

Adaptação ao Método de Ritchie para diagnóstico de Helmintos e Protozoários em amostras de lodo de esgoto com minimização de produtos químicos

Adaptation of Ritchie Method for diagnosing Helminthes and Protozoa in samples of sewage silt with chemical substances minimization

La adaptación del Método de Ritchie para la diagnosis de Helmintos y protozoos en muestras de aguas residuales con minimización de productos químicos

Ariane Fonseca Almeida*
Karina Aparecida Abreu Tonani**
Susana Inés Segura-Munoz****

Victor Moreira dos Santos*
Angela Maria Magosso Takayanagui***

RESUMO: O Método de Ritchie (1948) é uma metodologia eficiente para diagnóstico parasitário em matrizes ambientais, porém apresenta como desvantagem o uso do éter etílico e formaldeído, reagentes toxicológicos para a saúde ambiental e ocupacional. O objetivo do estudo foi padronizar uma técnica adaptada do Método de Ritchie para identificação de parasitas em lodo de esgoto, que evite o uso de substâncias tóxicas e possa ser utilizada em laboratórios de parasitologia. Amostras de lodo foram submetidas ao Método Ritchie (MR) e ao Método de Ritchie Modificado por Régis Anécimo (MRMRA), no qual substâncias químicas são substituídas por água a 45°C e detergente neutro. Os resultados demonstraram que, no MR, a porcentagem de *Ancylostoma* sp foi de 19%, *Hymenolepis* sp 79%, *Ascaris* sp 2% e *Trichuris trichiura* 0%, em um total de 1970 helmintos visualizados. Porém, no MRMRA, a porcentagem de *Ancylostoma* sp foi de 56%, *Hymenolepis* sp 40%, *Ascaris* sp 4% e *Trichuris trichiura* 0%, em um total de 398 helmintos. Avaliando quantitativamente o MRMRA foi menos eficiente, pois esses resultados demonstraram uma diferença significativa de helmintos visualizados entre os métodos. Porém, enquanto análise qualitativa, a técnica pode ser considerada válida, uma vez que a qualidade da visualização dos parasitas é correspondente em ambos os métodos. Pode ser concluído que o MRMRA é um método simples de realizar e de fácil implementação na rotina de laboratórios e estações de tratamento de esgoto.

PALAVRAS-CHAVE: Parasitologia. Saúde Pública. Parasitologia - técnicas de diagnóstico.

ABSTRACT: Ritchie Method (1948) is an efficient methodology for diagnosing parasitic organisms in environmental matrixes, but the use of ethylic ether and formaldehyde is an disadvantage, for these are toxic reagents that damages the environment and affects occupational health. The objective of this study was to standardize a suitable technique of Ritchie Method for the identification of parasites in sewage silt, which avoids the use of toxic substances and can be used in parasitological laboratories. Samples of silt were submitted to Ritchie Method (RM) and Method of Modified Ritchie by Régis Anécimo (MRMRA), in which water at 45°C and neutral detergent substitute for chemical substances. Results show that in RM the percentage of *Ancylostoma* sp was 19%, *Hymenolepis* sp 79%, *Ascaris* sp 2% and *Trichuris trichiura* 0% from a total of 1970 visualized helminthes, whereas in MRMRA the percentage of *Ancylostoma* sp was 56%, *Hymenolepis* sp 40%, *Ascaris* sp 4% and *Trichuris trichiura* 0% in a total of 398 helminthes. Evaluated quantitatively MRMRA was less efficient, for these results show a significant difference in the number of helminthes identified by the methods. However, a qualitative analysis shows the technique to be valid, since the quality of parasites identification is the same in both methods. We may conclude that MRMRA is a simple and easy method to be used in the routine of laboratories and sewage treatment stations.

KEYWORDS: Parasitology. Public health. Diagnosis Parasitology - techniques.

RESUMEN: El Método de Ritchie (1948) es una metodología eficiente para diagnosticar organismos parásitos en matrices ambientales, pero el uso de del éter etílico y del formaldehído es una desventaja, vez que son reactivos tóxicos para el ambiente y la salud ocupacional. El objetivo de este estudio fue estandarizar una técnica conveniente del Método de Ritchie como para la identificación de parásitos en el lógamo de las aguas residuales, técnica que evita el uso de sustancias tóxicas y se puede utilizar en laboratorios parasitológicos. Las muestras de lógamo fueron sometidas al Método de Ritchie (MR) y al Método de Ritchie Modificado por Régis Anécimo (MRMRA), en el cual quien el agua en 45° C y detergente neutral substituyen las sustancias químicas. Los resultados demuestran que en RM el porcentaje de *Ancylostoma* sp fue 19%, *Hymenolepis* sp 79% *Ascaris* sp 2% y *Trichuris trichiura* 0% de un total de 1970 helmintos, mientras que en el MRMRA el porcentaje del de *Ancylostoma* sp fue 56%, *Hymenolepis* sp 40% *Ascaris* sp 4% y *Trichuris trichiura* 0% de un total de 398 helmintos. Cuantitativamente evaluado MRMRA fue menos eficiente, porque estos resultados demuestran una diferencia significativa de los helmintos identificados por los métodos. Sin embargo, un análisis cualitativo demuestra que la técnica es válida, puesto que la calidad de la identificación de los parásitos está igual en ambos métodos. Se puede concluir que MRMRA es un método simple y fácil como para ser utilizado en la rutina de laboratorios y de estaciones del tratamiento de aguas residuales.

PALABRAS LLAVE: Parasitología. Salud pública. Parasitología diagnosis - técnicas.

* Aluno do Curso de Graduação em Enfermagem. Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Bolsista de Iniciação Científica junto ao Laboratório Ecotoxicologia e Parasitologia Ambiental – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Bolsistas: FAPESP e PIBITI/CNPq.

** Doutoranda. Programa de Enfermagem em Saúde Pública do Departamento de Enfermagem Materno-Infantil e Saúde Pública. Laboratório Ecotoxicologia e Parasitologia Ambiental – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Bolsista: FAPESP.

*** Professora Associada. Departamento Materno-Infantil e Saúde Pública da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Laboratório de Saúde Ambiental.

**** Professora Doutora. Departamento Materno-Infantil e Saúde Pública. Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Laboratório de Ecotoxicologia e Parasitologia Ambiental.

Introdução

As parasitoses são causas relevantes de agravos à saúde quando as condições socioeconômica e culturais precárias permitem a manutenção e disseminação de ciclos biológicos de vários parasitas^{1,2}. No continente americano, estima-se que cerca de 200 milhões de pessoas estejam infectadas por algum tipo de parasita intestinal, ocorrendo cerca de dez mil óbitos a cada ano devido somente ao parasitismo por helmintos intestinais³. No Brasil, em função das diferenças regionais, a contaminação do ambiente é intensa em determinadas regiões, e a prevalência de parasitoses intestinais é elevada, principalmente nas regiões norte e nordeste, em função, sobretudo, de saneamento básico deficiente, precária educação sanitária da população associada ao baixo nível de renda e má qualidade dos serviços de saúde^{4,5,6}.

Segundo Relatório de Desenvolvimento Humano⁷, no Brasil, a proporção da população com acesso à água potável é de 90%, porém apenas metade possui rede de esgoto e, segundo o diagnóstico elaborado para a realização da Conferência Nacional das Cidades, com base nos dados divulgados por pesquisas do IBGE, é justamente aos mais pobres que o saneamento mais falta⁸. Assim, universalizar a provisão de água, sem o devido tratamento de esgotos, é propiciar uma oportunidade para que o esgoto não tratado seja uma fonte de contaminação para as pessoas.

O Relatório de Desenvolvimento Humano⁷ destaca que, no Brasil, os 20% mais ricos têm um acesso a água e saneamento em níveis comparáveis aos dos países desenvolvidos, mas que entre os 20% mais pobres proliferam taxas de cobertura mais baixas do que no Vietnã. Dados do IPEA⁹ sobre a cobertura de água de rede canalizada e esgo-

to, no ano de 2007, mostram que a região que apresenta o pior desempenho é o Centro-Oeste, onde pouco mais de 52% da população urbana possui esgoto adequado, enquanto a cobertura no Norte é cerca de 60% e no Nordeste é de 68,4%. O tratamento de esgotos ainda é muito baixo em todo o País e merece ser foco de ações de política de saúde pública.

Com a coleta e o tratamento de esgoto, as águas residuais provenientes do uso urbano, comercial e industrial são submetidas a um tratamento que visa a reduzir consideravelmente a carga de matéria orgânica, agentes patogênicos e outros detritos, tendo como subprodutos o esgoto tratado e o lodo de esgoto, um resíduo de composição variável e de altíssimo potencial poluidor. Dessa forma, as estações de tratamento de esgoto defrontam-se com o problema da destinação do lodo de esgoto, resíduo que permanece após o tratamento dos efluentes. Diversas alternativas têm sido buscadas, entre elas a utilização de solos como meio de descarte, situação em que há risco de poluição ambiental, com possibilidade de contaminação da cadeia alimentar com diversas substâncias químicas e outros elementos nocivos.

O lodo é usado, também, como adubo em plantações, sendo um importante indicador de controle de qualidade no processo de tratamento do esgoto, além de trazer informações epidemiológicas sobre doenças infecto-contagiosas prevalentes nas comunidades que geram o esgoto.

Gerba, Smith¹⁰ ressaltam que a concentração de patógenos no esgoto e no lodo de esgoto está diretamente relacionada com a incidência de infecções entéricas dentro da comunidade. Muita atenção é dada à presença de ovos de helmintos em efluentes finais, efluentes usados para irrigação ou lodo de esgoto,

pela sua alta resistência a condições ambientais adversas.

Os controles impostos para a prática da aplicação do lodo de esgoto geralmente têm o objetivo de proteger a saúde pública e o ambiente, mas deve-se levar em conta fatores, como a disponibilidade de tecnologias de controle, a relação custo-eficácia, a aceitação pública, assim como as realidades políticas¹¹.

Dessa maneira, tanto se tratando da prevenção à doença quanto da promoção à saúde, tem sido necessário o desenvolvimento de novas metodologias de análise parasitológica que sejam adaptadas às características do lodo de esgoto e possam ter qualidade e sensibilidade suficientes para trazer índices seguros.

Dentre as diversas técnicas existentes para a análise parasitológica, destaca-se o Método de Ritchie (1948), que tem base em uma metodologia de reconhecida eficiência para o diagnóstico de helmintos e protozoários nas fezes, pela realização de uma centrifugo-sedimentação com o uso do éter etílico (C₄H₁₀O) e formaldeído (HCHO), dois reagentes tóxicos tanto para a saúde ambiental quanto para a ocupacional¹².

O presente estudo teve como objetivo propor uma técnica adaptada do Método Tradicional de Ritchie para a identificação de helmintos e protozoários que evite o uso de substâncias tóxicas e possa ser utilizada em Laboratórios de Parasitologia Ambiental para o diagnóstico de helmintos e protozoários em lodo de esgoto, denominado o Método de Ritchie Modificado por Régis Anécimo (MRMRA).

Material e métodos

O município de Ribeirão Preto apresenta duas estações de tratamento de esgoto, a Estação de Tratamento de Esgotos Ribeirão Preto e a Caiçara. O Departamento de

Água e Esgoto de Ribeirão Preto (DAERP) e a Ambient-Serviços Ambientais de Ribeirão Preto S. A. chegaram a um acordo para a conclusão das obras de interceptação na rede de esgoto da cidade. Para atingir a meta de 100%, é preciso instalar cerca de 40 quilômetros de interceptores e emissários, estando o projeto previsto para terminar em seis anos, ou seja, provavelmente a cidade apresentará 100% de esgoto tratado até 2015¹³.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Ecotoxicologia e Parasitologia Ambiental da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

As amostras de lodo foram coletadas na Estação de Tratamento de Esgoto de Ribeirão Preto. Foi realizada a análise de 100 amostras do lodo de esgoto, segundo o método de Ritchie (MR) e o Método de Ritchie Modificado por Régis Anécimo (MRMRA). Para o desenvolvimento das técnicas, foram utilizados 10g da amostra coletada. A amostra foi coletada com o auxílio de uma espátula estéril, colocada em frascos de boca larga e com tampa rosqueada. O tempo desde a coleta da amostra até o início da análise não ultrapassou 48 horas¹⁴.

Amostras positivas para a técnica de sedimentação foram separadas durante esse período para a análise comparativa do Método de Ritchie e do Método de Ritchie Modificado por Régis Anécimo.

O método padronizado e denominado "Método de Ritchie Modificado por Régis Anécimo" (2006), é descrito a seguir, tendo como princípio a centrifugo-sedimentação em água morna saponificada. A técnica baseia-se na suspensão de aproximadamente 2g de fezes para 10 mL de água. As amostras são homogeneizadas e filtradas por gaze dobrada, com auxílio de um funil (65 x 50mm), para o tubo de

centrifugação (tubo de 15 mL); em seguida, são centrifugadas a 2500 rpm durante 1 min., desprezando o sobrenadante. Logo após, são adicionados 10mL de água morna (45°C) com 100µL de detergente neutro e homogeneizado por agitação e centrifugado a 2500 rpm durante 1 min. Em seguida, o sobrenadante é desprezado e o sedimento ressuspenso. Após a centrifugação são adicionados 10mL de água e centrifugados a 2500 rpm durante 1 min. Uma gota do material é colocada sobre uma lâmina, sendo acrescentadas de 1 a 3 gotas de lugol e observada no microscópio com aumento de 100x e 400x, com o auxílio de uma lâmina.

Os métodos foram desenvolvidos em condições semelhantes seguindo as diretrizes analíticas. As lâminas foram visualizadas no microscópio Nikon Eclipse E200, com o aumento de 100x e 400x, no Laboratório de Ecotoxicologia e Parasitologia Ambiental da EERP.

Foram realizadas a análise qualitativa, mediante a identificação das estruturas parasitárias observadas, e a análise quantitativa, pela varredura completa do campo nas lâminas fixadas. Os resultados foram expressos pelo número de ovos e/ou larvas de helmintos e/ou cistos de protozoários.

Resultados e discussão

O lodo de esgoto é um resíduo de composição variável e de altíssimo potencial poluidor, obtido do tratamento de águas residuárias. Ovos de helmintos, principalmente ovos de ascarídeos, têm sido utilizados como indicadores da qualidade sanitária do lodo, por apresentarem elevada resistência em lodos tratados¹⁵. Assim, a alta taxa de sobrevivência de patógenos, a ubiquidade em amostras de esgoto e a alta prevalência são fatores que ressaltam a

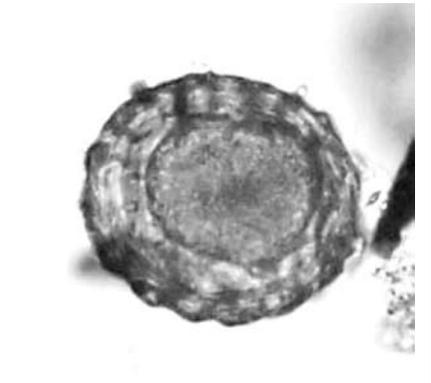
importância de estudar, também, a ocorrência de ovos de parasitas em amostras de lodo de esgoto¹⁶.

Nas amostras analisadas por ambos os métodos, foram observadas infecções múltiplas, e as estruturas parasitárias encontradas no lodo do esgoto foram dos seguintes helmintos: *Ancylostoma* sp, *Hymenolepis* sp, *Ascaris* sp, *Tricuris trichiura* (Figura 1).

A eficiência das técnicas de enumeração de parasitas em amostras de lodo de esgoto, solo e fezes é dependente de uma recuperação adequada em função da separação dos organismos-alvos a partir das partículas presentes nas matrizes¹⁷. Além disso, é importante considerar que o grande teor de partículas presentes nas amostras derivadas de esgoto constitui um fator crítico de interferência nos procedimentos de detecção e visualização de ovos, cistos e oocistos. Ao comparar ambos os métodos, verificou-se que as amostras processadas pelo MRMRA apresentaram maior concentração de partículas que interferiam na visualização, quando comparadas com as lâminas preparadas pelo MR.

A Figura 1 mostra que, no presente estudo, não foram identificados cistos e oocistos como estruturas parasitárias, sendo identificados unicamente ovos de helmintos. Essa pouca diversidade de parasitos e a visualização de apenas ovos de helmintos é justificada, também, pelo fato desses ovos serem mais facilmente detectados que cistos e oocistos, o que pode ocorrer devido ao seu maior tamanho e ao fato dos ovos serem mais facilmente obscurecidos pela grande quantidade de partículas existente em amostras de esgoto bruto, lodo ativado e lodo de esgoto¹⁸. Além disso, a remoção de diferentes organismos patogênicos depende não só do tamanho, mas também da capacidade de absorção ou adesão, da densidade e da

Figura 1. Exemplos de ovos encontrados nas amostras, segundo o Método de Ritchie (MR) e o Método de Ritchie Modificado por Regis Anécimo (MRMRA)

Amostra/Parasito	MR	MRMRA
<i>Ancylostoma</i> sp		
<i>Hymenolepis</i> sp		
<i>Ascaris</i> sp		
<i>Trichuris trichiura</i>		Não encontrado

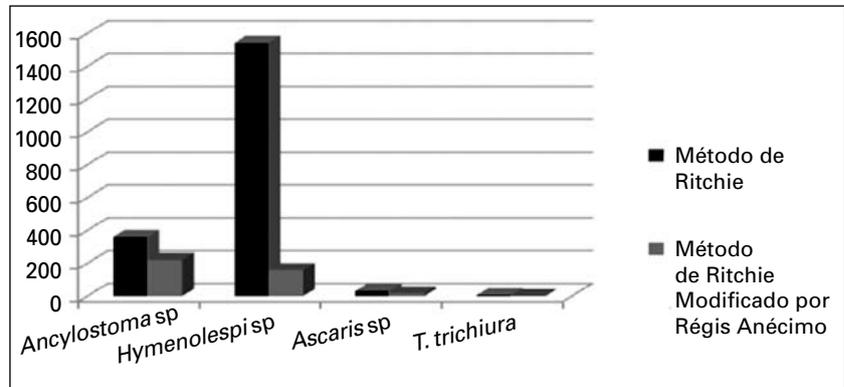
velocidade de sedimentação dessas estruturas. Sabe-se que a taxa de sedimentação do ovo de um helminto é cerca de 1 metro/hora, enquanto que, para protozoários, como a *Giardia* sp, essa taxa é de 1 metro/5 horas, o que permite, portanto, a presença de helmintos em grande quantidade nos efluentes líquidos¹⁹, verificada pelos resultados do estudo, o que justifica, também, a ausência de outros parasitas nas Figuras apresentadas.

Os resultados obtidos da leitura da frequência parasitária nas amostras analisadas pelo MR e pelo MRMRA demonstram diferentes porcentagens. No MR, a porcentagem de *Ancylostoma* sp foi de 19%, a de *Hymenolepis* sp foi de 79%, a de *Ascaris* sp foi de 2% e a de *Trichuris trichiura* foi de 0%, em um total de 1970 helmintos visualizados. Porém, no MRMRA, a porcentagem de *Ancylostoma* sp foi de 56%, a de *Hymenolepis* sp foi de 40%, a de *Ascaris* sp foi de 4% e a de *Tricuris trichiura* foi de 0%, em um total de 398 helmintos.

A Figura 2 apresenta a comparação entre a quantidade de ovos de parasitas, segundo os dois métodos analíticos explorados.

Assim, avaliando quantitativamente, o MRMRA foi menos eficiente, devido à diferença encontrada na varredura completa das amostras, nas quais a quantidade de ovos de helmintos visualizada no MR se sobressai em relação ao MRMRA, o que pode ser identificado na Figura 2, que demonstra a grande diferença entre o número de parasitas identificados, principalmente ao analisar os ovos identificados de *Hymenolepis* sp, que

Figura 2. Comparação entre a quantidade de ovos de parasitas encontrados nas 100 amostras pelo Método de Ritchie e do Método de Ritchie Modificado por Régis Anécimo



ultrapassam 1400 ovos no Método de Ritchie e pouco mais de 100 ovos identificados no Método de Ritchie Modificado por Régis Anécimo. A baixa eficiência na identificação quantitativa de ovos, cistos e oocistos em amostras de lodo analisadas pelo MRMRA pode, então, ser devido, como mencionado anteriormente, à grande quantidade de partículas presentes nesses tipos de amostras, assim como de lipídios, fazendo com que a padronização da Técnica de Ritchie Modificada por Régis Anécimo em fezes não seja aplicável para a análise quantitativa de parasitas em amostras de lodo de esgoto^{17,20}.

Observando a análise qualitativa, a técnica pode ser considerada eficaz, uma vez que a qualidade da visualização dos parasitas é correspondente em ambos os métodos (Figura 1).

Conclusões

Pode ser concluído que o MRMRA é um método simples de se

realizar, possui baixo custo e é de fácil implementação na rotina de laboratórios de Parasitologia Ambiental e estações de tratamento de esgoto, especialmente em países em desenvolvimento.

Diante dos resultados, é interessante, do ponto de vista da Saúde Pública, investigar a ocorrência desses parasitas em amostras de lodo de esgoto considerando que o esgoto é uma fonte de patógenos e que esse subproduto do tratamento de esgoto, tem como principal destino o aterro sanitário ou solos usados para agricultura. Além disso, há uma escassez de dados, no Brasil, em relação à presença desses parasitos patogênicos em lodo de esgoto, bem como uma metodologia adequada para sua detecção. Assim, o lodo de esgoto pode, portanto, conter grande quantidade e variedade de patógenos, o que ressalta a importância de um tratamento adequado, assim como o desenvolvimento de técnicas que permitam sua identificação e, ao mesmo tempo, que minimizem a utilização de produtos químicos.

REFERÊNCIAS

1. Ludwing KM, Frei F, Alvares FF, Paes JTR. Correlação entre condições de saneamento básico e parasitoses intestinais na população de Assis, Estado de São Paulo. Rev Soc Bras Med Trop [Internet]. 1999;32(5). Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003786821999000500013&lng=pt7nrm=iso&tlng=pt
2. Vaz AJ. Diagnóstico imunológico das parasitoses. In: De Carli AG. Parasitologia Clínica: Seleção de métodos e técnicas de laboratório para o diagnóstico das parasitoses humanas. São Paulo: Atheneu; 2001. p. 505-39.
3. Macedo HS. Prevalência de Parasitos e comensais intestinais em crianças de escolas da rede pública municipal de Paracatu (MG). Rev Bras Anal Clínicas. 2005;37(4):209-13.
4. Ferrari MBG, Rodriguez R. Prevalência de helmintíases em apêndices cecais. Rev Col Bras Cirurgiões. Rio de Janeiro; 2004;77-82.
5. Fontes G, et al. Influência do tratamento específico na prevalência de enteroparasitoses e Esquistossomose mansônica em escolares do município de Barra de Santo Antônio, AL. Rev Soc Bras Med Trop. 2003; 625-28.
6. Oliveira RG. Black Book: Pediatria. 3. ed. Belo Horizonte: Black Book; 2005.
7. Relatório de Desenvolvimento Humano. 2006/2009. Disponível em: <http://www.pnud.org.br/forum/index.php?lk=1>
8. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Nacional do Saneamento Básico de 2000. São Paulo: IBGE; 2000. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>
9. Ipea. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios (Pnad). Primeiras Análises. Saneamento Básico e Habitação. 2007;7-9.
10. Gerba PC, Smith JEJ. Source of pathogenic microorganisms and their fate during land application of wastes. J Environ Qual. 2005;34:42-8.
11. O'Connor GAO, Elliot HA, Basta NT, Bastina RK, Pierzynski GM, Sims RC, Smith JEJ. Sustainable land application: an overview. J Environ Qual. 2005;34:7-17.
12. Ritchie LS. An ether sedimentation technique for routine stool examination. Bulletin of the United States Army Medical Department. 1948;(8):326.
13. Tornatore N. Obras começam em junho. A Cidade, Emissários de esgoto, p. 6. Ribeirão Preto, 27 Abr 2007.
14. CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – Norma L5.550 Helmintos e Protozoários Patogênicos contagem de ovos e cistos em amostras ambientais. São Paulo: CETESB; 1989.
15. EPA. Environmental Protection Agency. Control of pathogens and vector attraction in sewage sludge under 40CFR part 503. Office of Water, Office of Science and Technology Sludge Risk Assessment Branch. Washington; 1992. 147 p.
16. Campos MR, Valencia LIO, Fortes BOMD, Braga RCC, Medronho RA. Distribuição espacial da infecção por *Ascaris lumbricoides*. Rev Saúde Pública. 2002;36(1):69-74.
17. Davies CM, Kaucner C, Deere D, Ashbolt NJ. Recovery and enumeration of *Cryptosporidium parvum* oocysts from animal fecal matrices. Appl Environ Microbiol. 2003;69(4):2842-7.
18. Carraro E, Fea E, Gilli G. Impact of a wastewater treatment plant on *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts occurring in a surface water. Wat Sci Tech. 2000;41(7):31-7.
19. Udeh PJ, John G, Veenstra JN. Fiekt inactivation of oocysts exposed to agricultural land. Wat., Air and Soil Pollut. 2003;142:211-28.
20. McCuin RM, Clancy JL. Methods for recovery, isolation and detection of *Cryptosporidium* oocysts in wasteasters. J Med Microbiol. 2005;63(1):73-88.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

Silva RAA, Segura-Munoz SI, Abreu KA, Rodrigues RB, Ferrassino MDB, Trevilato TMB. Adaptación de um método analítico para diagnóstico de parasitoses com minimización de productos químicos. 13 Convención Científica de Ingeniería y Arquitectura. IV Simpósio Universitario Iberoamericano sobre Medio Ambiente. La Habana, Cuba; 2006.

Recebido em 18 de maio de 2009
Versão atualizada em 3 de agosto de 2009
Aprovado em 22 de junho de 2009