos maléficos à saúde dos indivíduos e dos fatores econômicos, diversas iniciativas têm sido dirigidas para o controle das parasitoses intestinais em diferentes países (LUDWIG et al., 1999).

As parasitoses intestinais podem afetar o equilíbrio nutricional, pois interferem na absorção de nutrientes, induzem sangramento intestinal, reduzem a ingestão alimentar e ainda podem causar complicações significativas, como obstrução intestinal, prolapso retal e formação de abscessos (ROQUE, 1997).

Dentre os parasitas intestinais de importância clínica estão os helmintos, causadores das verminoses. No presente estudo foram encontradas algumas espécies de importância clínica que serão tratadas a seguir:

- *Ascaris lumbricoides*: é encontrado em quase todos os países do mundo, variando sua frequência em função das condições climáticas, ambientais e principalmente do grau de desenvolvimento socioeconômico da população. Infestações de alta intensidade por larvas podem ser encontradas lesões hepáticas e pulmonares, sendo que estas manifestações geralmente ocorrem em crianças, associadas ao estado nutricional e imunitário delas. A ascariíase humana é pouco sintomática, o que dificulta seu diagnóstico clínico. Quando da infestação por vermes adultos, infestações médias (30 a 40 vermes) ou maciças (mais de 100 vermes) têm por sintomas mais comuns a subnutrição e, não raro, o enovelamento dos vermes na luz intestinal, levando à sua obstrução. A transmissão ocorre através da ingestão de água ou alimentos contaminados com os ovos do parasita. Há uma grande quantidade de artigos na literatura que mostram que a contaminação da água de irrigação de hortas leva à contaminação de verduras com ovos viáveis e, devido a grande capacidade de aderência a superfícies, uma vez presentes no ambiente ou nos alimentos, estes ovos não são removidos facilmente por lavagens (SILVA; MASSARA, 2005).

- *Hymenolepis nana*: espécie cosmopolita e atinge roedores, humanos e outros primatas. As infecções humanas não são usualmente acompanhadas por manifestações clínicas, e o aparecimento de perturbações está associado à idade do paciente e ao número de vermes. Os sintomas mais comuns em crianças são agitação, insônia, irritabilidade, diarreia e dor abdominal. O mecanismo de transmissão mais frequente é a ingestão de ovos presentes nas mãos ou em alimentos contaminados (NEVES, 2005a).
- *Ancilostomídeos*: embora haja mais de 100 espécies descritas dentro da família Ancylostomidae, apenas três são agentes etiológicos de ancilostomoses humanas: *Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus*, espécies típicas de humanos, e *Ancylostoma ceylanicum*, que embora possa contaminar humanos, é típica de canídeos e felídeos. Os ancilostomídeos têm distribuição geográfica universal, sendo que *A. duodenale* é mais comum em regiões de clima temperado e *N. americanus* de regiões tropicais. Entretanto, as duas espécies podem coexistir na mesma região. Os sintomas associados a infecções por ancilostomídeos envolvem reações cutâneas quando da penetração da larva e, sobretudo, sinais de parasitismo intestinal, como diminuição do apetite, indigestão, cólica, flatulências, náuseas e vômitos, e até constipação e diarreia sanguinolenta. A anemia associada à ancilostomose relaciona-se com a quantidade de vermes adultos presentes no intestino delgado, que se alimentam do sangue do hospedeiro. As principais vias de infecção são a transcutânea e a oral (LEITE, 2005).

Protistas são organismos unicelulares eucarióticos, pertencentes ao Reino Protista, que apresentam as mais variadas formas de alimentação, locomoção e reprodução. Várias espécies são parasitas, e dentre estas, há enteroparasitas de importância clínica. Geralmente, a infecção por estes parasitas intestinais ocorre a partir do consumo de água e alimentos contaminados. Podem ser citados:

- *Balantidium coli*: é normalmente um protozoário comensal da luz do intestino de suínos. Em humanos, quando há alguma lesão na mucosa do colo e do ceco, há possibilidade de invasão pelo parasita, que aparentemente não é capaz de penetrar em mucosas intactas. Por produzir hialuronidase, pode aumentar a lesão inicial e provocar necroses localizadas e úlceras. A sintomatologia é semelhante à da amebíase, e inclui diarreia, dor abdominal, anorexia, fraqueza

e às vezes febre. A transmissão ocorre através de cistos que contaminam água e alimentos (NEVES, 2005b).

- *Giardia* spp.: é um parasita intestinal que produz cistos resistentes às condições ambientais e são eliminados para o ambiente junto às fezes do hospedeiro. Taxonomicamente, *Giardia* spp. pertence ao Reino dos Protistas, sub-reino Protozoa, filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, classe Zoomastigophora, ordem Diplomonadida, família Hexamitidae (VITOR, 2005; PEREIRA, 2008). O ciclo de vida deste protozoário inicia-se quando o hospedeiro ingere os cistos. A temperatura corpórea e a passagem pelo estômago fazem os cistos se romperem liberando os trofozoítos que aderem à mucosa intestinal (PEREIRA, 2008; ROSE; SLIFKO, 1999). A via normal de infecção do homem por *Giardia* é a ingestão de cistos maduros, que podem ser transmitidos através da ingestão de águas superficiais não tratadas ou cujo tratamento tenha sido deficiente, alimentos contaminados, especialmente verduras consumidas cruas e frutas mal lavadas, entre outros. Vale salientar que por tratamento deficiente da água para a eliminação de cistos de *Giardia* entende-se a utilização de cloro apenas. Quanto à sintomatologia, a giardíase apresenta um quadro clínico diverso, sendo que a maioria dos casos é assintomática. Nestes casos os portadores podem eliminar cistos nas fezes por até seis meses. Nos casos sintomáticos, a giardíase pode causar diarreia aguda ou diarreia persistente com perda de peso e má absorção de gordura e nutrientes, como vitaminas lipossolúveis, vitamina B₁₂, ferro e lactose. Especialmente em crianças, estas deficiências nutricionais podem ter efeitos graves (SOGAYER; GUIMARÃES, 2005).
- *Cryptosporidium* spp.: é um protozoário que parasita o trato gastrointestinal. Produz oocistos resistentes às condições ambientais e são eliminados no meio ambiente junto às fezes de um hospedeiro. Taxonomicamente, o gênero pertence ao filo Apicomplexa, classe Sporozoea, ordem Eucoccidiida, família Cryptosporidiidae. (VITOR, 2005; PEREIRA, 2008). Semelhantemente à *Giardia* spp., o ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp. começa com a ingestão de oocistos. Ao passar pelo estômago os oocistos se abrem e são liberados esporozoítos que parasitam as células epiteliais do trato gastrointestinal ou respiratório (PEREIRA, 2008; ROSE; SLIFKO, 1999). A criptosporidiose foi

caracterizada como uma parasitose humana em 1976, sendo que a princípio acreditava-se que se tratava de uma doença que ocorria apenas em indivíduos com algum tipo de imunodeficiência. Contudo, tem se observado nos últimos anos que essa parasitose ocorre com frequência também em indivíduos imunocompetentes. Entre as vias mais comuns de transmissão da criptosporidiose está a contaminação pela ingestão de água e alimentos contaminados com oocistos. Alguns fatores interferem no quadro clínico da criptosporidiose, tais como a idade, a competência imunológica e a associação com outros patógenos. As alterações nas células epiteliais da mucosa intestinal provocadas pelo parasitismo do *Cryptosporidium* spp. interferem nos processos digestivos e resultam frequentemente na síndrome da má absorção. Em pacientes imunocompetentes, a criptosporidiose se caracteriza por diarreia aquosa que persiste em média de 12 a 14 dias, anorexia, dor abdominal, náusea, flatulência, febre e dor de cabeça. Os sintomas são mais graves em crianças, e podem ser acompanhados de vômitos e desidratação (LIMA, 2005). Em pacientes imunocomprometidos, infecções por *Cryptosporidium* spp. causam diarreia severa com duração prolongada, acentuada perda de peso, desequilíbrio eletrolítico e má absorção. Nestes casos, uma vez estabelecida a infecção, a severidade do quadro clínico resulta com frequência em óbito, especialmente entre os portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (CAPUANO et al. 2001; LIMA; STAMFORD, 2003). A criptosporidiose tem sido encontrada com frequência em todas as partes do mundo, sendo considerada por diversos autores a zoonose emergente mais importante da atualidade (LIMA, 2005). Dentre os surtos de maior impacto de criptosporidiose estão os que ocorreram em 1987 na Geórgia (Estados Unidos), onde cerca de 13.000 pessoas foram acometidas, e em Saitama (Japão), em 1996, com 8.705 casos de infecção, sendo o *Cryptosporidium* spp. encontrado em amostras de água tratada e não tratada. Um dos surtos de maior destaque foi o ocorrido em Milwaukee e Wisconsin (Estados Unidos), em 1993, com 403.000 pessoas contaminadas pelo protozoário (LIMA; STAMFORD, 2003). Desde então, as pesquisas com *Cryptosporidium* spp. têm se destacado no cenário internacional.

Para o presente estudo, são especialmente relevantes os dois últimos gêneros de protozoários citados, a saber, *Giardia* e *Cryptosporidium*. Foram realizadas análises específicas para identificação e quantificação destes protozoários. O Ministério da Saúde recomenda desde 2004 a inclusão de pesquisa de cistos de *Giardia* spp., oocistos de *Cryptosporidium* spp., para controle da qualidade da água potável.

2.4. Agentes químicos presentes na água: foco para metais

Metais pesados são elementos químicos que possuem peso específico superior a 5g.cm^{-3} . São denominados de “elementos traço” por serem encontrados naturalmente em poucas partes por milhão (ppm) (MATTIAZZO-PREZOTTO, 1994). Diferentemente dos outros compostos tóxicos, os metais pesados não são sintetizados nem destruídos pelo homem, e a busca por novos produtos através da manipulação de minérios vêm causando uma alteração na distribuição desses compostos no Planeta (DEL RIO, 2004).

A contaminação de ecossistemas por metais pesados é decorrente do aumento das atividades industriais, uma vez que estes metais constituem-se em um dos principais resíduos provenientes de tais atividades (PALLU, 2006).

Outras fontes antropogênicas de metais pesados, além dos resíduos sólidos industriais, podem ser citadas, tais como os resíduos urbanos, como lodo de esgoto e águas residuárias, pesticidas, fertilizantes e combustão de combustíveis fósseis. Estes contaminantes se concentram no ar, nas águas superficiais ou subterrâneas e no solo, e alteram suas características bem como das áreas circundantes (ZEITOUNI, 2003).

Para Nikaido, (2009), o uso de efluentes urbanos na agricultura, como as águas residuárias e o lodo de esgoto apresentam diversos fatores benéficos ao meio ambiente e à agricultura, desde que seja monitorado para garantir a qualidade ambiental e da produção agrícola. Além da gama de agentes biológicos patogênicos que estes resíduos podem conter, seu uso indiscriminado na agricultura pode levar ao acúmulo de metais pesados no solo, levando a presença de níveis tóxicos destes elementos no solo e até nas plantas cultivadas e águas subterrâneas.

Há um interesse ao redor do mundo quanto à concentração de metais no ambiente. Sabe-se que o acúmulo de metais está relacionado a diversos riscos à saúde humana, uma vez

que produzem efeitos tóxicos que podem se manifestar através de sintomas neurológicos, hepáticos, renais e também neoplásicos, entre outros (GARCIA-GUINEA, et al., 2010). Os metais pesados possuem efeito bioacumulativo no organismo humano e os efeitos tóxicos podem se manifestar de forma aguda ou crônica. Dentre os mecanismos de toxicidade dos metais figuram as interações com os sistemas enzimáticos, membranas celulares e efeitos específicos sobre certos órgãos e sobre o metabolismo celular em geral (NIKAIDO, 2009). Estão relacionados a uma série de processos carcinogênicos, entretanto, a gravidade dos efeitos tóxicos destes metais depende do grau de exposição (SEGURA-MUÑOZ, 2002).

A alimentação é a principal fonte de contaminação humana por metais pesados, e cerca de 70% da exposição a esses elementos ocorre por via oral. Esta contaminação pode ocorrer durante o uso de águas contaminadas na produção de alimentos, especialmente os de origem vegetal, ou pelo solo contaminado de lavouras (DEL RIO, 2004).

No presente estudo, foi avaliada a concentração dos seguintes metais:

- *Arsênio (As)*: é um elemento químico de ocorrência natural na crosta terrestre, de número atômico 33 e massa atômica 75, classificado entre os semimetais ou metalóides. O uso terapêutico de arsênio data de 400 a.C., e existem relatos de sua utilização por Aristóteles e Hipócrates, mas seu uso como veneno se disseminou durante a Idade Média (GONTIJO; BITTENCOURT, 2005). Na indústria é utilizado como metal aditivo em ligas metálicas, mas também há registros do uso de compostos de As como pesticida e como preservantes de madeira. O As está relacionado a diversas manifestações clínicas, e a forma de intoxicação mais comum é por via oral, através de água e alimentos contaminados. O As inorgânico tende a ser mais tóxico que em sua forma orgânica, entretanto a gravidade dos efeitos da intoxicação depende também de outros fatores, como a dose, a idade do indivíduo afetado e a sua suscetibilidade a esse elemento (JOMOVA et al., 2011). Intoxicações por As ingerido pela água estão relacionadas ao desenvolvimento de alguns tipos de câncer, mais frequentemente no pulmão, e esse elemento vem sendo abordado como um já conhecido indutor de aberrações cromossômicas (SMITH; STEINMAUS, 2010, MARTINEZ et al., 2011). A exposição crônica ao As também pode levar ao desenvolvimento de lesões na pele, como hiperqueratose e hiperpigmentação e a efeitos cardiovasculares (JOMOVA et al., 2011).

- *Berílio (Be)*: é o primeiro metal do grupo dos alcalino-terrosos da Tabela Periódica. Possui número atômico 4, massa atômica 9 e coloração cinza-prateado. É muito utilizado no enriquecimento de ligas metálicas de cobre, mas também tem aplicações específicas, dadas algumas de suas características físicas, como por exemplo, em reatores de fusão nuclear e na indústria aeronáutica. Possui também grande aplicabilidade na fabricação de eletrônicos. O Be é conhecido por causar diversos danos à saúde humana, especialmente ao ser inalado ou por contato por via dérmica (STRUPP, 2010). As principais manifestações clínicas associadas à intoxicação aguda por Be envolvem nasofaringites, traqueobronquites e outras inflamações pulmonares, bem como reações na pele (SAWYER; MAIER, 2011).
- *Cádmio (Cd)*: foi descoberto em 1817 por Fredrich Stromeyer como impureza de carbonato de zinco. Os seus principais usos estão em revestimentos metálicos para a indústria automobilística e de telecomunicações, na estabilização de plásticos, nas indústrias de baterias e fungicidas, e está presente em fertilizantes fosfatados, lixo urbano, lodo de esgoto, e em locais de mineração, principalmente na extração de zinco. O Cd tem sido associado à hipertensão, câncer de próstata, ruptura de sistemas enzimáticos complexos e a distúrbios, como a puberdade precoce (DEL RIO, 2004). Estudos recentes têm sugerido que a exposição ao Cd está também associada ao desenvolvimento de alguns tipos de diabetes, bem como a doenças renais associadas (EDWARDS; PROZIALECK, 2009). Exposições prolongadas a altas doses de Cd causam a doença de Itai-itai, que afeta principalmente mulheres e provoca doenças renais severas e osteomalácia em vários níveis de osteoporose, resultando em múltiplas fraturas (SATARUG, et al., 2010).
- *Chumbo (Pb)*: tem coloração cinza-azulada e é resistente a corrosão, com baixo ponto de fusão e ocorre naturalmente na crosta terrestre, geralmente combinado a outros elementos, formando compostos de Pb. É liberado no ambiente a partir de fontes naturais como emissões vulcânicas, mas a principal responsável pela alta concentração de chumbo encontrada no ambiente é a atividade antropogênica, especialmente com o uso da gasolina aditivada com composto desse metal. A maior parte do Pb liberado no ambiente permanece próximo à fonte de emissão, mas algumas partículas de pequeno diâmetro são

transportadas por longas distâncias, podendo ser encontradas em locais distantes, como em geleiras. Esta poeira de Pb causa contaminação ambiental e de alimentos e contribui para a exposição da população. Para a população em geral, a principal forma de exposição ao Pb é por via oral. Quando da exposição em níveis baixos, os principais efeitos em humanos são a elevação da pressão sanguínea e a diminuição na taxa de filtração glomerular. Os efeitos mais preocupantes de exposições ambientais ao Pb são os renais, cardiovasculares, hematológicos, e em crianças, os efeitos neurológicos, influenciando no desenvolvimento do cérebro (KUNO, 2009). Algumas pesquisas apontam que a exposição ao Pb pode estar associada a algumas doenças neurológicas, como danos cerebrais e lesões nos nervos, problemas comportamentais, mal de Alzheimer, mal de Parkinson e esquizofrenia (SANDERS, et al., 2009).

- *Cobre (Cu)*: a descarga mundial de resíduos de mineração e poeira são a maior fonte sólida de Cu seguida pela produção de fertilizantes, esgoto municipal e industrial. O Cu integra diversas proteínas e enzimas e participa de diversos processos biológicos, e portanto é essencial aos seres vivos (ABBOTT, 2007). Entretanto, uma dose única elevada ou uma alta exposição em longo prazo pode trazer problemas à saúde. A inalação de poeira ou vapores pode irritar o nariz, a boca e os olhos e causar dores de cabeça, tontura náusea e diarreia (NIKAIDO, 2009). Entretanto, a ingestão de cobre com água e alimentos contaminados é apontada como a principal maneira de intoxicação por esse metal. O exemplo mais conhecido de toxicidade do cobre é a Doença de Wilson, uma doença autossômica recessiva. Essa doença é o principal fator associado ao acúmulo de cobre no fígado em humanos e constitui-se em um modelo natural de efeitos tóxicos graves que o excesso de cobre ocasiona, com ampla variedade e gravidade das manifestações clínicas (ROMAÑA, et al., 2011)
- *Estanho (Sn)*: trata-se de um dos mais antigos metais conhecidos pelo homem. O uso do bronze (liga de cobre e estanho) na manufatura de utensílios e ferramentas data de 3500 a. C. O Sn é um elemento classificado como metálico não-ferroso, de número atômico 50. É utilizado na indústria, no revestimento

de placas de metais e na fabricação de ligas metálicas (RODRIGUES, 2001). O Sn apresenta maior toxicidade em suas formas metiladas. O dimetil estanho é associado à efeitos teratogênicos e no desenvolvimento, e há indícios de acúmulo de Sn nos tecidos nervosos de animais expostos à esse composto (MOSER; MCGEE; EHMAN, 2011). Intoxicações agudas por estanho em sua forma trimetilada acarretam variadas manifestações neurológicas, que envolvem principalmente o sistema límbico (TRABUCO et al., 2009).

- *Ferro (Fe)*: trata-se de um metal de transição, de número atômico 26. É extraído da natureza na forma de minérios de Fe, e é o quarto elemento mais comum na crosta terrestre. É utilizado em diversos processos, inclusive fabricação de aço, ao ser enriquecido com carbono. O Fe um elemento que atua como nutriente no organismo, mas o seu excesso, assim como a sua deficiência, pode causar danos à saúde. Sabe-se que o Fe em excesso está associado à doenças neurodegenerativas, gastrointestinais, endócrinas, oftálmicas, entre outras (WEINBERG, 2010), e também apresenta potencial genotóxico (LIMA et al., 2011). A saúde humana depende da manutenção de níveis moderadamente baixos de Fe no sangue, suficientes para a realização de suas funções metabólicas (WEINBERG, 2010).
- *Manganês (Mn)*: é muito comum no ambiente, sendo o quinto metal mais abundante na Terra. O Mn é um metal essencial para as funções metabólicas, e dentre esta, participa da mineralização dos ossos da regulação do metabolismo celular. Contudo, quando há exposição em altas concentrações, é tóxico para o organismo. Intoxicações por este metal ocorrem geralmente através da via pulmonar. Exposições agudas em doses elevadas de Mn podem causar alterações hepáticas, biliares e irritação gastrointestinal. Exposições crônicas estão estreitamente relacionadas à doenças pulmonares. Intoxicações por Mn também apresentam efeitos neurotóxicos, e os sintomas incluem perda de memória e da concentração, fadiga, dores de cabeça, perda do equilíbrio, insônia, entre outros (MENEZES-FILHO et al., 2009; SARAIVA, 2009).
- *Mercúrio (Hg)*: ocorre naturalmente no ambiente e existe sob várias formas, como Hg elementar (mercúrio metálico), espécies de Hg inorgânico e de Hg orgânico. O Hg metálico é um metal brilhante, branco prateado e líquido à

temperatura ambiente. As emissões de mercúrio naturais ocorrem pela atividade vulcânica, desgaste de rochas e da crosta terrestre. Dentre as fontes antropogênicas de Hg destacam-se a queima de combustíveis fósseis, a mineração e a incineração de lixo urbano. As concentrações de Hg na água para consumo humano são geralmente baixas, e no solo as concentrações mais altas aparecem em áreas urbanas e próximas a fontes de emissão. Devido ao transporte por todo o ambiente e sua bioacumulação, a principal fonte de exposição da população geral ao Hg é pela alimentação, contudo, a sua toxicidade depende da espécie química ingerida. Uma das formas mais facilmente absorvidas pelo trato gastrointestinal é o metilmercúrio (MeHg), e uma vez absorvido, este passa rapidamente para a corrente sanguínea onde é transportado para outras partes do corpo. O MeHg pode ser metabolizado a mercúrio inorgânico, que se acumula principalmente nos rins, mas esta transformação pode ocorrer também no cérebro. Estudos em populações expostas a MeHg sugerem uma associação ao aumento de casos de doenças cardiovasculares (KUNO, 2009). O Hg, nas formas orgânica e inorgânica, tem sido associado a uma série de disfunções no sistema nervoso, com sintomas variados, como perda de memória, diminuição da coordenação, da sensibilidade e de funções cognitivas, tremores anormais, excitação, ansiedade e mudanças na personalidade, que podem levar a um quadro de demência. Pode também haver atrofia muscular severa e lesões renais em casos de exposição prolongada ou excessiva (SEGURA-MUÑOZ, 2002; TABER; HURLEY, 2008).

- *Tálio (Tl)*: é um elemento metálico de cor acinzentada e número atômico 81, que foi acidentalmente descoberto por Sr. Willian Crookes, em 1861. É um elemento-traço distribuído por toda a crosta terrestre, mas em concentrações muito baixas, e é utilizado em ligas metálicas especiais e em eletrônicos. (GALVÁN-ARZATE; SANTAMARÍA, 1998). Geralmente, casos de exposição natural ao Tl acontecem por via oral, especialmente por meio de frutas e verduras contaminadas. Estudos vêm mostrando que o Tl é mais tóxico para mamíferos do que Hg, Cd, Cu, Pb e Zn. Intoxicações agudas por Tl podem levar a quadros de vômito, diarreia, queda de cabelo temporária e danos no coração, pulmões, rins, fígado e no sistema nervoso (PETER;

VIRARAGHAVAN, 2005). Não se conhece exatamente os mecanismos de toxicidade do Tl, mas normalmente ele compete com os íons de potássio nos processos fisiológicos nos quais esse elemento participa. Devido ao alto potencial do Tl em causar diversos agravos à saúde humana, padrões de qualidade para a concentração máxima tolerável desse metal em água potável e alimentos foram definidos por diversas organizações, como a World Health Organization (WHO), a US Environmental Protection Agency (USEPA) e European Health Committee (CDSP) (CVJETKO; CVJETKO; PAVLICA, 2010).

- *Vanádio (V)*: tem número atômico 23, situando-se no grupo VB da Tabela Periódica, e pode ser encontrado em diversos minerais. Devido à sua dureza, o V é comumente utilizado na produção de aço duro, utilizado na fabricação de máquinas, ferramentas e na indústria automobilística, e de outras ligas metálicas. Para a população em geral, a principal fonte de exposição ao V é através de alimentos contaminados. Também são relatados casos de exposição ocupacional, por inalação de V (BARCELOUX, 1999). Dependendo das concentrações de V no sangue, podem ser observados efeitos adversos à saúde em mamíferos, como perda de peso e toxicidade para reprodução e desenvolvimento (DOMINGO, 1996).
- *Zinco (Zn)*: é um metal muito utilizado em ligas de bronze e latão e integra baterias e componentes elétricos. Está envolvido na síntese de RNA e DNA e é necessário para o crescimento e divisão celular, para o bom funcionamento do sistema imunológico, cicatrização, atividade enzimática, e síntese de proteínas (SCHNEIDER, 2006). Entretanto, em altas concentrações pode apresentar efeitos tóxicos. Em humanos e animais, o excesso de Zn pode acarretar em diarreia, irritação e corrosão do trato gastrointestinal, danos ao pâncreas e anemia (SEGURA-MUÑOZ, 2002; NIKAIDO, 2009). Em longo prazo, o zinco em altas concentrações interfere na absorção de cobre pelo organismo e muitos dos seus efeitos tóxicos são de fato causados pela deficiência de cobre (PLUM; RINK; HAASE, 2010).

No Brasil, a legislação vigente para a concentração de metais em hortaliças é escassa. Há apenas o Decreto 55.871, de 26 de março de 1965, disponibilizado pela ANVISA, que

trata da concentração de contaminantes inorgânicos e aditivos para alimentos, que traz as concentrações permitidas de Sb, As, Cd, Cu, Cr, Sn, Hg, Ni, Se e Zn para alimentos em geral, e especifica para hortaliças apenas a o limite máximo de tolerância para Pb. A Portaria ANVISA 685 de 27 de agosto de 1998, estabelece os limites máximos de contaminantes inorgânicos em diversos grupos de alimentos baseada em referências do Codex Alimentarius. Entretanto, o único contaminante que tem seu valor regulamentado no grupo de alimentos no qual as hortaliças se enquadram é o Cu. Esse quadro evidencia a necessidade de mais estudos referentes às concentrações permitidas de metais em hortaliças de tal maneira que não causem danos à saúde humana.

2.5. Reuso de água

O reuso de água não é um conceito novo, sendo praticado ao redor do mundo há séculos. Há relatos de sua prática desde a Grécia Antiga, com a disposição de esgotos e sua utilização na irrigação (CETESB, 2010).

Como o crescimento populacional, sobretudo nos centros urbanos, é um fato, há necessidade de se buscar formas de reaproveitamento de água, para que a água potável oriunda dos reservatórios naturais possa ser destinada a usos prioritários, como o consumo humano. Nestas condições, Hespanhol (2003) aponta reuso e conservação como palavras chave em termos de gestão de recursos hídricos. Deve-se considerar o reuso de água como parte de uma atividade mais abrangente, que é o uso racional da água, o qual compreende também o controle de desperdícios e perdas e a minimização da produção de efluentes e do consumo de água. Sendo assim, os esgotos e efluentes tratados têm parte fundamental no planejamento e na gestão sustentável dos recursos hídricos.

O reaproveitamento de águas residuárias contribui para a economia deste recurso, ajudando a reduzir a demanda sobre os mananciais de água bruta, que podem ser destinados a usos mais nobres. Esta prática, que vem sendo muito discutida e já é utilizada em alguns países, baseia-se no conceito de substituição de mananciais. Esta substituição passa a ser viável em função da qualidade de água requerida para um uso específico (CETESB, 2010).

Sistemas de reuso adequadamente planejados e administrados trazem melhorias ambientais e de condições de saúde, pois evitam a descarga de esgotos em corpos de água,

preservam os recursos subterrâneos, permitem a conservação do solo através da acumulação de húmus, aumentando a resistência à erosão, e contribuem para o aumento da produção de alimentos (HESPANHOL, 2003). Ainda, grandes volumes de água potável podem ser poupados pelo reuso quando se utiliza água de qualidade inferior para atender as demandas que podem não exigir uma alta qualidade deste recurso. Com isso, os sistemas de reuso ajudam a elevar os níveis de saúde, qualidade de vida e condições sociais de populações humanas e a preservar os recursos naturais.

Basicamente, o reuso da água pode ocorrer de maneira direta ou indireta, através de ações planejadas ou não. A Organização Mundial de Saúde, OMS (1973) define:

- *Reuso indireto*: a água já utilizada uma ou mais vezes, para uso doméstico e industrial, é lançada nas águas superficiais ou subterrâneas e utilizada novamente a jusante, já diluída.
- *Reuso direto*: é o uso planejado e deliberado de esgotos tratados para certas finalidades, como irrigação, uso industrial, recarga de aquífero e água potável.
- *Reciclagem interna*: o reuso de água internamente às instalações industriais, tendo como objetivo a economia de água e o controle de poluição.

A Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental (ABES) adota a classificação elaborada por Westerhoff em 1984, que categoriza reuso da água como reuso potável, (direto ou indireto) e reuso não potável (com finalidade agrícola, industrial e doméstica), devido à sua praticidade. Com base nestas e em outras classificações de reuso da água, Brega Filho e Mancuso (2003) propuseram as seguintes definições:

- *Reuso potável direto*: quando o esgoto recuperado, por meio de tratamento avançado, é diretamente reutilizado no sistema de água potável.
- *Reuso potável indireto*: caso em que o esgoto, após tratamento, é disposto na coleção de águas superficiais ou subterrâneas para diluição, purificação natural e subsequente captação, tratamento e finalmente utilizado como água potável.
- *Reuso não potável para fins agrícolas*: embora ocorra a recarga de aquíferos como subproduto desta prática de reuso, o seu objetivo é a irrigação de plantas alimentícias, tais como árvores frutíferas, cereais, etc., e plantas não alimentícias, como pastagens e forrações.

- *Reuso não potável para fins industriais*: abrange os usos de refrigeração, águas de processo, para utilização em caldeiras, entre outros.
- *Reuso não potável para fins recreacionais*: quando o efluente é utilizado para abastecer locais destinados à recreação pública, como por exemplo, para irrigação de plantas ornamentais, campos de esportes, parques e para o enchimento de lagoas ornamentais e piscinas públicas.
- *Reuso não potável para fins domésticos*: o reuso da água é designado a atender as várias atividades que admitem água de qualidade inferior à potável, como por exemplo, irrigação de jardins residenciais e utilização em grandes edifícios.
- *Reuso para manutenção de vazões*: a manutenção de vazões de cursos de água promove a utilização planejada de efluentes tratados, visando a uma adequada diluição de eventuais cargas poluidoras a eles. Permite também a manutenção da vazão mínima em tempos de estiagem.
- *Reuso na aquicultura*: utilização de efluentes ricos em nutrientes na criação comercial de anfíbios, peixes e plantas aquáticas
- *Reuso não potável para recarga de aquíferos*: consiste na utilização de efluentes domésticos tratados na recarga artificial de aquíferos. Pode ser feita de forma direta, pela injeção sob pressão, ou de forma indireta, utilizando-se águas superficiais que tenham recebido descargas de efluentes tratadas a montante.

Hespanhol (2003) propõe o esquema ilustrado na Figura 2 para descrever quais os tipos básicos de reuso da água proveniente de esgotos domésticos e industriais tratados, bem como seus usos potenciais. Estas medidas podem ser implantadas tanto em áreas urbanas quanto em áreas rurais.

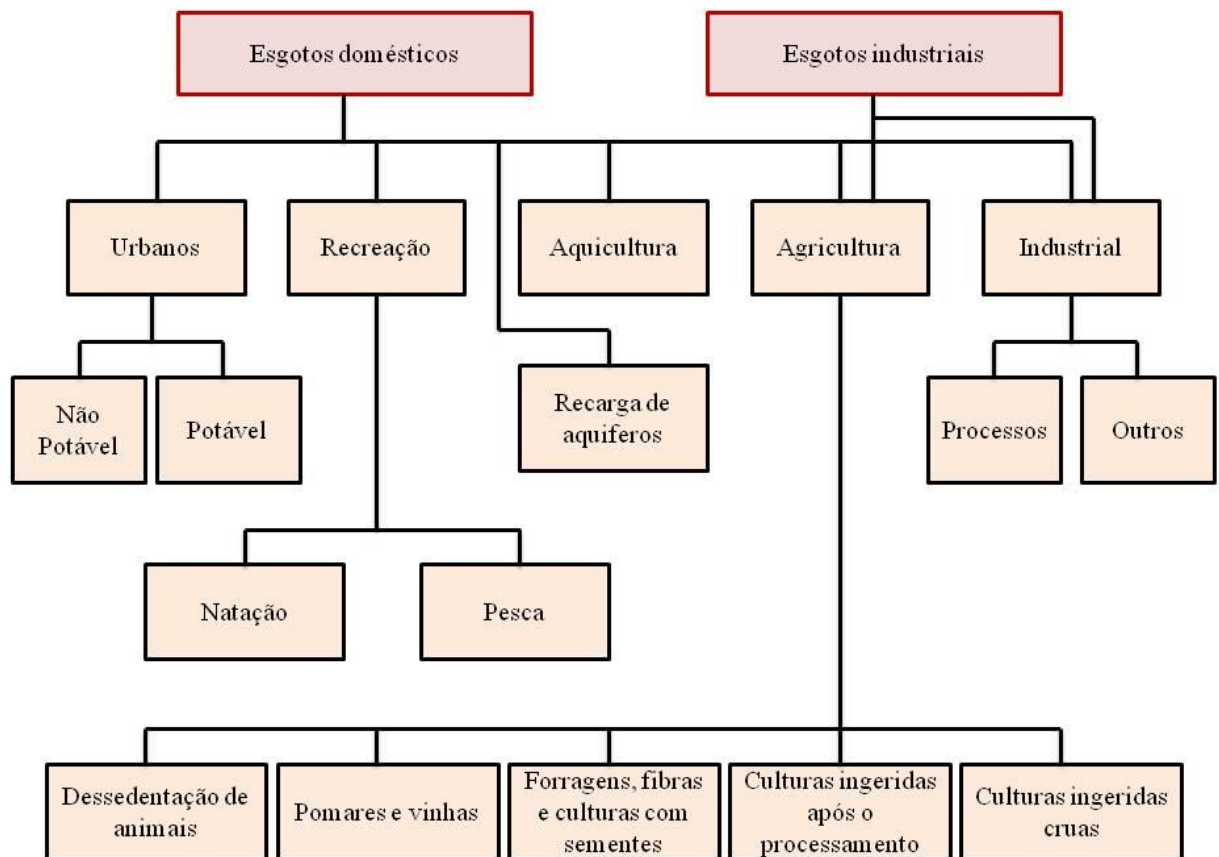


Figura 2 - Aplicações para o reúso da água. Adaptado de Hespanhol, 2003

2.6. Reuso de água na agricultura

A demanda total de água no mundo é de aproximadamente 11% da vazão média dos rios. Verifica-se que cerca de 50 a 70% deste total é utilizado na agricultura, sendo que nos países em desenvolvimento a demanda é ainda maior, alcançando 82% do consumo total de água. É de fundamental importância saber utilizar a água proveniente da chuva, dos rios, dos lençóis subterrâneos e de reúso; evitando-se assim a ostentação de abundância desse recurso natural fundamental para a sobrevivência humana (REBOUÇAS, 2001).

Dentre as opções hoje em estudo que objetivam a economia e preservação da água, o aproveitamento planejado das águas residuárias tratadas na agricultura é bastante eficaz na proposta de uso racional da água, controle da poluição de corpos d'água, reciclagem de nutrientes e aumento de produção agrícola, desde que esteja de acordo com padrões determinados pelas legislações vigentes (MEHNERT, 2003). O reúso de água na agricultura

se enquadra em “reuso direto” das águas, pois, de maneira planejada, os efluentes tratados são transportados diretamente de seu ponto de descarga até o local do reuso, não sendo liberados no meio ambiente.

A utilização de água residuária tratada na agricultura pode ser importante não apenas como fonte extra de água, mas também como fonte de nutrientes, auxiliando no desenvolvimento da cultura irrigada. Segundo Medeiros et al. (2008), estudos realizados em diversos países demonstraram que a produtividade agrícola aumenta significativamente em áreas fertirrigadas com águas residuárias de origem doméstica, desde que sejam adequadamente manejadas.

Para a implantação de um programa de reuso da água na agricultura, devem ser considerados, entre outros aspectos, o controle rigoroso da qualidade físico-química e microbiológica da água utilizada, para que não haja danos para a saúde da população que a consumirá e para o meio ambiente. De acordo com o Centro Internacional de Referência em Reuso de Água (CIRRA), efluentes adequadamente tratados podem ser usados em culturas de alimentos não processados comercialmente, ou seja, efluentes podem ser utilizados na irrigação superficial de qualquer cultura alimentícia, incluindo aquelas consumidas cruas.

No Brasil, onde não há tradição na reciclagem dos resíduos gerados, o reuso das águas residuárias tratadas na agricultura não é uma prática muito difundida ou aceita pela população. Ainda existem ressalvas relacionadas à utilização dessas águas na irrigação de hortas, mesmo quando da comprovação científica de sua qualidade microbiológica (SANTOS; SOUZA, 2000; MEDEIROS et al., 2008). Isso mostra que são necessários mais estudos e pesquisas que avaliem a possibilidade de utilização de águas residuárias municipais tratadas na agricultura, para assim, contribuir com a pesquisa e maior utilização de água de reuso, especialmente no setor agrícola, principal atividade econômica brasileira.

Devido aos seus benefícios, os alimentos de origem vegetal têm sido amplamente consumidos pela população nas últimas décadas, principalmente na sua forma crua. Entretanto, é importante lembrar que a busca por uma alimentação mais saudável vem aumentando o risco de transmissão de doenças veiculadas por esses alimentos, associado às condições nas quais esses produtos são cultivados e expostos durante o período de produção e distribuição (GARG; CHUREY, 1990; MADDEN, 1992; RODRIGUES et al. 2004).

Dentre as hortaliças mais consumidas no mundo e no Brasil destaca-se a alface, cujo nome científico é *Lactuca sativa*. Atualmente, é a hortaliça folhosa de maior valor comercial

cultivada no Brasil, principalmente nas regiões Sul e Sudeste, sendo consumida com maior frequência na sua forma crua em saladas e sanduíches (VIGGIANO, 1990; SILVA, 2005). Outra hortaliça amplamente consumida é a rúcula (*Eruca sativa*), originária da região mediterrânea e muito popular nas regiões de colonização italiana no Brasil. É rica em vitaminas A e C e em sais minerais (EMBRAPA, 2007). Segundo dados do Instituto Agrônômico (IAC) (2009), a quantidade de rúcula comercializada na Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP) aumentou de 140 mil dúzias de maços em 1997 para cerca de 600 mil em 2006, explicitando a elevação do consumo desta hortaliça pela população e sua importância econômica entre as demais hortaliças folhosas.

As boas práticas de higiene, desde o plantio até o momento do consumo das hortaliças, são fatores fundamentais para garantir sua qualidade. Durante o plantio a contaminação da hortaliça pode ocorrer diretamente através do uso de águas poluídas e águas de reuso não tratadas para a sua irrigação e através do uso de adubos e esterco contaminados. Na colheita e no processamento das hortaliças as más condições de higiene e modos de preparo e/ou armazenamento inadequados são fatores que podem interferir diretamente na proliferação de microorganismos desses alimentos (OLIVEIRA; GERMANO, 1992; SIMÕES et al., 2001). Quando a qualidade da matéria-prima desses alimentos é afetada, a sobrevivência e/ou a multiplicação de microorganismos pode ser alterada, tornando esse produto “saudável” em potencialmente contaminado (ALZAMORA, 2000; SILVA, 2007).

A água contaminada com parasitas e outros compostos tóxicos, utilizada durante a irrigação das hortas, é uma forma comum de contaminação dos vegetais. Em vários estudos é mencionada a possibilidade de transmissão de parasitoses ao homem por meio da ingestão de hortaliças consumidas cruas, provenientes de hortas irrigadas e adubadas com contaminantes de dejetos fecais (SILVA et al., 1995; MESQUITA et al., 1999; TAKAYANAGUI et al., 2000).

Considerando a inclusão cada vez maior de hortaliças na dieta da população humana, o controle parasitológico, bacteriológico e toxicológico das mesmas torna-se imprescindível, principalmente quando se verifica a globalização na distribuição de alimentos, a expansão nos serviços de alimentos comercializados, o surgimento de novos métodos de produção de alimentos em larga escala e o interesse cada vez maior dos consumidores por refeições de fácil aquisição e preparo (ALMEIDA, 2006; FALAVIGNA et al., 2005), a fim de evitar agravos à saúde pública e ao meio ambiente.

Em estudo realizado por Almeida (2006) foi avaliada a qualidade microbiológica de alfaces servidas em restaurantes *self-service* no município de Limeira (SP). Do total das amostras de alfaces coletadas, 88,6% estavam com níveis de contagem elevados para coliformes fecais. Em outro estudo, realizado por Saraiva et al. (2005), avaliou-se a presença de estruturas parasitárias em alfaces coletadas em distribuidores de hortaliças no município de São Carlos e Araraquara, no estado de São Paulo. Das 20 amostras coletadas 17 apresentaram positividade para algum tipo de parasita.

A utilização de efluentes na irrigação de hortaliças consumidas cruas necessita de monitoramento contínuo tanto do efluente utilizado quanto da hortaliça em questão. A avaliação de microrganismos e metais pesados presentes nas hortaliças é de grande importância para a saúde pública uma vez que fornece dados sobre as condições higiênicas envolvidas no cultivo da horta, produção, armazenamento, transporte e manuseio desses produtos e, portanto, sobre os riscos de contaminação dos seus consumidores, fornecendo dados relevantes sobre a potencialidade do reuso de água na agricultura como uma prática sustentável.

Este estudo teve por finalidade avaliar a hipótese sobre a viabilidade do reuso de águas provenientes da Estação de Tratamento de Esgotos de Ribeirão Preto (ETE-RP) para irrigação de hortaliças. Nesse sentido, foi conduzido um projeto para a comparação da qualidade parasitológica e toxicológica das hortaliças comercializadas do município com as produzidas experimentalmente na ETE-RP.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Comparar a qualidade parasitológica e toxicológica entre hortaliças cultivadas com água de reuso e hortaliças comercializadas em feiras livres do município de Ribeirão Preto – SP.

3.1. Objetivos específicos

- Comparar quantitativa e qualitativamente a presença de estruturas parasitárias entre hortaliças cultivadas com água de reuso e hortaliças comercializadas em feiras livres do município.

- Comparar as concentrações de metais entre hortaliças cultivadas com água de reuso e hortaliças comercializadas em feiras livres de Ribeirão Preto – SP.

- Avaliar a viabilidade da utilização de água residuária tratada e clorada na produção de hortaliças, a partir da avaliação de alface (*Lactuca sativa*) e rúcula (*Eruca sativa*).

4. Material e Métodos

4.1. Local de Estudo

O presente estudo foi desenvolvido no município de Ribeirão Preto, localizado na região Nordeste do Estado de São Paulo. O município possui uma população de 563.107 habitantes e uma área de 650 km² (IBGE, 2009). A cidade de Ribeirão Preto tem cerca de 1.300 indústrias, todas as suas 135 mil residências recebem água encanada e 97% delas estão ligadas à rede coletora de esgoto, onde são coletados aproximadamente 100 milhões de litros de esgotos por dia (AMBIENT, 2009).

Ribeirão Preto caracteriza-se como um município tipicamente urbano, sendo suas principais atividades centradas no comércio e na prestação de serviços. Nesses setores se concentra cerca de 80% da população economicamente ativa do município (SÃO PAULO, 2010b). No entanto, o dinamismo dessas atividades sofre influência significativa da agricultura, que se desenvolve ao seu redor (RIBEIRÃO PRETO, 2009). A Figura 3, apresentada a seguir, mostra a localização do município de Ribeirão Preto dentro da Unidade Administrativa e do Estado de São Paulo.



Figura 3 - Localização do município de Ribeirão Preto.

Fonte: Adaptado do Instituto Geográfico e Cartográfico (IGC). Secretaria de Economia e Planejamento do Estado de São Paulo. 2010.

4.2. Amostras

Para o estudo, foram coletadas amostras de alface (*Lactuca sativa*), variedade americana, e rúcula (*Eruca sativa*). Para a alface, a amostra é constituída por um pé, independente de peso ou tamanho; e, para a rúcula, um maço. Uma parte das amostras obtidas para o desenvolvimento desse estudo foi coletada em feiras livres que ocorrem diariamente no município de Ribeirão Preto. Outra parte foi cultivada experimentalmente na Estação de Tratamento de Esgotos de Ribeirão Preto. As amostras foram coletadas nas feiras entre fevereiro e abril de 2011 e as amostras provenientes da horta experimental foram coletadas entre abril e julho de 2011.

4.2.1. Amostras de hortaliças comercializadas em Ribeirão Preto

As amostras de hortaliças foram coletadas nas feiras de agricultores que acontecem diariamente em pontos distintos da cidade de Ribeirão Preto (Figura 4). Boa parte do material comercializado nestas feiras é produzida no próprio município. De acordo com o Projeto Censitário das Unidades de Produção Agropecuária do Estado de São Paulo (Projeto LUPA, 2007/2008) (SÃO PAULO, 2010a), Ribeirão Preto conta com 61 produtores de alface. A rúcula é uma cultura secundária e, geralmente, os produtores de alface também cultivam esta hortaliça.



Figura 4 - Coleta de amostras de alface (*Lactuca sativa*) e rúcula (*Eruca sativa*) nas feiras livres.

Em cada visita às feiras foram coletadas duas amostras de alface (*Lactuca sativa*) e duas de rúcula (*Eruca sativa*) e foram levadas ao Laboratório de Ecotoxicologia e Parasitologia Ambiental da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto (LEPA/EERP), onde foram realizadas as análises parasitológicas e foi feita a digestão ácida para análise de metais.

Para as análises de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. foram coletadas cinco amostras provenientes de feiras comerciais, que foram igualmente levadas ao LEPA/EERP para realização das análises específicas.

4.2.2. Amostras da horta experimental

A horta experimental foi construída na Estação de Tratamento de Esgotos de Ribeirão Preto, onde foram cultivadas alface e rúcula (Figura 5). Foram construídos oito canteiros no total, sendo quatro para rúcula (*Eruca sativa*) e quatro para alface (*Lactuca sativa*). Dois canteiros de cada hortaliça foram irrigados com efluente tratado e clorado da ETE-RP e os outros dois, irrigados com água potável, para controle. O efluente tratado utilizado na irrigação foi coletado na Fonte de Saída de efluentes da Estação. Já no local da horta, 2h antes da irrigação, o esgoto tratado recebeu a adição de cloro a $0,1 \text{ mg L}^{-1}$, para diminuição da carga de microrganismos patogênicos.



Figura 5 - Horta experimental cultivada em área cedida pela ETE-RP.

A Figura 6 ilustra a coleta de amostras na horta experimental. Ao chegarem ao Laboratório de Ecotoxicologia e Toxicologia Ambiental da EERP, essas amostras foram submetidas às mesmas análises que as amostras provenientes das feiras livres.



Figura 6 - Coleta de amostras de rúcula (*Eruca sativa*) na horta experimental na ETE-RP.

Para as análises de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. foram coletadas cinco amostras de alface (*Lactuca sativa*).

4.3. Coleta, preparo e análise das amostras

4.3.1. Coleta e preparo de amostras

Nas feiras, cada visita resultou na coleta de quatro amostras, sendo duas de alface (*Lactuca sativa*) e duas de rúcula (*Eruca sativa*). Foram coletadas 10 amostras de cada canteiro para as análises microbiológicas e de metais. Foram 20 amostras de alface e 20 de rúcula dos canteiros irrigados com efluente tratado e clorado (Figura 7). Também foram coletadas amostras dos canteiros irrigados com água potável, para controle.

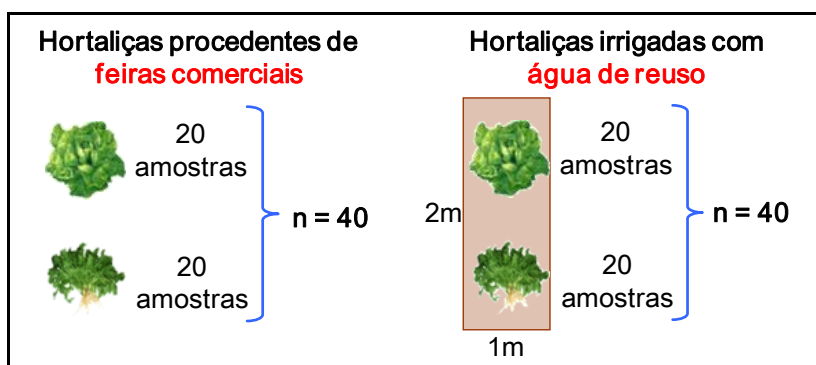


Figura 7 - Diagrama amostral das hortaliças adquiridas em feiras livres e coletadas na horta experimental.

As amostras para o exame microbiológico foram acondicionadas e identificadas, sendo levadas ao laboratório para realização das análises. Todo o material utilizado no processamento das amostras foi previamente esterilizado em autoclave.

Para assegurar a eficiência de esterilização das autoclaves do LEPA, foram realizados controles microbiológicos. Na autoclave horizontal (ODONTOBRÁS[®] MK300 12 l) e vertical (FABBE-PRIMAR[®] 30 l) foram colocadas as ampolas contendo esporos bacterianos do microrganismo *Geobacillus stearothermophilus* para realização do controle positivo e negativo. O bioindicador utilizado foi Sterikon[®] Plus Bioindicador. A Figura a seguir mostra as ampolas das autoclaves com os testes positivo e negativo.



Figura 8 - Controle positivo e negativo do bioindicador Sterikon[®] Plus Bioindicador após a esterilização, utilizado no Laboratório de Ecotoxicologia e Parasitologia Ambiental (LEPA), EERP/USP.

No laboratório, cada pé de alface (*Lactuca sativa*) e maço de rúcula (*Eruca sativa*) foi desfolhado, individualmente, colocado em recipientes plásticos e lavado com 700 mL de água destilada, folha por folha no saco plástico. Cada saco plástico foi agitado manualmente por 15 minutos (MESQUITA et al., 1999).

4.3.2. Análise parasitológica

Para a verificação da presença de ovos, cistos e larvas de parasitas nas hortaliças foi utilizada a Técnica de Lutz, ou Técnica de Sedimentação Espontânea, que compreende os seguintes passos: cerca de 500 mL da água proveniente da lavagem das hortaliças, após filtragem com auxílio de um funil e com gaze cirúrgica dobrada em 4 vezes, foi transferida para cálices de fundo cônico para decantar por um período de 2 até 24 horas (Figura 9). Após

o período de decantação, o sobrenadante foi descartado e os sedimentos do cálice homogeneizados. Foi coletada uma gota do material sedimentante com auxílio de uma pipeta graduada tipo Mohr para a análise em microscópio óptico com aumento de 100 e 400 vezes (Nikon Eclipse E200) (NEVES, 2005c).



Figura 9 - Cálices utilizados para a sedimentação das amostras durante a análise parasitológica.

Análise no microscópio óptico: o conteúdo proveniente do sedimento do cálice de cada amostra foi depositado sobre uma lâmina microscópica não lapidada, com espessura entre 1 e 1,2 mm, e corado com solução de lugol, evitando a formação de bolhas de ar. A lâmina foi então coberta com uma lamínula e levada ao microscópio óptico, onde foi analisada a presença/ausência de microrganismos patogênicos, identificando-os.

4.3.3. Análise de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp.

A técnica empregada para esta análise é recomendada pela Environmental Protection Agency (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos) – USEPA (2005), conhecida como Técnica de Separação Imunomagnética com utilização de Microscopia de Imunofluorescência e Contraste de Fase, método 1623. Para eluição dos cistos e oocistos das folhas, utilizou-se a técnica padronizada por Cook et al., 2006 (COOK et al., 2007; AMORÓS; ALONSO; CUESTA, 2010; RZEŽUTKA et al., 2010).

Foram coletadas cinco amostras de cada tratamento, sendo: cinco amostras de hortaliças irrigadas com efluente tratado/clorado da ETE e cinco provenientes das feiras comerciais, além das irrigadas com água potável.

De acordo com Cook et al. (2006), a Técnica de Separação Imuno-Magnética com utilização de Microscopia de Imunofluorescência engloba as fases de: a) Eluição dos (oo)cistos e concentração da amostra; b) Separação imunomagnética; c) Marcação para imunofluorescência; e d) Microscopia. A partir da segunda fase, o método aplicado é o 1623 da USEPA. A primeira fase é específica para eluição de (oo)cistos de folhas de vegetais.

a) Eluição dos (oo)cistos e concentração da amostra

De cada amostra, constituída por um pé de alface (*Lactuca sativa*), foram descartadas as folhas externas e pesados 50 g das folhas restantes, que foram colocadas em saco para homogeneização de amostras Bag Light[®] Polysilk, com capacidade para 400 mL. Dentro da bolsa, foram acrescentados 200 mL de Glicina 1M com pH 5,5. O conteúdo foi homogeneizado no homogeneizador de amostras – STD tipo Stomacher (MK 1204, Boitton) por 1 minuto. Em seguida, o líquido presente dentro da bolsa foi distribuído em quatro tubos Falcon de 50 mL, espremendo bem a bolsa com as mãos para extrair a maior quantidade de líquido possível. Os tubos foram centrifugados a 2500 rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado em um béquer. O pellet foi ressuspensionado no vórtex e transferido para o tubo de Leighton. Os tubos Falcon foram lavados com aproximadamente 3 mL do sobrenadante e o conteúdo foi transferido para o tubo Leighton, até completar o volume de 10 mL.

b) Separação imunomagnética

Para realizar a separação imunomagnética, adicionou-se 1 mL do tampão SL-A 10x e 1 mL do tampão SL-B 10x (Dynabeads[®] CG-Combo, Invitrogen[™]) em cada tubo de Leighton contendo as amostras. Em seguida foram adicionados 100 µL de Crypto Dynabeads e 100 µL de Giardia Dynabeads, cujos tubos foram previamente agitados no vortex, e os tubos de Leighton foram então colocados no homogeneizador de soluções (modelo AP22, Phoenix) durante 1 hora, a 18 rpm e em temperatura ambiente.

Após esse período, os tubos foram transferidos para o concentrador magnético de partículas (MPC-1) e homogeneizados procedendo à agitação manual do tubo longitudinalmente num ângulo de 90° por 2 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi

descartado cuidadosamente, sem retirar o tubo do MPC-1. O tubo foi retirado do MPC-1 e adicionados 1 mL de tampão SL-A 1x concentrado, para lavagem. O conteúdo do interior do tubo foi homogeneizado com o auxílio de uma pipeta Pasteur de vidro. Após ser devidamente homogeneizado, o conteúdo do tubo foi transferido para eppendorf. Uma nova lavagem foi feita, agora com 0,5 mL de tampão SL-A 1x concentrado. O conteúdo foi adicionado ao restante já contido no eppendorf.

Os eppendorfs com as amostras foram então colocados no concentrador magnético de partículas MPC-M, onde foram agitados suavemente a um ângulo de 180° durante 1 minuto. Todo o sobrenadante foi descartado com o auxílio de um pipetador, inclusive as gotas retidas na tampa do eppendorf. O ímã do MPC-M foi retirado e em cada eppendorf foi acrescentado 100 µL de PBS. Os eppendorfs foram agitados no vortex e colocados em banho seco a 80°C durante 10 minutos. Após o banho seco os eppendorfs foram mais uma vez agitados no vortex para homogeneizar o seu conteúdo e então colocados novamente no MPC-M para dissociar a amostra das partículas magnetizadas. As amostras foram agitadas suavemente no MPC-M por 1 minuto. O sobrenadante contido em cada eppendorf foi pipetado para uma lâmina de três poços para fluorescência, completando-se assim a primeira dissociação.

Em seguida, foi acrescentado mais 100 µL de água destilada em cada eppendorf, agitando-os no vortex e levando-os novamente para o banho seco (IT2002H, Bioplus) a 80°C por 10 minutos. Os eppendorfs foram retirados do banho seco, agitados no vortex e novamente agitados no MPC-M por mais 1 minuto para realizar a segunda dissociação. O sobrenadante foi pipetado para a lâmina de três poços cuja disposição final é apresentada na Figura 10. As lâminas devem permanecer secando por no mínimo 1h, podendo ser deixadas *overnight*.

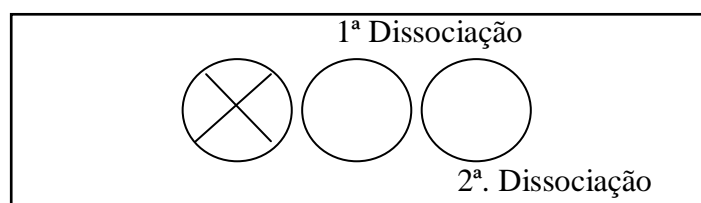


Figura 10 - Representação da disposição da amostra na lâmina de três poços para fluorescência.

Foram montadas lâminas com controle positivo, com suspensão PC101:1 que faz parte do kit Aqua-Glo™ e negativo, com água destilada, para treinamento da microscopia.

c) Marcação para fluorescência

Após o período de secagem, foi acrescentado em cada poço de cada lâmina uma gota de Metanol (aproximadamente 10 µL), suficiente para cobrir cada pocinho, para fixar o conteúdo da lâmina. As lâminas foram então colocadas a 40-45°C por 2-3 minutos para secar. Uma gota (aproximadamente 50 µL) de corante imunofluorescente Isotiocianato de Fluoresceína - FITC (A100FLR-1X, Aqua-Glo™ G/C) foi adicionada em cada um dos poços e as lâminas foram incubadas durante 30 minutos no escuro em câmara úmida. Em seguida, os poços foram lavados com 100 µL de PBS e o líquido é aspirado cuidadosamente com o auxílio de ponteira e pipetador. Foram adicionados 100 µL de corante 4',6-diamidino-2-fenilidol (DAPI) e as lâminas ficaram em repouso durante 5 minutos. Após o repouso foi retirado o excesso de corante e adicionado 10 µL do meio de montagem DABCO/glicerol em cada poço. Por fim, foi acrescentada uma lamínula sobre cada lâmina, que foi selada com esmalte e, após o período de secagem.

d) Microscopia

As observações foram realizadas empregando-se os aumentos de 250x, 400x e 600x, em microscópio que contém os filtros apropriados de epifluorescência (filtro de excitação: 450-490 nm; filtro de barreira: 520 nm). para a contagem do número de (oo)cistos presentes nas diversas preparações. Também foram realizadas observações com microscopia de contraste de fase e filtro DAPI para confirmação de detalhes morfológicos.

Teste de Eficiência da Separação Imunomagnética

Este procedimento é aplicado como teste de eficiência para se verificar o manuseio dos equipamentos e processos na etapa de purificação com o uso da Separação Imunomagnética.

Easy seed™ BTF (Biotechnology Frontiers Austrália): baseia-se em uma “suspensão teste” de cistos e oocistos contidos em um tubo de 5 mL, com número conhecido (100 oocistos e 100 cistos ± 1 DP) preservados em aproximadamente 1 mL de solução salina. Para a enumeração destes oocistos e cistos, onde o desvio padrão do número de (oo)cistos de cada tubo é menor que 2,5 é utilizada a citometria de fluxo. Cada tubo é selado e esterilizado

expondo cada lote a uma dose de radiação gama, garantido a estabilidade e inatividade dos organismos.

Os ensaios com água reagente foram realizados da seguinte maneira: em um frasco de Easy-Seed® adiciona-se 2 mL de solução Tween 20 0,05%, tampa-se e agita-se vigorosamente. Retira-se a tampa e o conteúdo do tubo é despejado na amostra, mantida em agitação, que no caso desse teste, constituiu-se de 200 mL de glicina 1M, pH 5,5, líquido utilizado na eluição dos (oo)cistos nas verduras. Não foram utilizadas amostras de verduras no teste Easy-Seed, mas apenas a água reagente. Adiciona-se 3 ml de água reagente no frasco, tornando a fechá-lo e agitá-lo vigorosamente. Após este procedimento, transfere-se o conteúdo total do frasco para a amostra a ser analisada, repetindo-se esse procedimento por mais uma vez. Os procedimentos de concentração da amostra, separação imunomagnética, marcação para fluorescência e microscopia foram feitos da mesma maneira que em uma amostra comum. O teste Easy-Seed foi repetido quatro vezes, para verificação da eficiência da técnica e dos reagentes.

Color Seed TM BTF (Biotechnology Frontiers Austrália): é uma suspensão de oocistos e cistos marcados com corante vital vermelho fluorescente, ou seja, com sulforodamina, que constitui o corante “Texas Red”, contidos em um frasco de 5 mL, com número aproximado de (100 oocistos e 100 cistos \pm 1 DP) preservados em aproximadamente 1 mL de solução salina. Para enumerar precisamente estes cistos e oocistos, onde o desvio padrão do número de (oo)cistos de cada tubo deve ser menor que 2,5, é utilizada citometria de fluxo. Cada tubo é selado e esterilizado expondo cada lote a uma dose de radiação gama, garantido a estabilidade e inatividade dos organismos. Desta forma, por serem marcados com outro fluorocromo, são usados como “autocontrole interno” em amostras naturais, pelo fato da leitura microscópica ser realizada com filtros de diferentes comprimentos de onda, em relação ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC). Ao fazer a leitura final da lâmina que contém a amostra natural e que também foi contaminada artificialmente com o Color Seed, observa-se inicialmente a presença de cistos ou oocistos que fluorescem em verde maçã brilhante (FITC). A seguir, muda-se o conjunto de filtros para o vermelho. Se o organismo fluoresce em vermelho, ele é contado como Color Seed, porém, se não há fluorescência em vermelho é contado como intrínseco da amostra.

Esse teste foi utilizado em amostras de alface (*Lactuca sativa*) da seguinte forma: em um frasco de Color Seed adiciona-se 2 mL de solução Tween 20 0,05%, tampa-se e agita-se

vigorosamente. Retira-se a tampa e transfere-se o conteúdo do frasco para a amostra. Adiciona-se 3 mL de água reagente no frasco, tornando a fechá-lo e agitá-lo vigorosamente. Após este procedimento, transfere-se o conteúdo total do frasco para a amostra a ser analisada, repetindo-se esse procedimento por mais uma vez. A amostra foi então tratada normalmente, passando por todos os processos de eluição e concentração, separação imunomagnética, marcação para fluorescência e microscopia. O teste Color Seed é aplicado para avaliar o comportamento da amostra ao ser submetida à técnica.

Cálculo da Eficiência de Recuperação (%)

Após leitura das lâminas foi determinada a eficiência de recuperação dos métodos de acordo com a fórmula:

$$Y = \frac{N}{M} \times 100$$

Onde Y = eficiência de recuperação; N = n° oocistos recuperados; M = n° oocistos semeados.

4.3.4. Análise de metais

As amostras foram coletadas em recipientes de polietileno previamente lavados com solução de ácido nítrico (HNO₃) (30%) para eliminação de metais interferentes (APHA, 1998).

No Laboratório de Ecotoxicologia e Parasitologia Ambiental da EERP, cerca de 2 g de cada amostra de hortaliça in natura foi pesado e colocado na bomba de teflon, onde recebeu 5 mL de HNO₃ Suprapur (65% Suprapur – Merck, Germany). As amostras ficaram por 8h em temperatura ambiente e depois foram submetidas à temperatura de 90°C por mais 8h, para digestão das hortaliças. Depois de refrigeradas, as soluções foram filtradas e o volume completo para 25 mL com água deionizada em balões volumétricos (NIKAIDO, 2009). Em seguida, as amostras digeridas foram enviadas para leitura de metais ao Laboratório de Toxicologia e Saúde Ambiental da Faculdade de Medicina da Universidade “Rovira i Virgili”, Reus, Espanha. No laboratório as concentrações de As, Be, Cd, Cu, Fe, Hg, Mn, Pb, Sn, Tl, V e Zn foram determinadas por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS, Perkin Elmer Elan 6000). Os limites de detecção de cada metal são apresentados na Tabela a seguir.

Tabela 2. Limites de detecção dos metais, analisados por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)

Metal analisado	Limite de detecção em mgL ⁻¹
Arsênio (As)	0,00020
Berílio (Be)	0,00020
Cádmio (Cd)	0,00005
Cobre (Cu)	0,00020
Chumbo (Pb)	0,00005
Estanho (Sn)	0,00010
Ferro (Fe)	0,01000
Manganês (Mn)	0,00005
Mercúrio (Hg)	0,00020
Tálio (Tl)	0,00005
Vanádio (V)	0,00100
Zinco (Zn)	0,00050

4.4. Análise dos dados

Os dados foram analisados por meio do Programa Estatístico Graph Pad Prism (Version 3,02 for Windows, Graph Pad Software, San Diego, CA, USA), através do teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney, para a comparação dos resultados obtidos nas amostras provenientes da horta experimental e amostras comercializadas nas feiras livres. O nível de significância utilizado foi $p \leq 0,05$.

Para comparação dos resultados com valores de referência, foi utilizada a legislação brasileira vigente, por meio da portaria do Ministério da Saúde 518/2004, a Portaria ANVISA 685/1998, a Resolução CNNPA 12/1978, a Resolução RDC 12/2001 e o Decreto Federal 55.871/1965. Foram também utilizados dados da Literatura nacional e internacional.

5. Resultados e Discussão

A reutilização de água é cada vez mais necessária, frente aos cenários de escassez deste recurso que vêm sendo desenhados ao redor do mundo. Diversos estudos têm mostrado que o reuso de água residuária na agricultura contribui para o desenvolvimento de culturas, mas essa é uma prática que exige monitoramento, para que não haja acúmulo de substâncias nocivas e contaminação dos produtos agrícolas por microrganismos patogênicos.

Nesse estudo foram analisadas a ocorrência de enteroparasitas pela técnica de Lutz, a frequência de cistos de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. pela técnica 1623 da USEPA adaptada para hortaliças; e a concentração de metais presentes nas hortaliças que foram cultivadas experimentalmente em área cedida pela Estação de Tratamento de Esgotos de Ribeirão Preto. Foram analisadas também, segundo os mesmos parâmetros, hortaliças comercializadas em feiras livres de Ribeirão Preto, para comparar a qualidade entre esses grupos.

5.1. Dados Parasitológicos

As doenças parasitárias são de grande relevância para a saúde pública, especialmente nas regiões em desenvolvimento. Essas doenças afetam indivíduos de todas as idades, e apresentam quadro clínico diverso. A transmissão de protozoários e helmintos ocorre normalmente por via oral, e a ingestão de hortaliças cruas tem um papel muito significativo na veiculação desses microrganismos (QUADROS, et al., 2008).

As análises parasitológicas de alface (*Lactuca sativa*) e rúcula (*Eruca sativa*) procedentes da horta experimental e das feiras livres, evidenciaram a presença de estruturas parasitárias de *Balantidium coli*, *Ascaris* sp., Larva de nematóide e Ancilostomídeo. Na Figura 11 são apresentadas as imagens com a respectiva descrição morfológica dos cistos, ovos e larvas identificadas nas amostras analisadas.



Figura 11 - Parasitas encontrados nas amostras de hortaliças e analisadas no LEPA. São especificadas as características morfológicas utilizadas como critérios de classificação.

Dentre os tipos de parasitas encontradas, três pertencem ao grupo dos Helmintos, especificamente do filo Nematoda. Os ovos dos gêneros pertencentes à esse filo são característicos, tornando possível a sua identificação, enquanto as larvas apresentam diferenças morfológicas mais sutis. Algumas espécies relevantes para a saúde pública, cuja principal forma de transmissão é através da ingestão de água e alimentos contaminados, são: *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis*, *Strongyloides stercoralis*, *Ancylostoma*

duodenale, *Ancylostoma brasiliense* e *Trichuris trichura*. As verminoses intestinais podem causar diversos agravos, como obstrução intestinal (*A. lumbricoides*), desnutrição (*A. lumbricoides* e *T. trichura*) e anemia por deficiência de ferro (Ancilostomídeos). Entretanto, a intensidade da infestação e idade do hospedeiro também interferem na gravidade dos agravos gerados pelas parasitoses (BRASIL, 2005).

Nas Figuras 12 e 13 é apresentada a distribuição da ocorrência dos parasitas observados em amostras de alface (*Lactuca sativa*) e rúcula (*Eruca sativa*), provenientes das feiras e da horta experimental, irrigadas com efluente tratado e clorado. Os dados das amostras de alface e rúcula são todos apresentados na sequência, para posterior discussão dos resultados.

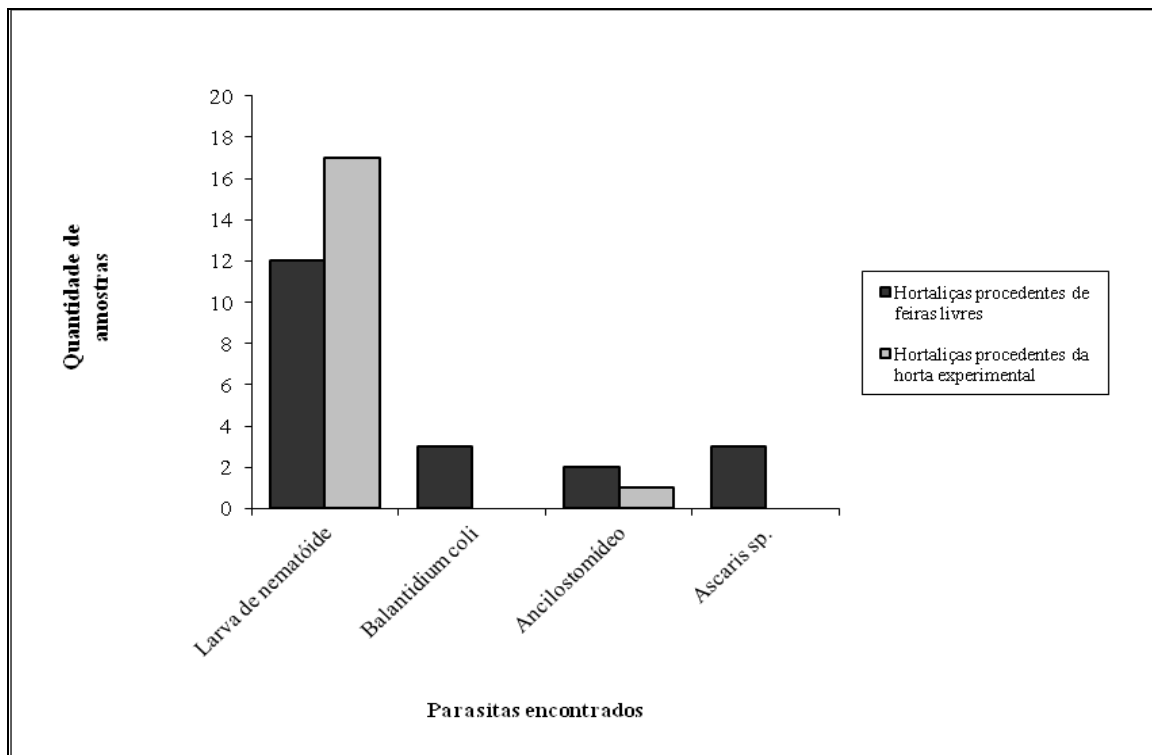


Figura 12 - Distribuição da ocorrência de parasitas segundo a espécie em amostras de alface (*Lactuca sativa*) procedentes de feiras livres e da horta experimental.

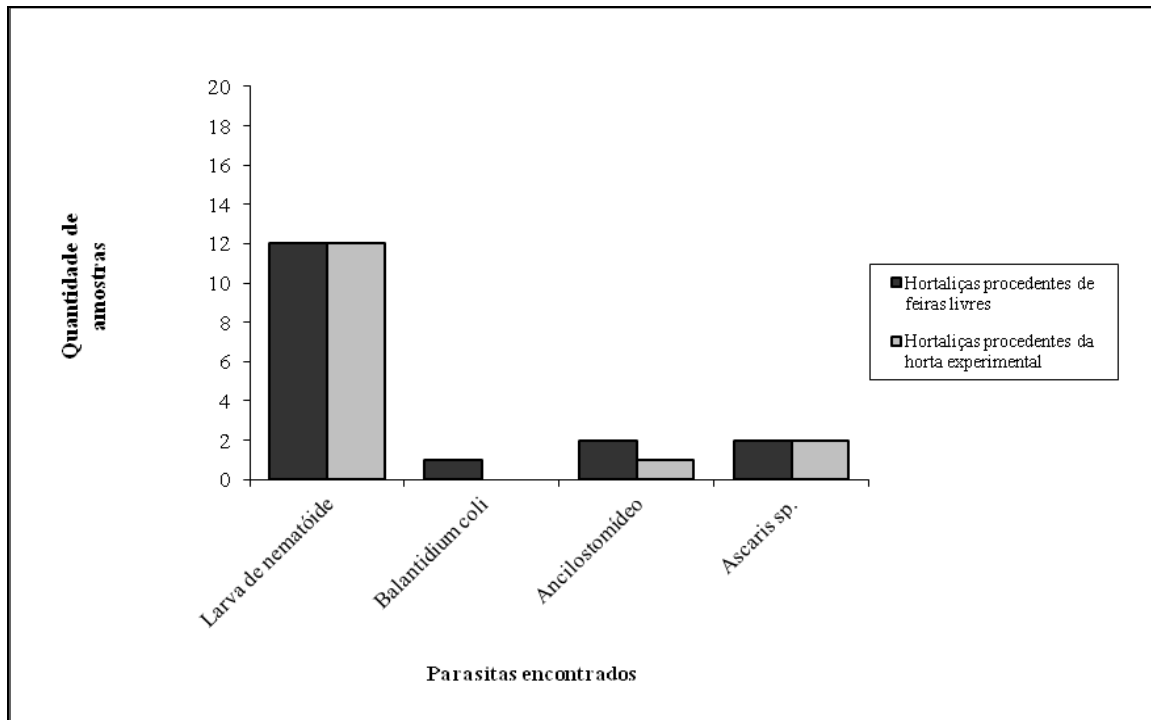


Figura 13 - Distribuição da ocorrência de parasitas segundo a espécie em amostras de rúcula (*Eruca sativa*) procedentes de feiras livres e da horta experimental.

As distribuições da frequência dos parasitas identificados em amostras de alface (*Lactuca sativa*) e de rúcula (*Eruca sativa*), de acordo com a procedência, são apresentadas nas Tabelas 3 e 4. As amostras foram classificadas de acordo com a variedade de parasitas encontrados, e os dados variam de 0 (zero) para amostras nas quais não foram encontrados parasitas a 3 (três) para amostras onde foram encontradas três espécies distintas de parasitas.

Tabela 3 - Distribuição da frequência de parasitas em alface (*Lactuca sativa*) produzidas experimentalmente e comercializadas em Ribeirão Preto – SP

Amostra	Nº de espécies de parasitas encontrados	
	Hortalças procedentes das feiras livres	Hortalças procedentes da horta experimental
1	0	0
2	1	2
3	3	1
4	2	1
5	1	1
6	0	1
7	2	1
8	1	1
9	0	1
10	1	0
11	0	1
12	1	1
13	1	1
14	1	1
15	2	0
16	1	1
17	0	1
18	3	1
19	0	1
20	0	1

Tabela 4 - Distribuição da frequência de parasitas em rúcula (*Eruca sativa*) produzidas experimentalmente e comercializadas em Ribeirão Preto – SP

Amostra	Nº de espécies de parasitas encontrados	
	Hortaliças procedentes das feiras livres	Hortaliças procedentes da horta experimental
1	1	0
2	0	1
3	2	1
4	1	1
5	1	0
6	0	1
7	2	1
8	0	0
9	1	0
10	0	1
11	1	1
12	1	1
13	0	1
14	1	1
15	1	0
16	0	1
17	1	1
18	1	1
19	2	0
20	1	2

Aos conjuntos de dados aplicou-se o teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney, ficando evidenciado que não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos (hortaliças procedentes da feira e hortaliças irrigadas com esgoto tratado e clorado), quanto à ocorrência de espécies de parasitas ($p > 0,05$), tanto ao analisar as amostras de alface quanto as de rúcula.

Quando comparados os dados das hortaliças cultivadas experimentalmente com as hortaliças provenientes das feiras livres de Ribeirão Preto, não foram observadas alterações significativas da qualidade. Entretanto, observa-se que ambos os grupos apresentam muitas amostras com positividade para a presença de estruturas parasitárias. A Tabela 5 resume a distribuição da ocorrência parasitária segundo o grupo e/ou espécie, e procedência das hortaliças.

Tabela 5 - Distribuição (em porcentagem) dos parasitas identificados segundo o tipo e procedência das hortaliças

Parasita encontrado	Ocorrência parasitária (%)			
	Hortaliças procedentes das feiras livres		Hortaliças procedentes da horta experimental	
	Alface	Rúcula	Alface	Rúcula
Larva de nematóide	60	60	85	60
Balantidium coli	15	5	0	0
Ancilostomídeo	10	10	5	5
Ascaris sp.	15	10	0	10

A Tabela 5 mostra que larvas de nematóides foram os parasitas com a maior frequência observada em ambos os tipos de hortaliças, de ambas as procedências. Nota-se também a maior diversidade de espécies observadas entre as hortaliças provenientes das feiras livres. As hortaliças foram coletadas em todas as feiras livres que existem em Ribeirão Preto, de diversos produtores, e conseqüentemente, de diferentes procedências. Isso pode explicar a diversidade dos parasitas observada entre esse grupo de amostras. Há diversos estudos que apontam a alface (*Lactuca sativa*) como potencial causador de infecções alimentares. Hortaliças e outros alimentos ingeridos crus e a água potável são importantes meios de disseminação de enteroparasitas, e são comuns os estudos desenvolvidos nessa temática que encontram algum tipo de contaminação.

Nikaido (2009), cujo trabalho antecedeu o presente estudo, avaliou alface (*Lactuca sativa*) e rúcula (*Eruca sativa*) produzidas experimentalmente com três tipos distintos de água de irrigação: água potável, esgoto tratado e esgoto tratado e clorado. Em seu trabalho também foi observada uma maior ocorrência de larvas de nematóides em ambas as variedades hortaliças, no entanto, também foram encontrados exemplares de *Enterobius vermicularis*, *Entamoeba coli* e *Hymenolepis* sp.

Quadros et al. (2008) analisaram 122 amostras de alface de supermercados e feiras de Lages, Santa Catarina utilizando quatro técnicas parasitológicas distintas. Eles observaram que a Técnica de Lutz apresentou maior número de resultados positivos para contaminação parasitológica quanto comparada com as outras técnicas estudadas. Também foram observados altos valores de contaminação nas hortaliças, com 88,5% amostras com presença de estruturas parasitárias, valor superior aos encontrados no presente trabalho.

Na região de Maringá, Paraná, Falavigna et al. (2005) coletaram 181 amostras de alface e rúcula em 17 feiras livres. O índice de parasitismo observado foi de 65%, semelhante à porcentagem obtida no presente estudo, e os principais parasitas encontrados foram ancilostomídeos, larvas da família Rhabditoidea, cistos de amebas e oocistos de coccídeos.

Takayanagui et al. (2000) realizaram uma fiscalização da qualidade das hortas do município de Ribeirão Preto. Nesse estudo, também utilizando a técnica de sedimentação espontânea, das 129 hortas avaliadas, 24 apresentaram verduras com alguma irregularidade microbiológica, sendo encontrados ovos de *Ascaris* sp., *Strongyloides* sp., *Hymenolepis nana*, assim como cistos de *Giardia* ssp.

A normatização brasileira vigente para a qualidade microbiológica de alimentos aborda com maior especificidade questões referentes à qualidade bacteriológica. A Resolução – CNNPA (Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos) de nº 12/1978, é um exemplo. Ela, como a Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, aborda detalhadamente a tolerância para presença de diversos grupos de bactérias. Entretanto, a Resolução CNNPA 12/1978 é a única a trazer um texto sobre a qualidade “microscópica”, referindo-se a parasitas. Ela traz em seu texto que as hortaliças devem obedecer ao padrão de “ausência de sujidades, parasitas e larvas”. De acordo com a Resolução, a maioria das hortaliças pesquisadas no presente estudo encontra-se em condições inadequadas para consumo humano.

Coelho et al. (2001) pesquisaram formas transmissíveis de enteroparasitas em água e hortaliças destinadas ao consumo de comunidades escolares em Sorocaba – SP. A pesquisa consistiu em avaliar, por técnica semelhante a aqui utilizada, a presença de parasitas em amostras de água, hortaliças *in natura* e hortaliças lavadas para o consumo humano. Obteve-se na ocasião, que as amostras de verduras *in natura* apresentaram maior proporção de contaminação do que as hortaliças já lavadas, prontas para o consumo humano.

O processo de limpeza das hortaliças é fundamental para a diminuição do risco de infecções alimentares. Ao eliminar as impurezas presentes na hortaliça, grande parte dos parasitas tende a ser eliminada. Entretanto, devido a características morfológicas da parede do ovo, cisto ou parasita na forma adulta, algumas estruturas parasitárias não são facilmente removidos apenas pela ação mecânica da lavagem das folhas (COELHO et al., 2001), o que mostra a importância da aplicação rigorosa de práticas sanitárias durante todo o processo de cultivo, embalagem, transporte e manuseio das hortaliças.

Cabe ressaltar também que existem muitas fontes de contaminação de hortaliças além da água utilizada para irrigação. Elas podem ser contaminadas por insetos, roedores e outros animais que transitam pela horta, pelo tipo de adubo utilizado, durante seu transporte e acondicionamento e até mesmo no momento de sua comercialização, pelo manuseio de diversas pessoas. As diferenças observadas entre os diversos trabalhos que abordam a contaminação de hortaliças devem-se muito ao quadro tão diverso de fatores que influenciam na qualidade desses alimentos (COELHO, et al., 2001; SOARES; CANTOS, 2006).

Tanto a alface (*Lactuca sativa*) quanto a rúcula (*Eruca sativa*) são hortaliças com grande participação na dieta dos brasileiros, e seu consumo vem aumentando nos últimos anos. O controle da qualidade microbiológica de hortaliças consumidas cruas é fundamental, dadas as muitas pesquisas que apresentam alto índice de contaminação microbiológica. As parasitoses intestinais ainda são altamente relevantes para a saúde pública, especialmente nos países em desenvolvimento. A transmissão dessas doenças, principalmente por via oral, requer atenção redobrada para a qualidade da água e dos alimentos oferecidos à população humana.

5.2. *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp.

Os microrganismos *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. alcançaram destaque especial neste estudo, por se tratarem de parasitoses emergente e re-emergente. A recuperação desses protozoários pelas técnicas parasitológicas comuns é muito baixa, e frequentemente não conferem com a real situação de contaminação. A Técnica de Separação Imunomagnética com utilização de Microscopia de Imunofluorescência e Contraste de Fase (Técnica 1623, USEPA) é a técnica mais avançada de que se dispõe hoje para pesquisa destes protozoários. Esse método permite detectar cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. identificando estruturas celulares através da microscopia de imunofluorescência e contraste de fase.

Entretanto, o alto custo da técnica atua como fator limitante na pesquisa. Neste estudo, a análise de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em hortaliças ficou restrita apenas à amostras de alface (*Lactuca sativa*). Foram utilizadas cinco amostras de alface provenientes das feiras livres, cinco dos canteiros experimentais irrigados com esgoto tratado e clorado e cinco dos canteiros irrigados com água potável.

Durante a pesquisa de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram considerados os seguintes indicadores durante a leitura microscópica das preparações:

Imunofluorescência: definida pela cor verde-maçã brilhante, comparável àquela exibida por mais de 50% de oocistos presentes nas suspensões de “controles positivos”; ausência de poros ou apêndices; tamanho e formato compatíveis: 4-6 µm de diâmetro e forma esférica para oocistos e, para cistos, 8-18 por 5-15 µm de e forma ovalada.

Teste confirmatório utilizando 4',6-diamidino-2-fenilidol (DAPI): observação dos núcleos (1 a 4) corados em azul-céu bem distintos, visualizados dentro de um único oocisto/cisto, em geral, apresentando coloração azul intensa.

Contraste de fase: presença das estruturas internas para oocistos.

A Figura 14 apresenta a imagem confirmatória de um cisto de *Giardia* spp., observado em amostras de alface, mediante o uso de diferentes filtros utilizados na microscopia.



Figura 14 - Cisto de *Giardia* spp. observado através de diferentes filtros em leitura realizada no Laboratório de Ecotoxicologia e Parasitologia Ambiental (LEPA).

Para validação da análise, foi empregado do teste *Easy seed*, com quatro repetições, cuja média de recuperação ficou em 24,25% para cistos de *Giardia* spp. e 38,25% para oocistos de *Cryptosporidium* spp. A Figura 15 ilustra a comparação de dois cistos de *Giardia* spp., onde apenas um apresenta coloração avermelhada quando submetido ao filtro específico, que é o cisto incorporado à amostra pelo teste *Color Seed*. O outro cisto é oriundo da própria amostra, e só apresenta a coloração verde-maçã. O teste *Color seed*, cuja finalidade é avaliar a resposta da amostra à aplicação da técnica, obteve resultados satisfatórios, e são apresentados juntamente com os resultados das análises, nas Tabelas 6 e 7. Para melhor visualização dos

resultados, essas Tabelas apontam os resultados da contagem de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. separadamente.

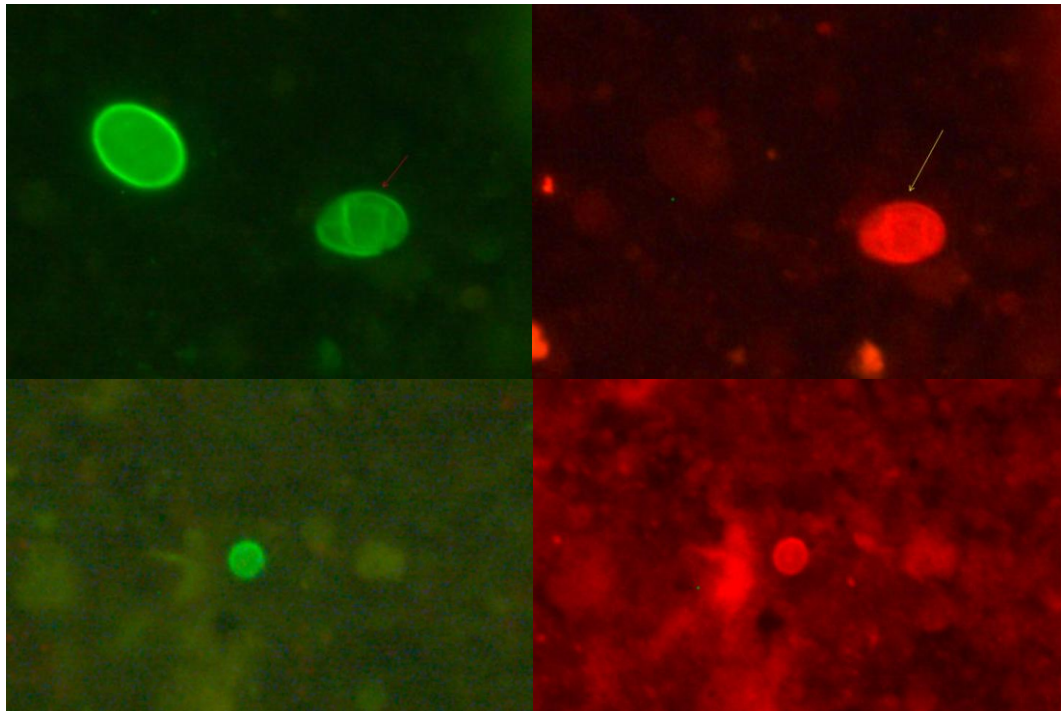


Figura 15 - Cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. pertencentes à amostra e ao teste *Color Seed*, identificados durante a análise realizada no LEPA.

Tabela 6 - Oocistos de *Cryptosporidium* spp. encontrados em amostras de alface (*Lactuca sativa*) durante as análises realizadas no LEPA, utilizando o método 1623/EPA

Amostra (50 g)	Hortaliças procedentes das feiras livres	Hortaliças procedentes da horta experimental
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	3
5	0	3
<i>Color seed</i> (%)	24	40

Tabela 7 - Cistos de *Giardia* spp. encontrados em amostras de alface (*Lactuca sativa*) durante as análises realizadas no LEPA, utilizando o método 1623/EPA

Amostra (50 g)	Hortalças procedentes das feiras livres	Hortalças procedentes da horta experimental
1	0	0
2	0	15
3	0	6
4	0	12
5	0	6
<i>Color seed</i> (%)	35	35

Com base nos dados observados nas Tabela 6 e 7, a contaminação por *Cryptosporidium* spp. foi detectada em duas das cinco amostras de alface irrigadas com esgoto tratado/clorado, com densidade de 3 oocistos/50 g. A contaminação por *Giardia* spp. foi detectada em quatro das cinco amostras de hortalças irrigadas com esgoto tratado/clorado, com densidades que variam de 6 a 15 cistos/50 g. Nenhuma das hortalças coletadas nas feiras apresentou positividade para a contaminação por (oo)cistos desses parasitas.

A diferença observada entre os resultados obtidos das hortalças provenientes das feiras com as hortalças produzidas experimentalmente se relaciona muito com a água de irrigação utilizada na horta experimental. Tonani (2011) analisou a eficiência de remoção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e cistos de *Giardia* spp. através do tratamento de efluentes realizados pela Estação de Tratamento de Esgotos de Ribeirão Preto – ETE/RP, que é responsável por 84% do tratamento do volume de esgoto produzido em Ribeirão Preto, sendo que os 16% restantes são tratados pela ETE-Caiçara. No referido estudo foi observado que, embora tenha havido uma redução significativa da quantidade de (oo)cistos presentes no esgoto bruto e tratado, a eficiência de redução é parcial, pois nem todos os microrganismos são removidos. Ao serem liberados nos rios, esses efluentes tratados atendem às normas vigentes para manutenção da classe do corpo d'água e os microrganismos restantes não influenciam na qualidade das águas devido à capacidade de depuração dos rios. Entretanto, ao ser utilizado na irrigação de hortalças esses efluentes interferiram na qualidade parasitológica do produto agrícola quanto à presença de *Giardia* spp. conforme o evidenciado pelos resultados obtidos no presente estudo.

O método utilizado para o tratamento do esgoto na ETE-RP é o de lodos ativados convencionais, aerados por turbocompressores e difusores de membrana e sistema de digestão anaeróbia de lodos de alta carga. Esse sistema tem se mostrado eficiente na redução da carga microbiológica presente no esgoto bruto para níveis aceitáveis pelos padrões estabelecidos. Para diminuir ainda mais a carga de microrganismos patogênicos que ainda permanecem mesmo no efluente tratado, foi realizada a cloração do efluente antes de sua utilização na irrigação das hortaliças na horta experimental. Entretanto, *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. tratam-se de parasitas resistentes à cloração, o que contribuiu para a presença de *Giardia* spp. na alface irrigada com esgoto tratado e clorado. Tonani (2011) também observou que, durante o período avaliado, a concentração de *Cryptosporidium* spp. no esgoto bruto produzido no município de Ribeirão Preto é bem inferior à concentração de *Giardia* spp., o que também se relaciona ao fato de as amostras de alface provenientes da horta experimental terem apresentado uma concentração de oocistos bem inferior à concentração de cistos.

Amorós, Alonso e Cuesta (2010), analisando verduras em Valência, Espanha, encontraram contaminação por *Cryptosporidium* spp. em 10 de 13 amostras de alface, e contaminação por *Giardia* spp. em oito de 13 amostras de alface. Embora proporção de amostras contaminadas por *Giardia* spp. tenha se apresentado semelhante ao observado nas amostras da horta experimental, nota-se a diferença da contaminação por *Cryptosporidium* spp. observada.

Pereira (2008) analisou 120 amostras de hortaliças provenientes de propriedades produtoras na região de Campinas – SP, sendo 60 de alface e 60 de rúcula. Nenhuma das amostras apresentou contaminação por *Cryptosporidium* spp., mas em 6,6% das amostras de alface e 1,6% das amostras de rúcula foram encontrados cistos de *Giardia* spp. Com a finalidade de comparação de técnicas, Pereira também utilizou a técnica de centrífugo-flutuação em Sulfato de zinco – Método de Faust. Por esse método, não foram encontrados protozoários patogênicos, evidenciando o maior sucesso da aplicação do método 1623 da USEPA na identificação e quantificação desses microrganismos.

O Ministério da Saúde, através da Portaria 518/2004 que estabelece responsabilidades para a produção de água para consumo humano e subsídios para o monitoramento da qualidade dessa água, traz sua preocupação quanto à presença de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em água, recomendado incluir a pesquisa desses microrganismos para atingir a meta de ausência desses parasitas em água potável. A FDA (1998), em suas orientações para o

setor hortifrutícola, enuncia que a água, ao entrar em contato com os alimentos frescos, consumidos crus, dita o potencial da contaminação patogênica, por poder atuar como agente veiculador de diversos microrganismos. Mesmo em pequenas quantidades, esses microrganismos podem levar a um quadro de infecção alimentar, podendo afetar principalmente grupos populacionais imunologicamente vulneráveis.

5.3. Concentração de metais

Metais são elementos químicos que ocorrem naturalmente na superfície terrestre. Entretanto, a ação antrópica tem levado ao acúmulo desses elementos no ambiente em suas formas mais tóxicas, influenciando na saúde ambiental e humana (SILVA; VITTI; TREVIZAM, 2007). A contaminação de água e alimentos está entre as principais causas de intoxicação por metais, e esses alimentos podem ser contaminados através do uso de água contaminada em sua produção (NIKAIDO et al., 2010). Águas residuárias apresentam geralmente alguma quantidade de metais em sua composição, e podem interferir na contaminação do ambiente na qual elas são liberadas, incluindo na agricultura.

Nessa etapa do estudo, visou-se avaliar as concentrações dos metais As, Be, Cd, Cu, Pb, Sn, Fe, Mn, Hg, Tl, V, Zn em amostras de alface (*Lactuca sativa*) e rúcula (*Eruca sativa*) irrigadas com efluente tratado e clorado da ETE-RP e compará-los com os resultados obtidos ao submeter à essas mesmas análises verduras coletadas em feiras livres do município de Ribeirão Preto.

Dentre todos os metais analisados, As, Be, Hg, Sn, Tl e V ficaram abaixo dos limites de detecção do aparelho utilizado para realizar as leituras de concentração. Em contrapartida, Cd, Pb, Cu, Fe, Mn e Zn apresentaram valores passíveis de análises e comparações. As médias, valores mínimos e máximos desses metais, observados nas diferentes hortaliças segundo sua procedência são apresentadas nas Tabelas 8 e 9. Para melhor visualização dos resultados, os dados foram organizados em tabelas diferentes, sendo uma para amostras de alface (*Lactuca sativa*) e outra para amostras de rúcula (*Eruca sativa*), que também apresentam os Limites Máximos de Tolerância (LMT) previstos na legislação brasileira.

Tabela 8 - Concentrações de metais em alfaces (*Lactuca sativa*) procedentes das feiras livres de Ribeirão Preto e cultivadas na horta experimental

		Concentração (mgKg ⁻¹)					
		Zn	Mn	Cu	Pb	Cd	Fe
Alface Feira Livre	Média	6,346	3,709	0,536	0,148	0,015	11,438
	Máximo	11,583	13,116	2,620	1,126	0,131	28,987
	Mínimo	1,975	0,748	0,216	0,033	>0,006	4,260
Alface Horta Experimental	Média	5,168	13,386	0,441	0,335	0,017	29,615
	Máximo	7,478	45,929	0,801	1,470	0,078	168,620
	Mínimo	3,401	2,030	0,221	0,062	0,007	9,646
LMT		50,00*	-	10,00**	0,50*	1,00*	-

* Decreto Federal 55.871, de 26 de março de 1965.

** Portaria ANVISA n° 685, de 27 de agosto de 1998.

Tabela 9 - Concentrações de metais em rúculas (*Eruca sativa*) procedentes das feiras livres de Ribeirão Preto e cultivadas na horta experimental

		Concentração (mgKg ⁻¹)					
		Zn	Mn	Cu	Pb	Cd	Fe
Rúcula Feira Livre	Média	8,839	4,728	0,844	0,108	0,016	44,767
	Máximo	16,387	18,895	1,545	0,667	0,049	74,661
	Mínimo	4,953	1,505	0,443	0,036	0,006	22,042
Rúcula Horta Experimental	Média	7,218	21,819	0,787	0,202	0,024	88,692
	Máximo	10,644	37,920	1,285	0,495	0,074	212,788
	Mínimo	4,815	7,385	0,553	0,076	0,010	6,250
LMT		50,00*	-	10,00**	0,50*	1,00*	-

* Decreto Federal 55.871, de 26 de março de 1965.

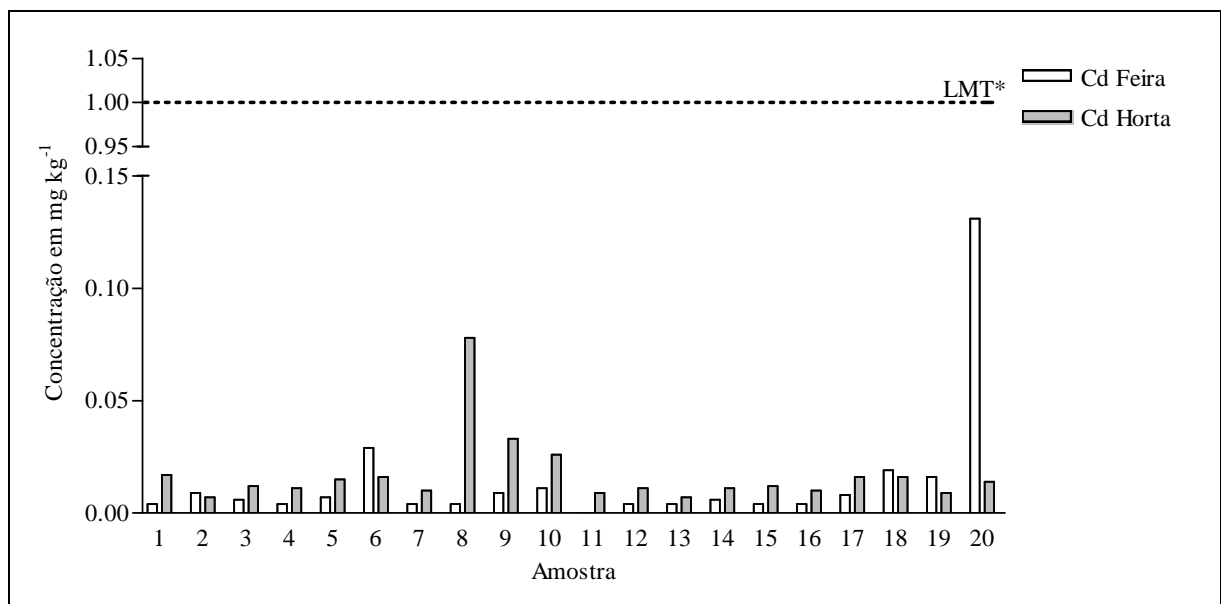
** Portaria ANVISA n° 685, de 27 de agosto de 1998.

Os dados mostram que as concentrações de metais na maioria das hortaliças analisadas se encontram abaixo dos Limites Máximos de Tolerância (LMT) de contaminantes inorgânicos previstos na legislação. Entretanto, as amostras de alface e rúcula, provenientes das feiras livres e da horta experimental, apresentaram valores máximos de Pb acima do LMT ou muito próximos de 0,50 mgKg⁻¹.

Aplicou-se aos dados o teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney. Cada metal foi avaliado separadamente, comparando os resultados das alfaces e rúculas das feiras e da horta experimental.

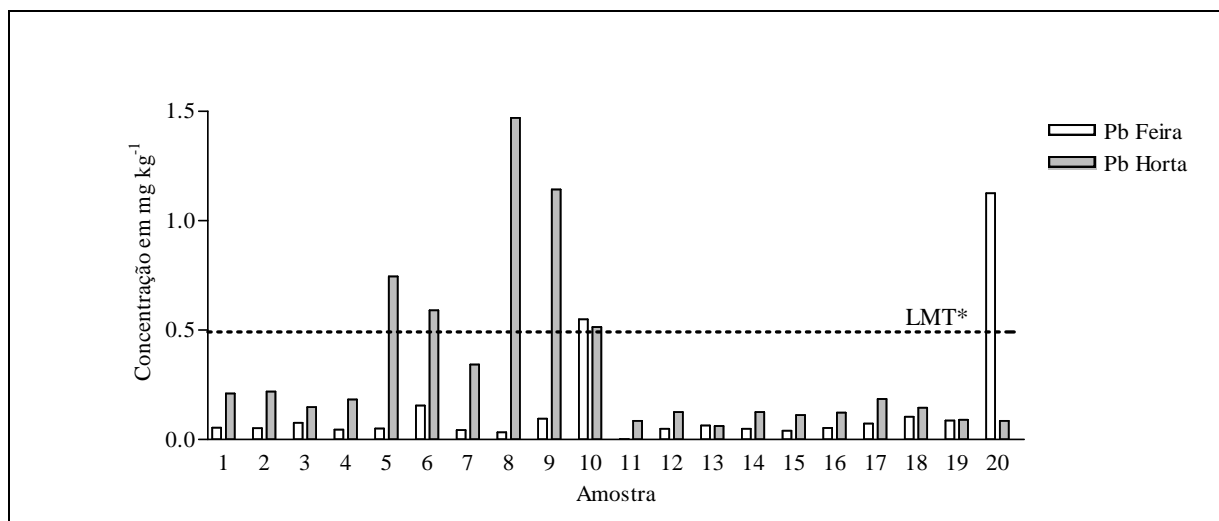
De acordo com o já enunciado, os metais As, Be, Hg, Sn, Tl e V apresentaram resultados inferiores aos limites de detecção. Para os metais restantes, o teste de Mann-Whitney demonstrou que as concentrações de Cu e Zn ($p > 0,05$) para ambas as variedades de hortaliças não apresentaram diferenças estatisticamente significantes segundo a procedência da hortaliça. Já os metais Cd, Pb, Fe e Mn ($p < 0,05$) apresentaram diferenças estatisticamente significantes, todos apontando que as hortaliças cultivadas na horta experimental apresentaram maior contaminação por esses metais do que as hortaliças provenientes das feiras livres.

As Figuras 16, 17, 18 e 19, apresentadas a seguir, mostram a distribuição gráfica das concentrações para Cd, Pb, Fe e Mn, metais cujas concentrações apresentaram diferença estatisticamente significativa, nas amostras de alface (*Lactuca sativa*) de acordo com a procedência.



*LMT – Limite Máximo de Tolerância. Fonte: Decreto Federal 55.871, de 26 de março de 1965.

Figura 16 - Concentração de Cd em amostras de alface (*Lactuca sativa*) provenientes da feira e da horta experimental.



*LMT – Limite Máximo de Tolerância. Fonte: Decreto Federal 55.871, de 26 de março de 1965.

Figura 17 - Concentração de Pb em amostras de alface (*Lactuca sativa*) provenientes da feira e da horta experimental.

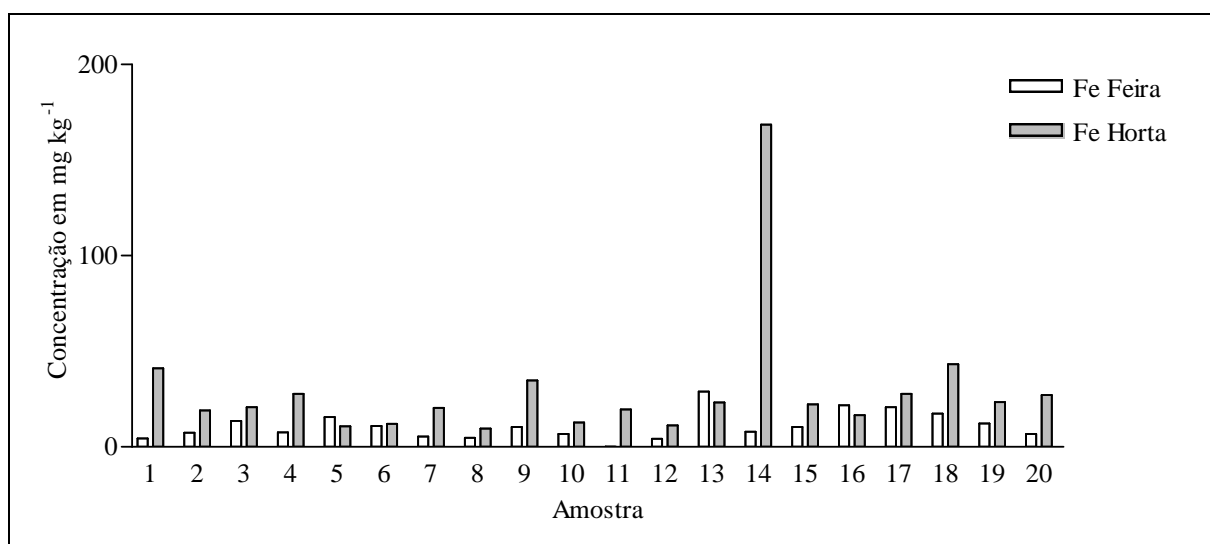


Figura 18 - Concentração de Fe em amostras de alface (*Lactuca sativa*) provenientes da feira e da horta experimental.

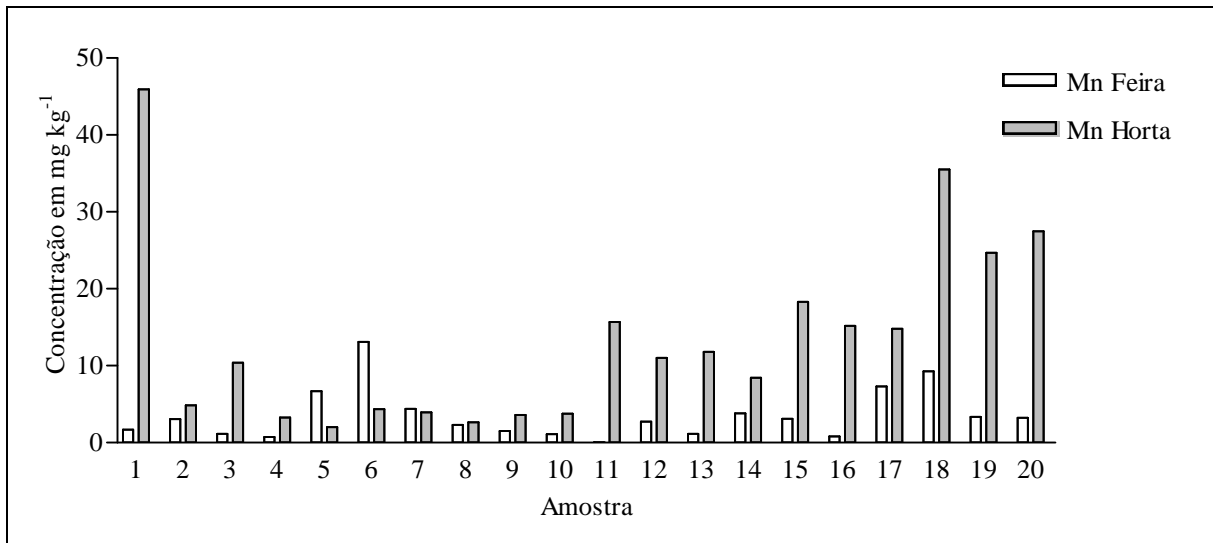
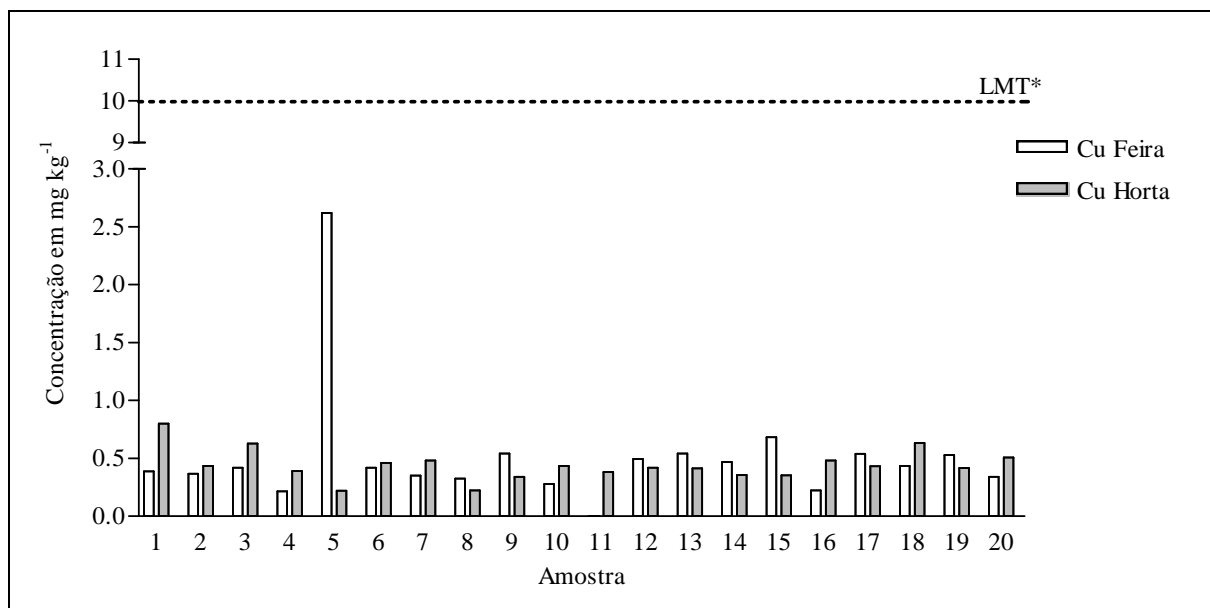


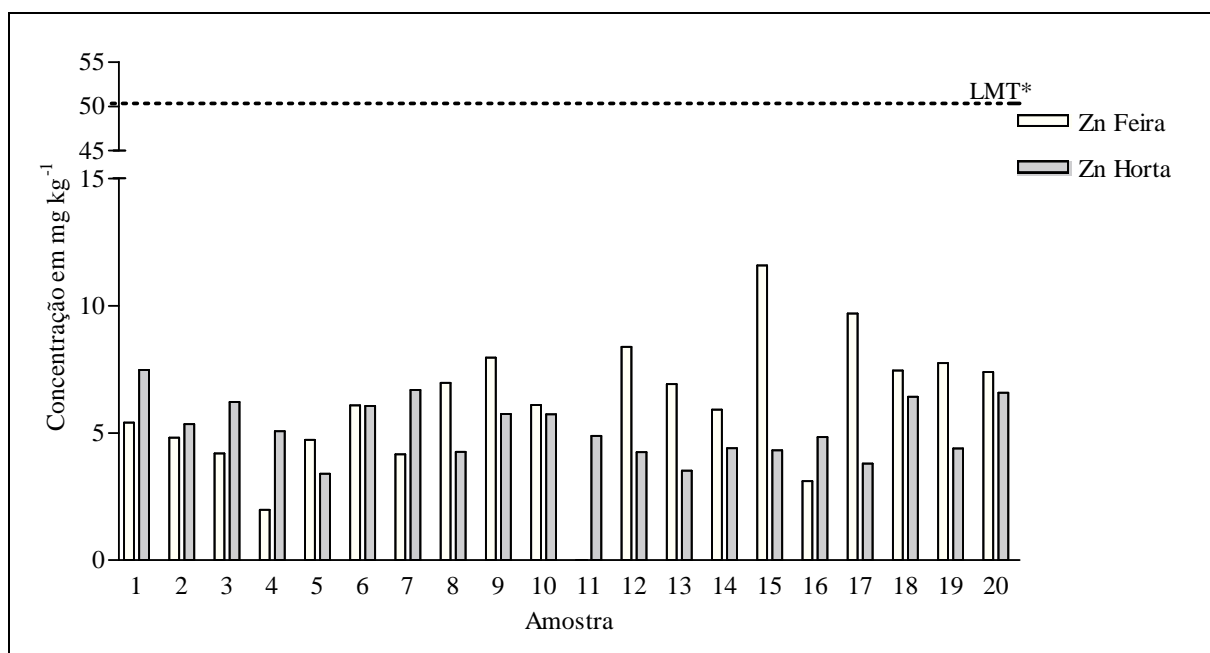
Figura 19 - Concentração de Mn em amostras de alface (*Lactuca sativa*) provenientes da feira e da horta experimental.

Os dados evidenciam que as concentrações de metais nas hortaliças cultivadas com efluentes tratados e clorados na horta experimental foi significativamente superior do que nas amostras coletadas em feiras livres de Ribeirão Preto. As Figuras 20 e 21, a seguir, demonstram a distribuição gráfica da concentração dos metais Cu e Zn, que embora não tenham apresentado diferenças estatisticamente significantes, apresentaram concentrações de metais detectáveis pelo método ICP-MS, que foram comparadas com os valores máximos estabelecidos pela legislação.



*LMT – Limite Máximo de Tolerância. Fonte: Portaria ANVISA n° 685, de 27 de agosto de 1998.

Figura 20 - Concentração de Cu em amostras de alface (*Lactuca sativa*) provenientes da feira e da horta experimental.

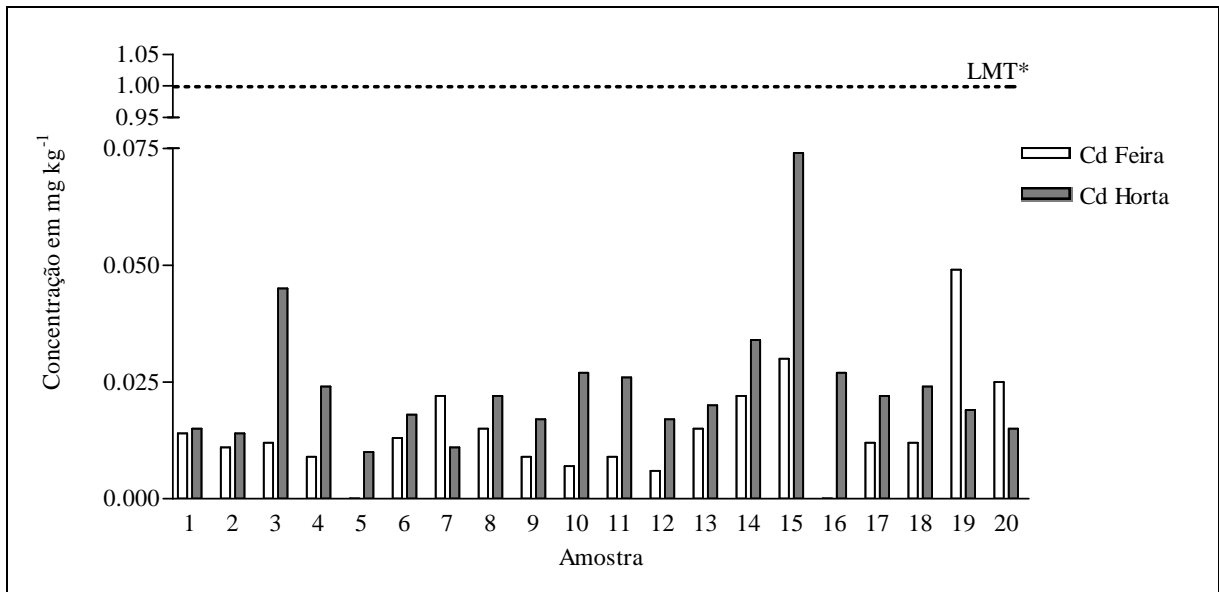


*LMT – Limite Máximo de Tolerância. Fonte: Decreto Federal 55.871, de 26 de março de 1965.

Figura 21 - Concentração de Zn em amostras de alface (*Lactuca sativa*) provenientes da feira e da horta experimental.

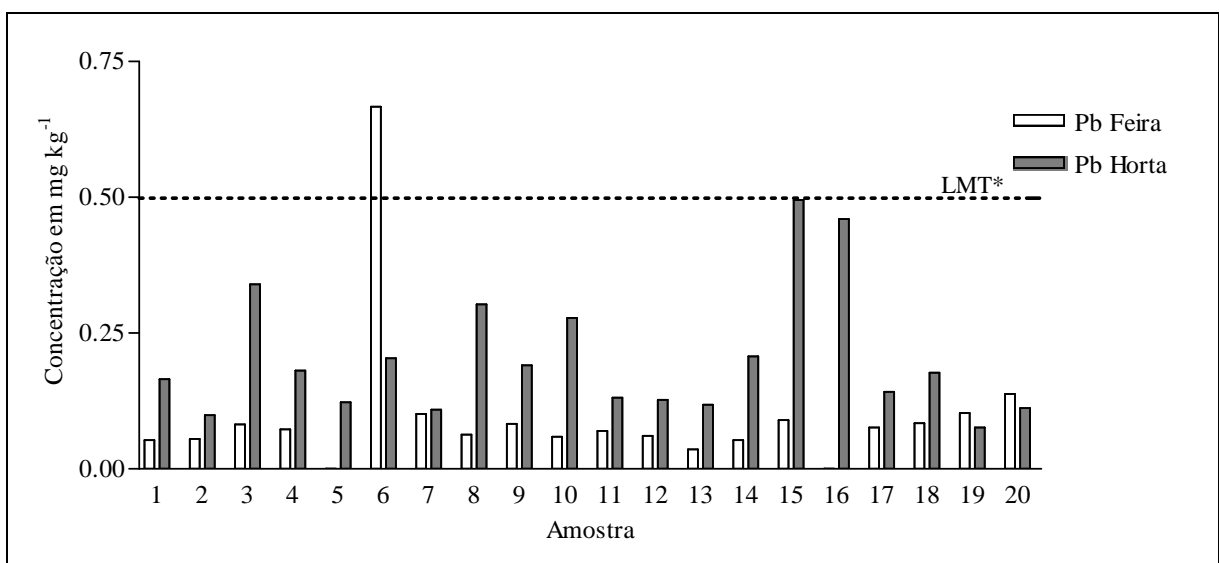
As amostras de rúcula (*Eruca sativa*) seguiram o mesmo padrão observado nas amostras de alface, considerando que o teste de Mann-Whitney mostrou que as concentrações

de metais analisados foi significativamente maior nas amostras provenientes da horta experimental do que das feiras livres, quando considerados os metais Cd, Pb, Fe e Mn. As Figuras 22, 23, 24 e 25, que apresentam as concentrações de cada um desses metais nas amostras de rúcula de diferentes procedências, são dadas a seguir.



*LMT – Limite Máximo de Tolerância. Fonte: Decreto Federal 55.871, de 26 de março de 1965.

Figura 22 - Concentração de Cd em amostras de rúcula (*Eruca sativa*) provenientes da feira e da horta experimental.



*LMT – Limite Máximo de Tolerância. Fonte: Decreto Federal 55.871, de 26 de março de 1965.

Figura 23 - Concentração de Pb em amostras de rúcula (*Eruca sativa*) provenientes da feira e da horta experimental.

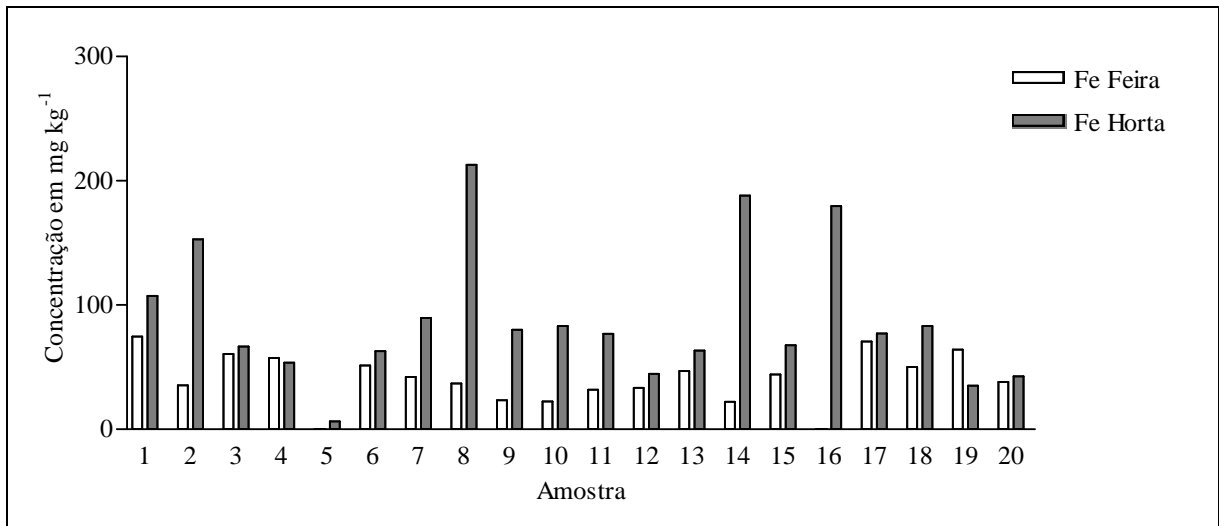


Figura 24 - Concentração de Fe em amostras de rúcula (*Eruca sativa*) provenientes da feira e da horta experimental.

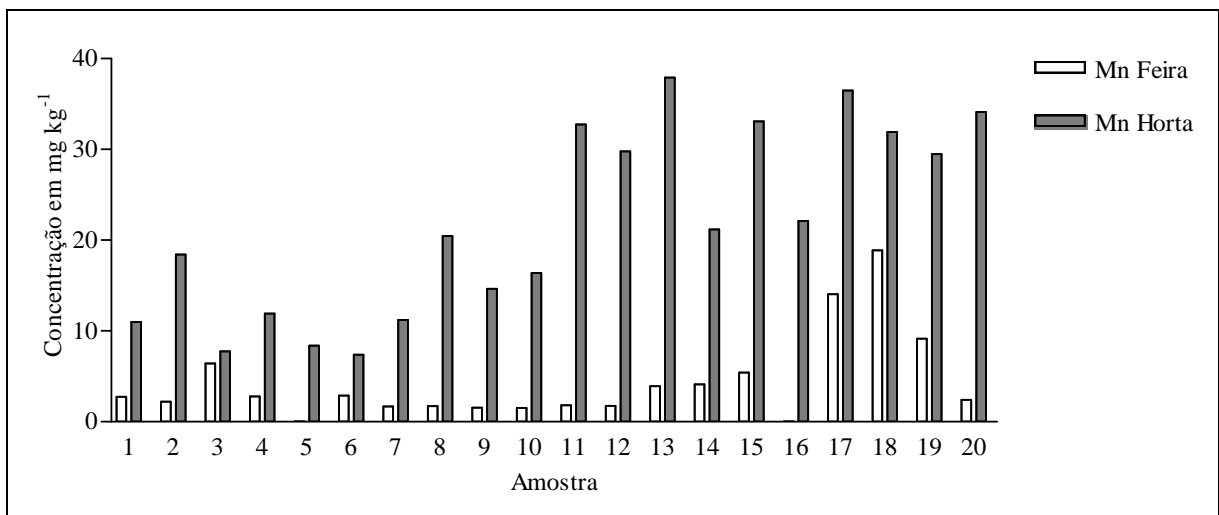
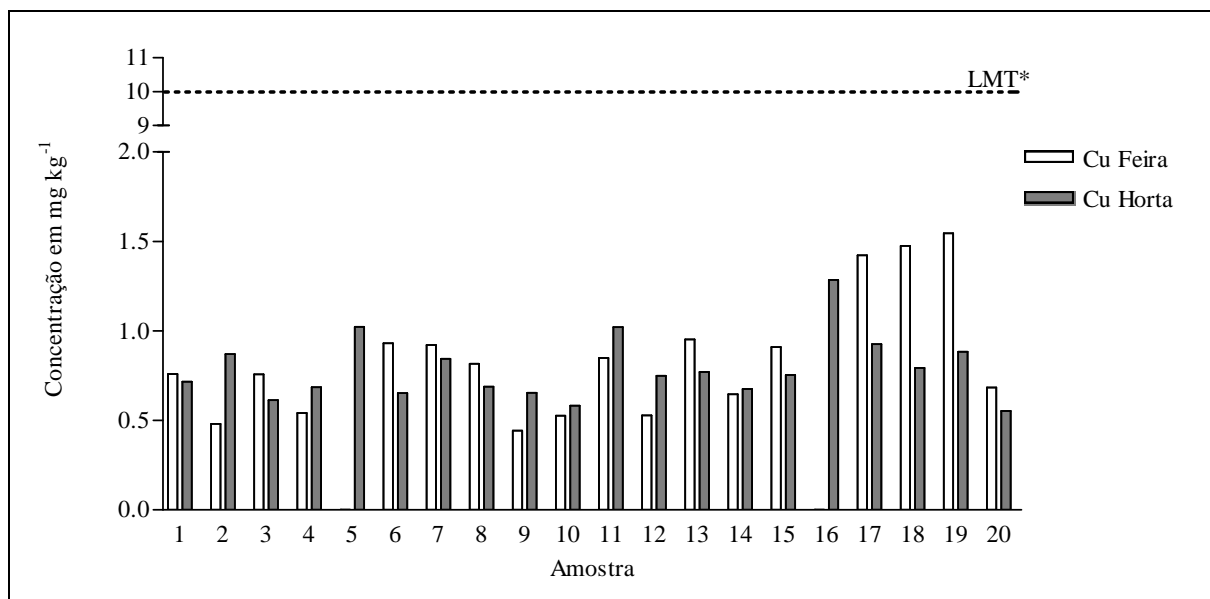


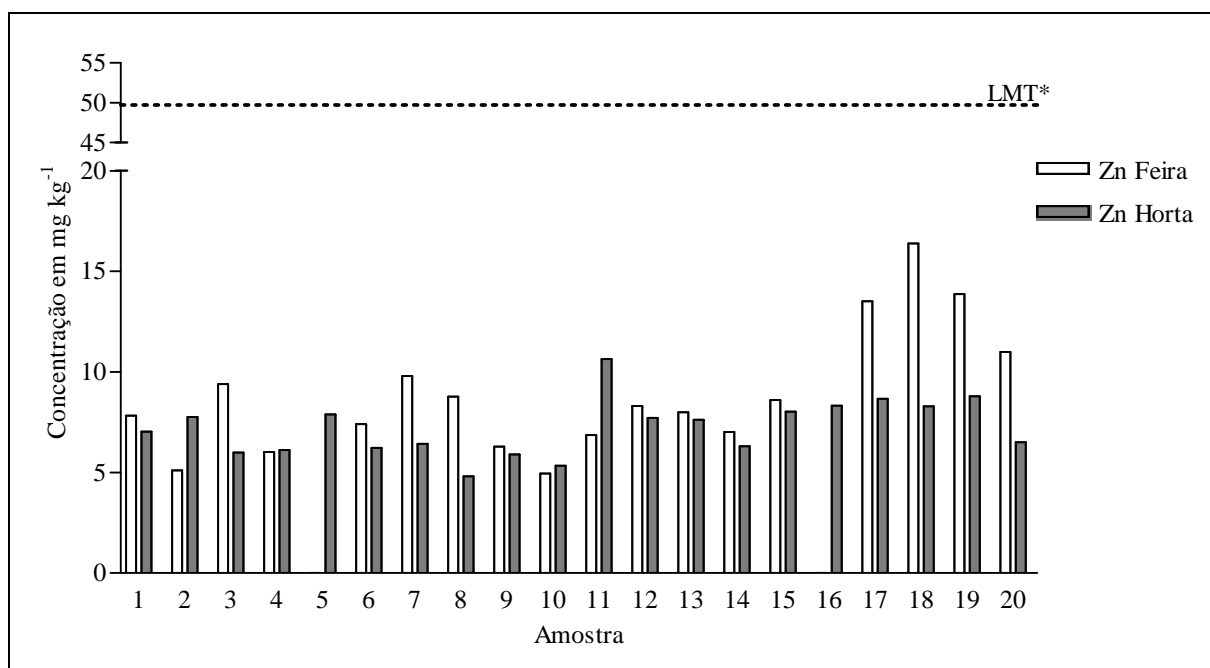
Figura 25 - Concentração de Mn em amostras de rúcula (*Eruca sativa*) provenientes da feira e da horta experimental.

Também são apresentados os dados que demonstram as concentrações de Cu e Zn encontradas nas rúculas de ambas as procedências, nas Figura 26 e 27. Embora não tenham apresentado diferenças estatisticamente significantes, os dados desses metais também foram utilizados para comparação com os valores de referência estabelecidos pela legislação brasileira.



*LMT – Limite Máximo de Tolerância. Fonte: Portaria ANVISA n° 685, de 27 de agosto de 1998.

Figura 26 - Concentração de Cu em amostras de rúcula (*Eruca sativa*) provenientes da feira e da horta experimental.



*LMT – Limite Máximo de Tolerância. Fonte: Decreto Federal 55.871, de 26 de março de 1965.

Figura 27 - Concentração de Zn em amostras de rúcula (*Eruca sativa*) provenientes da feira e da horta experimental.

Todos os metais cujos resultados apresentaram diferenças estatisticamente significantes apresentaram maior concentração de metais nas amostras irrigadas com efluente

tratado e clorado, procedentes da horta experimental. Os Limites Máximos de Tolerância (LMT) padronizados para alguns dos metais avaliados no presente estudo também foram apresentados nas figuras anteriores, evidenciando especificamente os altos níveis de Pb encontrados nas amostras das duas variedades de verduras de ambas as procedências.

Nikaido (2009), ao avaliar hortaliças produzidas experimentalmente com efluentes tratados da Estação de Tratamento de Esgotos de Ribeirão Preto – ETE-RP encontrou as seguintes médias de concentrações em alfaces irrigadas com efluente tratado e clorado: 0,110, 1,550, 0,010, 0,030 e 2,350 mg Kg⁻¹ para Cd, Cu, Hg, Pb e Zn respectivamente; e 0,001, 0,175, 0,124 e 1,440 mg Kg⁻¹ para Cd, Cu, Pb e Zn em amostras de rúcula respectivamente. No presente estudo, as médias de Cd e Cu em alfaces foram menores do que o encontrado por Nikaido (2009) e as médias de Pb e Zn foram maiores, tanto para hortaliças da feira quanto da horta experimental. Já para as amostras de rúcula, apenas a média de Cu foi inferior ao observado por Nikaido (2009), e as médias de Cd e Zn foram superiores, tanto para hortaliças cultivadas experimentalmente quanto para as coletadas em feiras livres. As concentrações de Pb apresentaram média superior à encontrada por Nikaido (2009) nas amostras provenientes das feiras livres. As amostras da horta tiveram média de Pb inferior ao referido trabalho.

Khan et al. (2008) avaliaram solos contaminados e culturas agrícolas irrigadas com água de reuso em Pequim, China quanto à concentração de metais pesados. Foram avaliadas as concentrações de Cd, Cr, Cu, Ni, Pb e Zn nas partes comestíveis de plantas cultivadas com irrigação com água residuárias, comparando-as com plantas cultivadas em solos de referência e com as normas de qualidade estabelecidas para legumes e frutas na China. Os resultados obtidos mostraram que houve diferenças significantes entre os grupos estudados para o Cd, que também está acima dos valores máximos permitidos, variando de 0,39 a 0,93 mg Kg⁻¹. Também houve diferenças significantes com maior contaminação de Pb em vegetais irrigados com água residuária, com valores entre 2,55 e 4,50 mg Kg⁻¹. Esses valores se mostraram muito superiores aos observados no presente estudo para a concentração desses metais, cujos máximos chegaram a 0,131 mg Kg⁻¹ para Cd e 1,470 mg Kg⁻¹ para Pb, considerando todos os tratamentos e grupos de amostras. Esse estudo também mostrou que dentre os vegetais cultivados, a alface apresentou maior tendência de concentração de metais pesados.

Ao analisarem concentrações de Cd, Cr, Ni e Pb em verduras cultivadas com água de reuso e verduras irrigadas com águas subterrâneas no Norte da Índia, Ghosh, Bhatt e Agrawal (2011), observaram que embora essa água contenha quantidades significativas de nutrientes para as plantas, as concentrações de Cd, Cr e Ni foram significativamente maiores nas

hortaliças irrigadas com essa água. Contudo, todos os valores observados estavam dentro dos limites estabelecidos.

Os autores apontam que as diferenças observadas na mobilidade e biodisponibilidade de metais em hortaliças devem-se às propriedades do solo e ao tipo de vegetal, uma vez que algumas variedades tendem a acumular mais metais do que outras. No presente estudo, metais como o Pb e o Cd apresentaram maiores concentrações nas hortaliças da horta experimental, também demonstrando uma tendência de aumento na concentração de metais em hortaliças irrigadas com água de reuso. Cabe destacar que Nikaido (2009), ao analisar o solo de cultivo de hortaliças irrigadas com água de reuso e compará-lo com o solo de cultivo de hortaliças irrigadas com água potável, constatou que os níveis de Cu, Cr, Pb e Zn foram maiores no primeiro caso. Os níveis de Cu apresentaram diferenças estatisticamente significantes, demonstrando que de fato o solo de cultivo irrigado com efluente tratado e clorado apresentava níveis superiores desse metal do que o solo irrigado com água potável.

A utilização de águas residuárias na agricultura tem se tornado uma alternativa para o quadro de escassez de água potável no mundo, especialmente devido ao seu alto teor de nutrientes. Com a criação de políticas específicas adequadas, é possível cultivar hortaliças com águas residuárias, no entanto, os dados demonstram que essa prática requer maiores estudos e monitoramento constante, considerando as possibilidades de contaminação microbiológica e química, decorrentes da carga de compostos químicos persistentes e bioagentes patogênicos resistentes aos sistemas de tratamento convencionais.

6. Conclusões

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

1. Quanto à presença de parasitas em geral, analisados pela Técnica de Sedimentação Espontânea, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre as amostras comercializadas em feiras livres do município de Ribeirão Preto e amostras cultivadas experimentalmente com uso de água residuária para irrigação. Entretanto, esse dado não atesta a qualidade parasitológica das verduras irrigadas com água de reuso, mas mostram que ambos os grupos apresentaram algum grau de contaminação por microrganismos patogênicos, evidenciando que a utilização de água residuária não se apresentou viável com cloração de 0,1 mg/L quanto à qualidade microscópica das hortaliças produzidas.
2. Especificamente para o protozoário *Giardia* spp., as hortaliças irrigadas com água de reuso apresentaram contaminação por esse parasita, ao contrário do observado nas amostras das feiras, que não estavam contaminadas. No caso de *Cryptosporidium* spp., a ausência de contaminação das hortaliças das feiras livres e a baixa contaminação das hortaliças irrigadas com água de reuso não apresentaram diferenças estatisticamente significantes. Isso mostra que para utilizar efluentes de tratamento de esgotos na cultura de hortaliças, é necessário desenvolver técnicas mais eficazes no controle desses parasitas, que são resistentes à cloração.
3. Quanto à concentração de metais, embora muitos tenham apresentado diferenças estatisticamente significantes quanto às suas concentrações entre verduras provenientes das feiras livres e da horta experimental, apenas o Pb apresentou valores próximos ou superiores ao Limite Máximo de Tolerância (LMT) para hortaliças, observados em ambos os tratamentos. Sendo assim, de acordo com o observado nos resultados obtidos pelas análises de metais, utilizar água de reuso na cultura de hortaliças não interfere significativamente na qualidade do produto agrícola, embora necessite de constante monitoramento, considerando a variabilidade temporal na composição do esgoto coletado em estações de tratamento.

7. Considerações Finais

A escassez de água potável tem levado a usos alternativos de recursos hídricos de qualidade inferior em diversos países ao redor do mundo. A reutilização de água na agricultura vem sendo apontada como um uso promissor de efluentes devido a sua alta carga de nutrientes para as plantas. Entretanto, para viabilização dessa prática é necessária a implantação de políticas de controle e monitoramento da qualidade dos produtos agrícolas e do ambiente no qual eles são cultivados.

Especificamente ao abordar a contaminação parasitológica, cabe ressaltar que o risco de contaminação é inerente a produção de hortaliças, e são vários os fatores que contribuem para isso. Além da contaminação pela água de irrigação, o contato com o solo, a utilização de adubos contaminados e até mesmo a circulação de roedores, insetos e outros animais, que podem atuar como vetores de microrganismos patogênicos, influenciam na qualidade parasitológica. Por isso a prática de higienização de verduras e legumes antes do consumo é essencial para a prevenção de infecções de origem alimentar.

Metais pesados são elementos cumulativos e alguns estudos vêm mostrando a progressão desse acúmulo no solo de cultivo quando da utilização em longo prazo de efluentes na agricultura. Várias medidas podem ser tomadas para minimização desse efeito, como o rodízio de culturas e até mesmo de áreas irrigadas com esses efluentes, alternando com outro tipo de irrigação.

Diante do quadro crescente de aumento da demanda por água e alimentos, gerado pelo aumento da população, e do comprometimento da qualidade dos recursos ambientais em diversas partes do mundo, mostra-se imprescindível buscar usos alternativos não potáveis para efluentes, visando contornar os problemas já existentes de escassez de água, para assim, preservar as fontes de água de qualidade para usos mais nobres, garantindo a preservação de fontes de água no futuro.

Referências

ABBOTT, M. P. **Modificações oxidativas em proteínas em presença de complexos de cobre (II)**. 2007. 138 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

AGÊNCIA NACIONAL DAS ÁGUAS. Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: <<http://www2.ana.gov.br/Paginas/default.aspx>> Acesso em: 06 abr. 2010.

ALMEIDA, M. T. T. **Avaliação microbiológica de alfaces (*Lactuca sativa*) em restaurantes self-service no município de Limeira – SP**. 2006. 91f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

ALZAMORA, S. M.; LOPES-MALO, A.; TAPIA, M.S. Overview. In: ALZAMORA, S.M; LOPES-MALO, A.; TAPIA, M.S (Ed). **Minimally processed fruits and vegetables: fundamental aspects and applications**. Gaithersburg: Aspen, 2000. p. 1-9.

AMBIENT. Estação de Tratamento de Esgoto de Ribeirão Preto. **Manual Informativo: Serviços Ambientais de Ribeirão Preto**. Ribeirão Preto. Disponível em: <<http://www.ambientbr.com.br>>. Acesso em: 08 out. 2009.

AMORÓS, I.; ALONSO, J. L.; CUESTA, G. *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts on salad products irrigated with contaminated water. **Journal of Food Protection**. Des Moines. v. 73. n. 6. p. 1138-1140. 2010.

APHA. American Public Health Association. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 20. ed. Washington DC: APHA INC. 1015, 1998. 1085 p.

BALBANI, A. P. S., BUTUGAN, O. Contaminação biológica de alimentos. **Pediatria**. São Paulo, v. 23, n. 4, p. 320-328. 2001.

BARCELOUX, D. G. Vanadium. **Journal of Toxicology – Clinical Toxicology**. Edinburgh. v. 37. n. 2. p. 265-278. 1999.

BERNARDI, C. C. **Reuso de água para irrigação**. 2003. 52f. Monografia (Especialização *Lato Sensu* modalidade MBA) – Ecobusiness School, ISEA/Fundação Getúlio Vargas, Brasília, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). **Manual prático de análise de água**. Brasília, DF, 2006. 146p.

_____. Ministério da Saúde. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União**, Brasília, 25 de março de 2004.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Plano Nacional de Vigilância e Controle das Enteroparasitoses**. Brasília, 2005. 42 p.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Ciência e Tecnologia. **Agenda nacional de prioridades de pesquisa em saúde**. 2. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2008. 68 p. (Série B. Textos Básicos em Saúde).

_____. Decreto Federal nº 55.871, de 26 de março de 1965. Modifica o Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961, referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto nº 691, de 13 de março de 1962. **Diária Oficial da União**, Brasília, 26 de março de 1965. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/decretos/55871_65.htm> Acesso em 06 nov. 2011.

_____. Resolução CNNPA nº 12, de 24 de julho de 1978. Resolve aprovar as NORMAS TÉCNICAS ESPECIAIS, do Estado de São Paulo, revistas pela CNNPA, relativas a alimentos (e bebidas), para efeito em todo território brasileiro. **Diário Oficial da União**, Brasília, 24 de julho de 1978.

_____. Portaria nº 685, de 27 de agosto de 1998. Aprova o Regulamento Técnico: "Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos". **Diário Oficial da União**, Brasília, 28 de agosto de 1998.

_____. Resolução nº12, de 02 de janeiro de 2001 Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Dispõe sobre o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos em alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 de janeiro de 2001.

BREGA FILHO, D.; MANCUSO, P. C. S. Conceitos de reuso da água. In: MANCUSO, P. C. S.; SANTOS, H. F. **Reuso de água**. São Paulo: Editora Manole, 2003. cap. 2, p. 21-36.

CAPUANO, D. M.; OKINO, M. H. T.; BETTINI, M. J. C. B.; MANGINI, A. C. S. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em hortaliças comercializadas no município de Ribeirão Preto, SP. Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 60 n. 1, p. 89-91, 2001.

CASTANIA, J. **Qualidade da água utilizada para consumo em escolas públicas municipais de ensino infantil de Ribeirão Preto – SP**. 2009. 146 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

CENTRO INTERNACIONAL DE REFERÊNCIA EM REUSO DA ÁGUA (CIRRA). Disponível em: <<http://www.usp.br/cirra/>> Acesso em: 13 jan. 2010.

COELHO, L. M. P. S.; OLIVEIRA, S. M.; MILMAN, M. H. S. A.; KARASAWA, K. A.; SANTOS, R. P. Detecção de formas transmissíveis de enteroparasitas na água e nas hortaliças consumidas em comunidades escolares de Sorocaba, São Paulo, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Uberaba. v. 34. n. 5. p. 479-482. 2001.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Análises microbiológicas de amostras ambientais**. Setor de cursos e capacitação. São Paulo: CETESB, 2009. 134 p.

_____. **Guia de Coleta e preservação de amostras de água**. São Paulo: CETESB, 1987. 155 p.

_____. **Reuso de água**. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/gesta_reuso.asp> Acesso em: 06 abr. 2010.

COOK, N.; NICHOLS, R. A. B.; WILKINSON, N.; PATON, C. A.; BARKER, K.; SMITH, H. V. Development of a method for detection of *Giardia duodenalis* cysts on lettuce and for simultaneous analysis of salad products for the presence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington. v. 73. n. 22. p. 7388-7391. 2007.

COOK, N.; PATON, C. A.; WILKINSON, N.; NICHOLS, R. A. B.; BARKER, K.; SMITH, H. V. Towards standard methods for the detection of *Cryptosporidium parvum* on lettuce and raspberries. Part 1: Development and optimization of methods. **International Journal of Food Microbiology**. Grugliasco. v. 109. p. 215-221. 2006.

CVJETKO, P.; CVJETKO, I.; PAVLICA, M. Thallium toxicity in humans. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**. Zagreb. v. 61. p. 111-119. 2010.

DEL RIO, D. T. **Biossorção de cádmio por leveduras *Saccharomyces cerevisiae***. 2004. 54 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

DOMINGO, J. L. Vanadium: a review of the reproductive and developmental toxicity. **Reproductive Toxicology**. Louisville. v. 10. n. 3. p. 175-182. 1996.

DPD_x – LABORATORY IDENTIFICATION OF PARASITES OF PUBLIC HEALTH CONCERN; CDC'S DIVISION OF PARASITIC DISEASES AND MALARIA (DPDM).

Balantidiasis. Disponível em: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Balantidiasis_il.htm>. Acesso em 15 nov. 2011.

EDWARDS, J. R., PROZIALECK, W. C. Cadmium, diabetes and chronic kidney disease. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Burlington, v. 238, n. 3, p. 289-293, 2009.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Rúcula**. Disponível em: <http://www.cnph.embrapa.br/laborato/pos_colheita/dicas/rucula.htm> Acesso em 20 ago. 2009.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA**. 2005. Disponível em: <<http://www.epa.gov/microbes>>. Acesso em: 20 out. 2010.

FALAVIGNA, L.M.; FREITAS, C. B. R.; MELO, G. C.; NISHI, L.; ARAÚJO, S. M.; FALAVIGNA-GUILHERME, A. L. Qualidade de hortaliças comercializadas no noroeste do Paraná, Brasil. **Parasitologia Latinoamericana**, Santiago, v. 60, n. 3-4, p. 144-149, 2005.

FAO, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAO Water Reports: Climate Changes, Water and Food Security**. Rome, 2011. 174p.

FDA, FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guia para minimização de riscos microbianos em produtos hortifrutículas frescos**. 1998. Disponível em: <<http://www.fda.gov>>

GALAL-GORCHEV, H. Desinfección del agua potable y subproductos de inter's para la salud. In: CRAUN, G.F.; CASTRO, R. (Ed) **La calidad del agua potable em America Latina: Ponderación de los riesgos microbiológicos contra los riesgos de los subproductos de La desinfección química**. Washington: ILSI Press, 1996. p. 89-100.

GALVÁN-ARZATE, S.; SANTAMARÍA, A. Tallium toxicity. **Toxicology Letters**. Würzburg. v. 99. p. 1-13. 1998.

GARCIA-GUINEA, J.; CORRECHER, V.; RECIO-VASQUEZ, L.; CRESPO-FEO, E.; GONZALES-MARTIN, R.; TORMO, L. Influence of accumulation of steel slag on the environment: determination of heavy metals content in the soils. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**. Rio de Janeiro. v. 82. n. 2. p. 267-277. 2010.

GARG, N.; CHUREY, J.J; SPLITTSTOESSER, D.F. Effect of processing conditions on the microflora of fresh vegetables. **Journal of Food Protection**, Ames, v.53, n.8, p. 701-703, 1990.

GHOSH, A. K.; BHATT, M. A.; AGRAWAL, H. P. Effect of long-term application of treated sewage water on heavy metal accumulation in vegetables grown in Northern India. **Environmental Monitoring and Assessment**. 2011. Dordrecht. DOI 10.1007/s10661-011-2018-6.

GONTIJO, B., BITTENCOURT, F. Arsênio – uma revisão histórica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. Rio de Janeiro. v. 80. n. 1. p. 91-95. 2005.

HELLER, L. Relação entre saúde e saneamento na perspectiva do desenvolvimento. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 2, p. 73-84, 1998.

HESPANHOL, I. Potencial de reuso de água no Brasil: agricultura, indústria, municípios, recarga de aquíferos. **Bahia Análise & Dados**, Salvador, v. 13, n. especial, p. 411-437. 2003.

INSTITUTO AGRONÔMICO (IAC). Instituto Agrônômico Portal do Governo do Estado de São Paulo - **Centro de Análise e Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Horticultura**. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br>>. Acesso em: 16 jan. 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Estimativas das populações residentes, em 1º de julho de 2009, segundo os municípios**. Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acesso em: 25 ago. 2009.

_____. **Atlas do Saneamento**. Uso múltiplo da água – 2000. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/atlas_saneamento/pdfs/mappag111.pdf>. Acesso em: 06 out. 2010.

INSTITUTO GEOGRÁFICO E CARTOGRÁFICO. (São Paulo, SP). **Região administrativa de Ribeirão Preto**: mapa. Escala 1: 500000. Disponível em: <http://www.igc.sp.gov.br/produtos/mapas_ra.aspx?ra=5>. Acesso em: 26 jul. 2010.

INTERGONVERNAMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGES - IPCC. **Fourth Assessment Report**: Climate Change 2007 (AR4). Disponível em: <<http://www.ipcc.ch>>. Acesso em: 06 out. 2010.

JOMOVA, K.; JENISOVA, Z.; FESZTEROVA, M.; BAROS, S.; LISKA, J.; HUDECOVA, D.; RHODES, C. J.; VALKO, M. Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease. **Journal of Applied Toxicology**. Malden. v. 31. p. 95-107. 2011.

KHAN, S.; CAO, Q.; ZHENG, Y. M.; HUANG, Y. Z.; ZHU, Y. G. Health risks of heavy metals in contaminated soils and food crops irrigated with wastewater in Beijing, China. **Environmental Pollution**. Amherst. v. 152. p. 686-692. 2008.

KUNO, R. **Valores de referência para chumbo, cádmio e mercúrio em população adulta da Região Metropolitana de São Paulo**. 2009. 166 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

LEITE, A. C. R. *Ancylostomidae*. In: NEVES, D.P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. cap 30, p. 261-269.

LIMA, E. C.; STAMFORD, T. L. M. *Cryptosporidium spp.* no ambiente aquático: aspectos relevantes da disseminação e diagnóstico. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v.8, n. 3, p. 791-800, 2003.

- LIMA, J. D. *Sarcocystis, Isospora e Cryptosporidium* In. NEVES, D.P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. cap 19, p. 173-180.
- LIMA, P. D. L.; VASCONCELLOS, M. C.; MONTENEGRO, R. C.; BAHIA, M. O.; COSTA, E. T.; ANTUNES, L. M. G.; BURBANO, R. R. Genotoxic effects of aluminum, iron, and manganese in human cells and experimental systems: a review of the literature. **Human and Experimental Toxicology**. Helsinki. v. 30. n. 10. p. 1435-1444. 2011.
- LUDWIG, K. M; FREI, F; ALVARES FILHO, F; RIBEIRO-PAES, J. T. Correlação entre condições de saneamento básico e parasitoses intestinais na população de Assis, Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v 32, n. 5, p. 547-555. 1999.
- MADDEN, J.N. Microbial pathogens in frsh produce: the regulatory perspective. **Journal of Food Protecton**, Ames, v. 55, n.10, p. 821- 823, 1992.
- MARTINEZ, V. D.; VUVIC, E. A.; ADONIS, M.; GIL, L.; LAM, W. L. Arsenic biotransformation as a cancer promoting factor by inducing DNA damage and disruption of repair mechanisms. **Molecular Biology International**. Nova York. v. 2011. 2011. doi:10.4061/2011/718974.
- MATTIAZZO-PREZOTTO, M. E. **Comportamento de cobre, cádmio, cromo, níquel e zinco adicionados a solos de clima tropical em diferentes valores de pH**. 1994. 197 f. Tese (Livre - Docência) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 1994.
- McCUIN, R.M.; CLANCY, J.L. Methods for the recovery, isolation and detection of *Cryptosporidium* oocysts in wastewaters. **Journal of Microbiological Methods**, Columbia, v. 63, p. 73-88, 2005.
- MEDEIROS, S. S.; SOARES, A. A.; FERREIRA, P. A.;NEVES, J. C. L.;SOUZA, J. A. Utilização de água residuária de origem doméstica na agricultura: estudo do estado nutricional do cafeeiro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.12, n.2, p. 109-115. 2008.

- MEHNERT, D. U. Reuso de efluente doméstico na agricultura e a contaminação ambiental por vírus entéricos humanos. **Biológico**, São Paulo, v. 65, n. 1/2, p.19-21, 2003.
- MENEZES-FILHO, J. A.; BOUCHARD, M.; SARCINELLI, P. N.; MOREIRA, J. C.; Manganese exposure and the neuropsychological effect on children and adolescents: a review. **Revista Panamericana de Salud Publica**, Washington, v. 26, n. 6, p. 541-548, 2009.
- MESQUITA, V. C. L.; SERRA, C. M. B.; BASTOS, O. M. P.; UCHÔA, C. M. A. Contaminação por enteroparasitas em hortaliças comercializadas nas cidades de Niterói e Rio de Janeiro, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 32, p. 363-366, n. 4, 1999.
- MORAES, D. S. L.; JORDÃO, B. Q. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**. São Paulo. v. 36. n. 3. p. 370-374. 2002.
- MOSER, V. C.; MCGEE, J. K.; EHMAN, K. D. Concentration and persistence of tin in rat brain and blood following dibutyltin exposure during development. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**. London. v. 72. n. 1 p. 47-52. 2011.
- NEVES, D. P. *Balantidium coli*. In: NEVES, D.P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005a. cap 20, p. 181-182.
- NEVES, D. P. *Hymenolepis nana*. In: NEVES, D.P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A.. **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005b. cap 27, p. 247-250.
- NEVES, D.P. Exame Parasitológico de Fezes. In: NEVES, D.P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A.. **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005c. cap 56, p. 455-464.
- NIKAIDO, M. **Uso de águas residuais tratadas na cultura de hortaliças: avaliação de metais pesados e enteroparasitas e seu impacto na saúde pública**. 2009. 138f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública), Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2009.

- NIKAIDO, M.; TONANI, K. A. A.; JULIÃO, F. C.; TREVILATO, T. M. B.; TAKAYANAGUI, A. M. M.; SANCHES, S. M.; DOMINGO, J. L.; SEGURA-MUÑOZ, S. I. Analysis of bacteria, parasites and heavy metals in lettuce (*Lactuca sativa*) and rocket salad (*Eruca sativa* L.) irrigated with treated effluent from a biological wastewater treatment plant. **Biological Trace Element Research**. San Diego. v. 134. p. 342-351. 2010.
- OLIVEIRA, C. A. F.; GERMANO, P. M. L. Estudo da ocorrência de enteroparasitas em hortaliças comercializadas na região metropolitana de São Paulo, SP, Brasil. II- Pesquisa de Protozoários Intestinais. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 26, p. 332-335, 1992.
- PALLU, A. P. S. **Biossorção de cádmio por linhagens de *Aspergillus* sp.** 2006. 69 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luis de Queiroz". Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.
- PAZ, V. P. S.; TEODORO, R. E. F.; MENDONÇA, F. C. Recursos hídricos, agricultura irrigada e meio ambiente. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 4, n. 3, p. 465-473, 2000.
- PEREIRA, M. A. **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.** 2008. 158 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.
- PETER, J.; VIRARAGHAVAN, T. Thallium: a review of public health and environmental concerns. **Environment International**. Elmsford. v. 31. p. 493-501. 2005.
- PLUM, L. M.; RINK, L.; HAASE, H. The essential toxin: impact of zinc on human health. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Basel, v. 7, n. 1342-1365, 2010.
- PROGRAMA DAS NAÇÕES UNIDAS PARA O DESENVOLVIMENTO-PNUD. **Objetivos de Desenvolvimento do Milênio.** Disponível em: <<http://www.pnud.org.br/odm/index.php#>>. Acesso em: 06 out. 2010.
- PRÜS-ÜSTÜN, A; CORVALÁN, C. World Health Organization. **Towards an estimate of the environmental burden of disease.** Geneva. 2006. 103 p.

QUADROS, R. M.; MARQUES, S. M. T.; FAVARO, D. A.; PESSOA, V. B.; ARRUDA, A. A. R.; SANTINI, J. Parasitos em alfaces (*Lectuca sativa*) de mercados e feiras livres de Lages – Santa Catarina. **Revista Ciência & Saúde**. Porto Alegre. v.1. n. 2. p. 78-84. 2008.

REBOUÇAS, A. C. Água doce no mundo e no Brasil. In: REBOUÇAS, A. C.; BRAGA, B.; TUNDISI, J. G. **Águas doces no Brasil**: Capital ecológico, uso e conservação. 3. Ed. São Paulo: Escrituras. 2006. cap. I, p. 1-35.

_____. Água e desenvolvimento rural. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 15, n. 43, p. 327 - 344, 2001.

_____. **Uso inteligente da água**. São Paulo: Escrituras. 2004. 206p.

RIBEIRÃO PRETO (Cidade). **Conheça Ribeirão**. Disponível em: <www.ribeiraopreto.sp.gov.br>. Acesso em: 05 set. 2009.

RODRIGUES, A. F. S. Balanço mineral brasileiro. **Departamento Nacional de Produção Mineral**. 2001. 29 p.

RODRIGUES, M. M.; BERTIN, B. M. A.; ASSIS, L.; DUARTE, E. B.; AVELAR, A. M. O.; PAIXÃO, J. T. S.; MATTOS, M. C.; SOUZA, M. M. S. Indícios de *Rotavirus* na etiologia de um surto de infecção de origem alimentar. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.24, n.1, p. 88-93. 2004.

ROMAÑA, D. L.; OLIVARES, M.; UAUY, R.; ARAYA, M. Risks and benefits of copper in light of new insights of copper homeostasis. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**. Stuttgart. v. 25. p. 3-13. 2011.

ROQUE, O. C. C. **Sistemas Alternativas de Tratamento de Esgotos Aplicáveis as Condições Brasileiras**. 1997. 153 f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1997.

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

ROWE, D.; ABDEL-MAGID, I. M. **Handbook of wastewater reclamation and reuse**. Washington: Lewis Publishers, 1995, 576 p.

RZEŻUTKA, A.; NICHOLS, R. A. B.; CONNELLY, L.; KAUPKE, A.; KOZYRA, I.; COOK, N.; BIRRELL, S.; SMITH, H. V. *Cryptosporidium* oocysts on fresh produce from areas of high livestock production in Poland. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, p. 96-101, 2010.

SANDERS, T., LIU, Y., BUCHNER, V., TCHOUNWOU, P. B. Neurotoxic effects and biomarkers of lead exposure: a review. **Reviews on Environmental Health**, Tel Aviv, v. 24, n. 1, p. 15-45, 2009.

SANTOS, I. J.; SOUZA, M. A. A. Reuso de água: Uma análise da adequabilidade da utilização das águas residuárias tratadas no distrito federal. In: XXVII CONGRESSO INTERAMERICANO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 2000. Porto Seguro. **Resumos...** Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2000.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Agricultura e Abastecimento. **Projeto LUPA: Levantamento censitário das unidades de produção agropecuária do Estado de São Paulo.** Disponível em: <<http://www.cati.sp.gov.br/projetolupa>> Acesso em: 20 jan. 2010a.

_____. Secretaria do Emprego e Relações do Trabalho. **Foco 2010: Região administrativa de Ribeirão Preto.** Disponível em: <http://www.emprego.sp.gov.br/outros/caravana_trabalho/foco_2010/ra_ribeiraopreto.pdf> Acesso em: 28 out. 2010b.

SARAIVA, E. D. **Avaliação hematológica, atividade enzimática e níveis de metais na exposição ocupacional aos defensivos agrícolas e fertilizantes.** 2009. 62 f. Tese (Doutorado em Toxicologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

SARAIVA, N., BALLESTERO, L. G. B., POVÊA, A. M., ANIBAL, F. F. Incidência da contaminação parasitária em alfaces nos municípios de Araraquara (SP) e São Carlos (SP). **Revista Uniara**, Araraquara, v.3, n 16, p.213-218. 2005.

SATARUG, S., GARRETT, S. H., SENS, M. A., SENS, D. A. Cadmium, environmental exposure, and health outcomes. **Environmental Health Perspectives**, Cary, v. 118, n. 2, p. 182-190, 2010.

- SAWYER, R.; MAIER, L. A. Chronic beryllium disease: an updated model interaction between innate and acquired immunity. **Biometals**. Oxford. v. 21. p. 1-17. 2011.
- SCHNEIDER, A. C. R. **Avaliação de zinco plasmático em crianças e adolescentes com cirrose**. 2006. 117 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2006.
- SEGURA-MUÑOZ, S. I. **Impacto ambiental na área do Aterro Sanitário e Incinerador de Resíduos Sólidos de Ribeirão Preto, SP**: avaliação dos níveis de metais pesados. 2002. 131 f. Tese (Doutorado em Enfermagem em Saúde Pública). Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2002.
- SILVA, A. V. M.; MASSARA, C. L. *Ascaris lumbricoides*. In: NEVES, D.P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A.. **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. cap 29, p. 253-260.
- 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. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 10, p. 63-69, 2005.
- SILVA, M. L. S.; VITTI, G. C.; TREVIZAN, A. R. Concentração de metais pesados em grãos de plantas cultivadas em solo com diferentes níveis de contaminação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília. v. 42. n. 4. p. 527-535. 2007.
- SILVA, J. P.; MARZORCHI, M. C. A.; CAMILLO-COURA, L.; MESSIAS, A. A.; MARQUES, S. Estudo da contaminação por enteroparasitas em hortaliças comercializadas nos supermercados da cidade do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 28, p.237-241. 1995.
- SILVA, S. R. P.; VERDIN, S. E. F.; PEREIRA, D. C.; SCHATKOSKI, A. M.; ROTT, M. B.; CORÇÃO, G. Microbiological quality of minimally processed vegetables sold in Porto Alegre, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, p. 594-598. 2007.
- SIMOES, M.; PISANI, B.; MARQUES, E. G. L.; PRANDI, M. A. G.; MARTINI, M. H.; CHIARINI, P. F. et al. Hygienic-sanitary conditions of vegetables and irrigation water from kitchen gardens in the municipality of Campinas, SP. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 32, p. 331-333, 2001.

- SLIFKO, T. R.; SMITH, H. V.; ROSE, J. B. Emergency parasite zoonoses associated with water and food. **International Journal for Parasitology**, Cairns, v. 30, p. 1389-1393, 2000.
- SMITH, A. H.; STEINMAUS, C. M. Human effects of arsenic and chromium in drinking water: recent human findings. **Annual Review of Public Health**, Palo Alto, v. 30, p. 107-122. 2009.
- SMITH H.V. Detection of parasites in the environmental. **Parasitology**, Glasgow, v.117, p.113-141, 1998.
- SOGAYER, M. I. T. L.; GUIMARÃES, S. *Giardia*. In: NEVES, D.P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A.. **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. cap 14, p. 121-126.
- SOARES, B.; CANTOS, G. A. Detecção de estruturas parasitárias em hortaliças comercializadas na cidade de Florianópolis, SC, Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. São Paulo. v. 42. n. 3. p. 455-460.
- STRUPP, C. Beryllium metal II. A review of the available toxicity data. **Annals of Occupation Hygiene**. Oxford. v. 55. n. 1. p. 43-56. 2011.
- TABER, K. H., HURLEY, R. A. Mercury exposure: effects across the lifespan. **Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences**, Arlington, v. 20, n. 4, p. 384-389, 2008.
- TAKAYANAGUI, O. M.; FEBRÔNIO, L. F. P.; BERGAMINI, A. M.; OKINO, M. H. T.; SILVA, A. A. M. C. C.; SANTIAGO, R.; CAPUANO, D. M.; OLIVEIRA, M. A.; TAKAYANAGUI, A. M. M. Fiscalização de hortas produtoras de verduras do município de Ribeirão Preto, SP. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 33, n. 2, p. 69-174, 2000.
- TELLES, D. D.; DOMINGUES, A. F. Água na agricultura e pecuária. In: REBOUÇAS, A. C.; BRAGA, B.; TUNDISI, J. G. **Águas doces no Brasil: Capital ecológico, uso e conservação**. 3. ed. São Paulo: Escrituras. 2006. cap. 1. p. 1-35.
- TONANI, K. A. A. **Identificação e quantificação de metais pesados, parasitas e bactérias em esgoto bruto e tratado da Estação de Tratamento de Esgotos de Ribeirão Preto – SP.**

2008. 179 f. Dissertação (Mestrado em Enfermagem em Saúde Pública), Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.
- TONANI, K. A. A. **Bioagentes patogênicos em águas residuárias: destaque para *Giardia spp.*, *Cryptosporidium spp.*, bactérias indicadoras e vírus entéricos.** 2011. 137 p. Tese (Doutorado em Ciências), Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.
- TRABUCCO, A.; DI PIETRO, P.; NORI, S. L.; FULCERI, F.; FUMAGALLI, L.; PAPARELLI, A.; FORNAI, F. Methylated tin toxicity a reappraisal using rodents models. **Archives Italiennes de Biologie.** Piza. v. 147. p. 141-153. 2009.
- TUNDISI, J. G. Recursos hídricos no futuro: problemas e soluções. **Estudos Avançados.** São Paulo. v. 22 n. 63. São Paulo, 2008.
- VIGGIANO, J. Produção de sementes de alface. In: CASTELLANE, P.D; NICOLOSI, W.M; HASEGAWA, M (Ed). **Produção de sementes de hortaliças.** Jaboticabal: FCAV/FUNEP, 1990. p. 1-13.
- VITOR, R. W. A. Protozoa. In: NEVES, D.P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia Humana.** 11. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. cap 56, p. 455-64.
- WEINBERG, E. D. The hazards of iron loading. **Metallomics.** London. v. 2. p. 732-740.
- WESTERHOFF, G. P. Un update of research needs for water reuse. In: WATER REUSE SYMPOSIUM, 3° **Proceedings.** San Diego, 1984.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Reuse of effluents: methods of wastewater treatment and health safeguards. Of a WHO meeting of experts. **Report,** Geneva, 1973. (Technical Report Series 517).
- WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO/UNICEF. **Progress on sanitation and drinking-water.** Joint Monitoring Programme for Water Supply and Sanitation.. Genebra: WHO Library. 2010. 60 p.
- ZEIUTONI, C. F. **Eficiência de espécies vegetais como fitoextratoras de cádmio, chumbo, cobre, níquel e zinco de um latossolo vermelho amarelo distrófico.** 2003. 91 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agronômico, Campinas, 2003.

Apêndices

APÊNDICE A – Concentrações de metais em amostras de alface (*Lactuca sativa*).

Tratamento	Amostra	Metais (mg/Kg)					
		Zn	Mn	Cu	Pb	Cd	Fe
Feira Livre	1	5,404	1,681	0,387	0,054	0,004	4,451
	2	4,816	3,081	0,367	0,052	0,009	7,380
	3	4,191	1,136	0,418	0,077	0,006	13,552
	4	1,975	0,748	0,216	0,046	0,005	7,636
	5	4,725	6,675	2,620	0,051	0,007	15,654
	6	6,083	13,116	0,418	0,155	0,029	10,998
	7	4,161	4,383	0,350	0,043	0,004	5,436
	8	6,965	2,318	0,324	0,033	0,005	4,720
	9	7,959	1,507	0,543	0,096	0,009	10,369
	10	6,099	1,106	0,279	0,549	0,011	6,759
	11						
	12	8,387	2,731	0,496	0,049	0,004	4,260
	13	6,920	1,131	0,541	0,065	0,004	28,987
	14	5,915	3,797	0,469	0,049	0,006	7,855
	15	11,583	3,085	0,682	0,041	0,005	10,422
	16	3,110	0,825	0,223	0,053	0,005	21,689
	17	9,694	7,312	0,540	0,073	0,008	20,827
	18	7,453	9,256	0,435	0,105	0,019	17,372
	19	7,742	3,368	0,528	0,087	0,016	12,215
	20	7,389	3,211	0,342	1,126	0,131	6,746
Esgoto Tratado e Clorado	1	7,478	45,929	0,801	0,211	0,017	41,001
	2	5,345	4,854	0,435	0,219	0,007	19,122
	3	6,212	10,384	0,629	0,148	0,012	20,805
	4	5,069	3,287	0,390	0,183	0,011	27,828
	5	3,401	2,030	0,221	0,745	0,015	10,832
	6	6,061	4,367	0,462	0,591	0,016	12,013
	7	6,685	3,927	0,481	0,343	0,010	20,489
	8	4,254	2,654	0,224	1,470	0,078	9,646
	9	5,741	3,596	0,342	1,143	0,033	34,716
	10	5,737	3,755	0,436	0,514	0,026	12,774
	11	4,885	15,674	0,383	0,086	0,009	19,594
	12	4,238	11,008	0,418	0,125	0,011	11,226
	13	3,515	11,821	0,413	0,062	0,007	23,208
	14	4,398	8,448	0,356	0,125	0,011	168,620
	15	4,319	18,323	0,355	0,112	0,012	22,323
	16	4,840	15,197	0,482	0,123	0,010	16,546
	17	3,792	14,819	0,432	0,186	0,016	27,694
	18	6,421	35,506	0,633	0,146	0,016	43,299
	19	4,389	24,672	0,417	0,091	0,009	23,454
	20	6,584	27,467	0,508	0,086	0,014	27,110

APÊNDICE B – Concentrações de metais em amostras de rúcula (*Eruca sativa*).

Tratamento	Amostra	Metais (mg Kg ⁻¹)					Fe
		Zn	Mn	Cu	Pb	Cd	
Feira Livre	1	7,820	2,739	0,759	0,053	0,014	74,661
	2	5,098	2,212	0,480	0,055	0,011	35,348
	3	9,401	6,429	0,758	0,082	0,012	60,715
	4	6,019	2,797	0,542	0,073	0,009	57,375
	5						
	6	7,406	2,867	0,931	0,667	0,013	51,257
	7	9,795	1,694	0,921	0,101	0,022	42,219
	8	8,765	1,717	0,816	0,063	0,015	36,891
	9	6,293	1,565	0,443	0,083	0,009	23,399
	10	4,953	1,505	0,527	0,059	0,007	22,328
	11	6,855	1,807	0,849	0,070	0,009	31,807
	12	8,303	1,764	0,528	0,061	0,006	33,490
	13	8,001	3,909	0,953	0,036	0,015	46,857
	14	7,023	4,121	0,646	0,053	0,022	22,042
	15	8,601	5,430	0,910	0,090	0,030	44,170
	16						
	17	13,510	14,062	1,422	0,076	0,012	70,722
	18	16,387	18,895	1,475	0,084	0,012	50,172
	19	13,877	9,159	1,545	0,103	0,049	64,166
	20	11,000	2,426	0,684	0,138	0,025	38,184
Esgoto Tratado e Clorado	1	7,025	10,977	0,716	0,165	0,015	107,278
	2	7,763	18,411	0,870	0,099	0,014	152,939
	3	5,984	7,755	0,614	0,340	0,045	66,738
	4	6,111	11,928	0,685	0,181	0,024	53,522
	5	7,890	8,377	1,023	0,123	0,010	6,250
	6	6,231	7,385	0,652	0,204	0,018	62,919
	7	6,432	11,215	0,844	0,109	0,011	89,695
	8	4,815	20,436	0,688	0,303	0,022	212,788
	9	5,893	14,637	0,654	0,191	0,017	80,016
	10	5,344	16,378	0,582	0,278	0,027	83,091
	11	10,644	32,760	1,022	0,131	0,026	76,924
	12	7,719	29,794	0,749	0,127	0,017	44,657
	13	7,615	37,920	0,771	0,118	0,020	63,322
	14	6,307	21,174	0,676	0,207	0,034	188,249
	15	8,026	33,087	0,754	0,495	0,074	67,552
	16	8,314	22,130	1,285	0,460	0,027	179,720
	17	8,671	36,479	0,926	0,142	0,022	77,170
	18	8,286	31,924	0,793	0,177	0,024	83,065
	19	8,783	29,492	0,883	0,076	0,019	35,196
	20	6,504	34,118	0,553	0,112	0,015	42,749

APÊNDICE C – Teste estatístico da ocorrência de parasitas em alface (*Lactuca sativa*) e rúcula (*Eruca sativa*) procedentes da horta experimental e das feiras livres.

	X Labels	A
	Parameter	Value
	X	Y
1	Table Analyzed	Parasitas alface Columns A and B
2		
3	Mann Whitney test	
4	P value	0.9450
5	Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
6	P value summary	ns
7	Are medians signif. different? ($P < 0.05$)	No
8	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
9	Sum of ranks in column A,B	407 , 413
10	Mann-Whitney U	197.0
11		

	X Labels	A
	Parameter	Value
	X	Y
1	Table Analyzed	Parasitas rúcula Columns A and B
2		
3	Mann Whitney test	
4	P value	0.7096
5	Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
6	P value summary	ns
7	Are medians signif. different? ($P < 0.05$)	No
8	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
9	Sum of ranks in column A,B	424 , 396
10	Mann-Whitney U	186.0
11		

APÊNDICE D – Testes estatísticos das concentrações de metais em amostras de alface (*Lactuca sativa*) procedentes da horta experimental e das feiras livres.

Cd

	X Labels	A
	Parameter	Value
	X	Y
1	Table Analyzed	MetaisALF Columns G and S
2		
3	Mann Whitney test	
4	P value	0.0036
5	Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
6	P value summary	**
7	Are medians signif. different? ($P < 0.05$)	Yes
8	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
9	Sum of ranks in column G,S	276 , 504
10	Mann-Whitney U	86.00
11		

Cu

	X Labels	A
	Parameter	Value
	X	Y
1	Table Analyzed	MetaisALF Columns C and O
2		
3	Mann Whitney test	
4	P value	0.9888
5	Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
6	P value summary	ns
7	Are medians signif. different? ($P < 0.05$)	No
8	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
9	Sum of ranks in column C,O	379 , 401
10	Mann-Whitney U	189.0
11		

Pb

	X Labels	A
	Parameter	Value
	X	Y
1	Table Analyzed	MetaisALF Columns E and Q
2		
3	Mann Whitney test	
4	P value	0.0002
5	Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
6	P value summary	***
7	Are medians signif. different? ($P < 0.05$)	Yes
8	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
9	Sum of ranks in column E,Q	248 , 532
10	Mann-Whitney U	58.00
11		

Fe

	X Labels	A
	Parameter	Value
	X	Y
1	Table Analyzed	MetaisALF Columns L and X
2		
3	Mann Whitney test	
4	P value	0.0003
5	Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
6	P value summary	***
7	Are medians signif. different? ($P < 0.05$)	Yes
8	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
9	Sum of ranks in column L,X	250 , 530
10	Mann-Whitney U	60.00
11		

Mn

	X Labels	A
	Parameter	Value
	X	Y
1	Table Analyzed	MetaisALF Columns B and N
2		
3	Mann Whitney test	
4	P value	0.0003
5	Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
6	P value summary	***
7	Are medians signif. different? ($P < 0.05$)	Yes
8	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
9	Sum of ranks in column B,N	251 , 529
10	Mann-Whitney U	61.00
11		

Zn

	X Labels	A
	Parameter	Value
	X	Y
1	Table Analyzed	MetaisALF Columns A and M
2		
3	Mann Whitney test	
4	P value	0.0745
5	Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
6	P value summary	ns
7	Are medians signif. different? ($P < 0.05$)	No
8	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
9	Sum of ranks in column A,M	444 , 336
10	Mann-Whitney U	126.0
11		

APÊNDICE E - Testes estatísticos das concentrações de metais em amostras de rúcula (*Eruca sativa*) procedentes da horta experimental e das feiras livres.

Cd

	X Labels		A
	Parameter		Value
	X		Y
1	Table Analyzed		MetaisRUC Columns G and S
2			
3	Mann Whitney test		
4	P value		0.0105
5	Exact or approximate P value?		Gaussian Approximation
6	P value summary		*
7	Are medians signif. different? ($P < 0.05$)		Yes
8	One- or two-tailed P value?		Two-tailed
9	Sum of ranks in column G,S		263 , 478
10	Mann-Whitney U		92.00
11			

Cu

	X Labels		A
	Parameter		Value
	X		Y
1	Table Analyzed		MetaisRUC Columns C and O
2			
3	Mann Whitney test		
4	P value		0.9185
5	Exact or approximate P value?		Gaussian Approximation
6	P value summary		ns
7	Are medians signif. different? ($P < 0.05$)		No
8	One- or two-tailed P value?		Two-tailed
9	Sum of ranks in column C,O		355 , 386
10	Mann-Whitney U		176.0
11			

Pb

	X Labels		A
	Parameter		Value
	X		Y
1	Table Analyzed		MetaisRUC Columns E and Q
2			
3	Mann Whitney test		
4	P value		$P < 0.0001$
5	Exact or approximate P value?		Gaussian Approximation
6	P value summary		***
7	Are medians signif. different? ($P < 0.05$)		Yes
8	One- or two-tailed P value?		Two-tailed
9	Sum of ranks in column E,Q		207.5 , 533.5
10	Mann-Whitney U		36.50
11			

Fe

	X Labels	A
	Parameter	Value
	X	Y
1	Table Analyzed	MetaisRUC Columns L and X
2		
3	Mann Whitney test	
4	P value	0.0007
5	Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
6	P value summary	***
7	Are medians signif. different? ($P < 0.05$)	Yes
8	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
9	Sum of ranks in column L,X	234 , 507
10	Mann-Whitney U	63.00
11		

Mn

	X Labels	A
	Parameter	Value
	X	Y
1	Table Analyzed	MetaisRUC Columns B and N
2		
3	Mann Whitney test	
4	P value	$P < 0.0001$
5	Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
6	P value summary	***
7	Are medians signif. different? ($P < 0.05$)	Yes
8	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
9	Sum of ranks in column B,N	189 , 552
10	Mann-Whitney U	18.00
11		

Zn

	X Labels	A
	Parameter	Value
	X	Y
1	Table Analyzed	MetaisRUC Columns A and M
2		
3	Mann Whitney test	
4	P value	0.1047
5	Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
6	P value summary	ns
7	Are medians signif. different? ($P < 0.05$)	No
8	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
9	Sum of ranks in column A,M	407 , 334
10	Mann-Whitney U	124.0
11		