

# REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

ISSN: 0073-9855 (impresso)  
ISSN: 1983-3814 (on-line)  
RIALA6



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO  
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

Volume 71 número 4, 2012





Coordenadoria de Controle de Doenças  
Instituto Adolfo Lutz

# REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

---

Volume 71 número 4, 2012  
Outubro - Dezembro 2012

Publicação trimestral/Quarterly publication  
Solicita-se permuta/Exchange desired

# INSTITUTO ADOLFO LUTZ

---

## Diretor Geral do Instituto Adolfo Lutz

Alberto José da Silva Duarte

### Editor Chefe

Adriana Bugno

### Editor Adjunto

Luis Fernando de Macedo Brígido

### Editores Assistentes

Christiane Asturiano Ristori Costa

Jacqueline Tanury Macruz Peresi

Lucile Tiemi Abe Matsumoto

Márcia Liane Buzzo

Maria Helena Iha

Maria Helena Martini

Miriam Solange Fernandes Caruso

Neuza Kasumi Shirata

Raquel dos Anjos Fazioli

### Núcleo de Acervo

Rocely Aparecida Bueno Moita

---

## Conselho Editorial / Editorial Board

Adele Caterino-de-Araújo, São Paulo, Brasil.

Alexandre Januário da Silva, Atlanta, EUA.

Antonio Ruffino Netto, Ribeirão Preto, Brasil.

Bernadette Dora G. de Melo Franco, São Paulo, Brasil.

Delia Rodrigues Amaya, Campinas, Brasil.

Elizabeth de Souza Nascimento, São Paulo, Brasil.

Elizabeth Castañeda, Bogotá, Colômbia.

Eliseu Alves Waldman, São Paulo, Brasil.

Fernando C. Schmitt, Porto, Portugal.

Gordon S. Shephard, Cape Town, África do Sul.

Guilherme Prado, Belo Horizonte, Brasil.

Hans P. van Egmond, Bilthoven, Holanda.

Heitor Franco de Andrade Junior, São Paulo, Brasil.

John Gilbert, York, UK.

Juan Carlos Palomino, Antuérpia, Bélgica.

Lígia Bicudo de Almeida Muradian, São Paulo, Brasil.

Luz Elena Cano Restreppo, Medellín, Colômbia.

Maria José Mendes Gianini, Araraquara, Brasil.

Marluce Bibbo, Pennsylvania, EUA.

Martin Emilio Munk, Copenhague, Dinamarca.

Myrna Sabino, São Paulo, Brasil.

Paul W. Flinn, Kansas, EUA.

Pedro Paulo Chieffi, São Paulo, Brasil.

Regina Maura Bueno Franco, Campinas, Brasil.

Susana Córdoba, Buenos Aires, Argentina.

Terezinha de Jesus Andreoli Pinto, São Paulo, Brasil.

Thales de Brito, São Paulo, Brasil.

Vanessa Yardley, London, UK.

Venâncio Avancini Ferreira Alves, São Paulo, Brasil.

Vera Akiko Maihara, São Paulo, Brasil.

Vera Lucia Garcia Calich, São Paulo, Brasil.

---

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ  
(Secretaria de Estado da Saúde)  
São Paulo, SP – Brasil

1941

2012, 71(4)

ISSN 0073-9855

CDD<sub>18</sub> 614.07205

RIALA 6

ISSN 1983-3814 versão *on line*

ISSN 2176-3844 CD-ROM

(\* ) ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE BIBLIOTECÁRIOS. Grupo de Bibliotecários Biomédicos.

Normas para catalogação de publicações seriadas especializadas, São Paulo, Ed. Polígono, 1.072.

Os artigos publicados na Revista do Instituto Adolfo Lutz são indexados por: Abstracts on Hygiene and Communicable Diseases; Analytical Abstracts; Bibliografia Brasileira de Medicina Veterinária e Zootécnica; Biological Abstracts; Chemical Abstracts; Food Science and Technology Abstracts; Index Medicus Latino-americano; LILACS, SP: Saúde Pública; Microbiology Abstracts; Sumários Correntes Brasileiros; Toxicology Abstracts; Tropical Diseases Bulletin; e Virology Abstracts.

Acesso on line / on line access. Texto integral / full text.

<http://revista.ial.sp.gov.br>

Portal de Revistas Saúde SP

<http://periodicos.ses.sp.bvs.br>

Cartas ao editor:

Endereço / Address

Núcleo de Acervo

Av. Dr. Arnaldo, 355, 01246-902 São Paulo/ SP – Brasil

Tel/ Fax. + 55 11 3068-2869

E-mail: [rial@saude.sp.gov.br](mailto:rial@saude.sp.gov.br)

■ ARTIGOS ORIGINAIS/ORIGINAL ARTICLES

- 1512 Patentes e registro sanitário de vacinas antimeningocócicas sorogrupo B no Brasil: aspectos importantes para a regulação e o controle**  
Patents and sanitary registration of serogroup B meningococcal vaccine in Brazil: basic aspects for biological products regulation and control from rice bran  
Claudia Maria da CONCEIÇÃO, Filipe Soares Quirino da SILVA, Angélica Inês da SILVA, Anna Carolina Machado MARINHO, José Godinho da SILVA JÚNIOR, André Luis GEMAL..... 615-623
- 1513 Determinação de bisfenol A (BFA) em água mineral por meio de CG/DCE – uma nova proposta de metodologia para análise**  
Bisphenol A (BPA) determination in mineral water by using CG/DCE – a new analysis methodology proposal  
Marcia Helena de Rizzo da MATTA, Alecsandra Leite PEREIRA, Êmerson MONTAGNER, Guilherme Vilalba FORTUNATO..... 624-629
- 1514 Emprego de casca de arroz como adsorvente para execução de técnica de MSPD para determinar aflatoxinas em cebolas**  
Use of rice husk as an adsorbent for performing MSPS technique for determining the aflatoxins occurrence in onion  
Ana Paula Moura Guimarães CARVALHO, Helen Cristina dos Santos HACKBART, Michele Moraes de SOUZA, Eliana BADIALE-FURLONG ..... 630-637
- 1515 Fungos toxigênicos em camarões marinhos cultivados e potenciais toxigênicos das cepas isoladas de *Aspergillus* seção *Flavi* e seção *Nigri***  
Toxigenic fungi in cultivated marine shrimp and the toxigenic potential of *Aspergillus* sections *Flavi* and *Nigri* strains  
Rodrigo Maciel CALVET\*, Maria Marlúcia Gomes PEREIRA, Amilton Paulo Raposo COSTA, Regina Célia de Jesus FIALHO, Maria Christina Sanches MURATORI ..... 638-644
- 1516 Monitoramento de farinha de trigo e de milho fortificadas com ferro**  
Monitoring the wheat and corn flours enriched with iron  
Márcia Liane BUZZO, Maria de Fátima Henriques CARVALHO, Paulo TIGLEA, Luciana Juncioni de ARAUZ, Edna Emy Kumagai ARAKAKI, Richard MATSUZAKI ..... 645-649
- 1517 Qualidade de saneantes e antissépticos utilizados em hospitais da rede pública**  
Quality of the sanitizing and antiseptic products used in public hospitals  
Maria Cristina SANTA BÁRBARA, Lígia Luriko MIYAMARU, Helena Miyoco YANO, Adriana Aparecida Buzzo ALMODOVAR, Renata de França LIMA, Mariângela Tirico AURICCHIO, Adriana BUGNO..... 650-655

- 
- 1518 Características físico-químicas e atividade antioxidante total de pitaias vermelha e branca**  
 Physicochemical characteristics and total antioxidant activity of red and white pitaya  
 Wilson César de ABREU, Cristiane de Oliveira LOPES, Kelly Moreira PINTO, Letícia Almeida OLIVEIRA,  
 Gustavo Bacelar Moreira de CARVALHO, Maria de Fátima Piccolo BARCELO..... 656-661
- 1519 Ácido ascórbico, carotenóides, fenólicos totais e atividade antioxidante em sucos industrializados e comercializados em diferentes embalagens**  
 Ascorbic acid, carotenoids, total phenolics and antioxidant activity in industrialized juices sold in different packaging  
 Samanta Thomas VALDÉS, Maria das Graças VAZ TOSTES, Ceres Mattos DELLA LUCIA, Fabiana Rossi HAMACEK,  
 Helena Maria PINHEIRO-SANT'ANA ..... 662-669
- 1520 Diversidade e resistência a antibióticos de bactérias psicrotróficas isoladas de tanques coletivos de resfriamento de leite**  
 Diversity of psychotrophic bacteria isolated from the milk cooling collective tanks and antibiotics resistance profile of the  
 microorganisms isolates  
 Simone Cristina MARQUES, Suzana Reis EVANGELISTA, Roberta Hilsdorf PICCOLI ..... 670-676
- 1521 Pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) desembarcada: características microbiológicas e qualidade do gelo utilizado na sua conservação**  
 Microbiological characteristics and quality of the ice used for preserving landed yellow hake (*Cynoscion acoupa*)  
 Ilderlane da Silva LOPES, Elka Machado FERREIRA, Débora de Matos PEREIRA, Lidiane Soares PEREIRA,  
 Maria Cecilia de Sousa CUNHA, Francisca Neide COSTA..... 677-684
- 1522 Magnésio urinário, plasmático e eritrocitário: validação do método de análise por espectrofotometria de absorção atômica com chama**  
 Magnesium contents in urine, plasma and erythrocyte samples: validation of analytical methodology using flame atomic  
 absorption spectrophotometry  
 Cristiane Hermes SALES, Vivianne de Sousa ROCHA, Luciana SETARO, Célia COLLI..... 685-690
- 1523 Uso do conceito do erro total, dos perfis de exatidão e do índice de exatidão no pré-estudo de validação de ensaio imunoenzimático**  
 Use of the total error concept, the accuracy profiles and the accuracy index in the pre-study validation of an enzyme-linked  
 immunosorbent assay  
 Jorge Luiz dos Santos POSSAS, Jarbas Emílio dos SANTOS, Michele Cardoso do NASCIMENTO,  
 Patrícia Alves dos SANTOS, Deivid Wanderson Couto dos ANJOS, Wlamir Corrêa de MOURA ..... 691-705
- 1524 Associação multivariada entre alterações citológicas do colo uterino e comportamento de risco em mulheres profissionais do sexo**  
 Multivariate association between the cervix cytological abnormalities and the risk behavior female sex workers  
 Daniela ETLINGER, Neuza Kasumi SHIRATA, Luciana Silva AGUIAR, Luzia Setuko Umeda YAMAMOTO,  
 Sonia Maria Miranda PEREIRA, Yuriko Ito SAKAI, Camilo de Lelis FERES, Rosemeire de Oliveira Lima RODRIGUES,  
 Patrícia Ramos VARANDA, Tania Mara CARDOSO, Silvia D'Andretta IGLEZIAS, Daniel GRANATO, Camila Cardoso OLIVEIRA,  
 Celso di LORETO ..... 706-712
- COMUNICAÇÃO BREVE/BRIEF COMMUNICATION
- 1525 Presença de *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em surto de toxinfecção alimentar ocorrido na região do Vale do Ribeira**  
 Isolation of *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in a food-borne disease outbreak  
 in Vale do Ribeira region  
 Estevão de Camargo PASSOS, Ataíde dos Santos de ALMEIDA, Ana Ruth Pereira de MELLO, Cícero Vagner de SOUSA,  
 Ana Luiza Soares de FREITAS, Fernanda Garrido GONÇALVES, Maria Aparecida de OLIVEIRA..... 713-717

- 
- 1526 Leveduras isoladas de uvas *Vitis vinifera* L. cultivadas na região equatorial brasileira**  
Yeasts isolated from *Vitis vinifera* L. grapes cultivated in Brazilian Equatorial region  
Mariana Oliveira ASSIS, Maria Eugênia de Oliveira MAMEDE, Alaíse Gil GUIMARÃES, Luíze Sales SANTOS,  
Carlos Augusto ROSA..... 718-722
- 1527 Elaboração e análise sensorial de pão caseiro com reduzido teor de cloreto de sódio e acrescido de condimentos como alternativa para pacientes hipertensos**  
Homemade bread prepared with reduced amount of NaCl and adding condiments as an alternative product for patients with hypertension and its sensory characteristics  
Janaina STEIN, Helena de Oliveira Santos SCHMIDT, Viviani Ruffo de OLIVEIRA..... 723-727
- 1528 Avaliação das características físico-químicas e microbiológicas dos componentes fibrosos obtidos da moagem úmida de grãos de milho**  
Physical-chemical and microbiological characteristics of fibrous components obtained from corn wet milling  
Camila Mattos ROCHA-OLIVIERI<sup>1</sup>, Ana Carolina CONTI-SILVA<sup>2</sup>, José Francisco LOPES-FILHO..... 728-732
- 1529 Avaliação da qualidade microbiológica e nutricional de salsichas tipo *hot dog***  
Evaluation of the microbiological and nutritional quality of hot dog sausage  
Débora Francielly de OLIVEIRA, Alexandre Rodrigo COELHO, José Francisco SILVEIRA JUNIOR, Francieli BRAGHINI,  
Claudia Eugênia Castro BRAVO, Ivane Benedetti TONIAL ..... 733-736
- 1530 Atitudes de risco dos consumidores em *self-service***  
Consumers risk attitudes for contaminating foods at self-service restaurants  
Laissa Benites MEDEIROS, Larissa Costa PEREIRA, Ana Lúcia de Freitas SACCOL..... 737-740
- 1531 Estudo das condições de preparo da merenda escolar em creches**  
Study on the conditions for preparing free school meal in nursery schools  
Catherine Hirsch WERLE, Ana Paula Maciel PEREIRA, Tânia Maria Vinturim GONÇALVES,  
Fernando Leite HOFFMANN..... 741-746
- 1532 Histoplasmose: um risco ocupacional entre pesquisadores que realizam trabalho de campo?**  
Is the histoplasmosis an occupational hazard between the investigators who perform field work?  
Adriana Pardini VICENTINI, Angela Noronha PASSOS, Décio Fragata da SILVA, Lúcia Cupertino BARRETO, Cezar Mendes de ASSIS,  
Roseli Santos de FREITAS..... 747-752
- 1533 Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) for identifying *Mycobacterium bovis* isolates from the modified Middlebrook 7H11 agar thin layer technique**  
Avaliação da técnica de reação de polimerase em cadeia (PCR) para identificação de *Mycobacterium bovis* em microcolônias isoladas em camada delgada de ágar Middlebrook 7H11 modificado  
Tatiana Reis do ROSÁRIO, Cristina Corsi DIB, Eliana ROXO, Sônia Regina PINHEIRO, Silvio Arruda VASCONCELLOS,  
Nilson Roberti BENITES..... 753-756
- NOTA CIENTÍFICA/SCIENTIFIC NOTE
- 1534 Avaliação do grau de efeito toxicológico do diclorvós, após exposição inalatória em ambiente sem ventilação**  
Evaluation of the toxicological effect grade of dichlorvos after its exposure in environment without ventilation  
Emerson Sanches NARCISO ..... 757-761

---

<b>1535</b>	<b>Pericardite bacteriana com subsequente desenvolvimento de endocardite mural por levedura do complexo <i>Candida parapsilosis</i></b>	
	Bacterial pericarditis with subsequent development of mural endocarditis caused by <i>Candida parapsilosis</i> complex yeast	
	Luiz Carlos Tesini CONSOLO, Marilene Rodrigues CHANG, Deborah Ledesma TAIRA, Fernanda Luiza Espinosa SPOSITTO, Lourdes Zélia ZANONI, Yvone Maia BRUSTOLONI.....	762-765
■	COLABORADORES .....	766-770
■	INSTRUÇÕES AOS AUTORES.....	771-776

## Patentes e registro sanitário de vacinas antimeningocócicas sorogrupo B no Brasil: aspectos importantes para a regulação e o controle

Patents and sanitary registration of serogroup B meningococcal vaccine in Brazil: basic aspects for biological products regulation and control from rice bran

RIALA6/1512

Claudia Maria da CONCEIÇÃO<sup>1\*</sup>, Filipe Soares Quirino da SILVA<sup>1</sup>, Angélica Inês da SILVA<sup>2</sup>, Anna Carolina Machado MARINHO<sup>3</sup>, José Godinho da SILVA JÚNIOR<sup>3</sup>, André Luis GEMAL<sup>1</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Setor de Imunobiológicos, Departamento de Química, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/INCQS, FIOCRUZ, Avenida Brasil, 4.365, Mangueiras, Rio de Janeiro, RJ, CEP: 21040-900. Tel.: (21) 3865-5199, Fax: (21) 2290-0915. E-mail: claudia.conceicao@incqs.fiocruz.br

<sup>2</sup>Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)

<sup>3</sup>Instituto de Tecnologia de Imunobiológicos, Biomanguinhos, FIOCRUZ

Recebido: 20.03.2012 – Aceito para publicação: 19.10.2012

### RESUMO

As vacinas são um dos instrumentos mais importantes para a saúde pública. O registro sanitário é uma das ferramentas que a vigilância sanitária dispõe para controlar a entrada de todos os medicamentos e constitui a base das informações sobre eles para o Sistema de Vigilância Sanitária. No caso da meningite meningocócica, doença causada pela bactéria *Neisseria meningitidis* (Nm), várias vacinas foram desenvolvidas inicialmente contra os sorogrupos A, C, W135 e Y, utilizando-se os polissacarídeos capsulares. Pelo fato de o antígeno polissacarídico do sorogrupo B não induzir boa resposta imunológica em seres humanos, outras estratégias vacinais foram testadas. O objetivo deste trabalho foi mapear as patentes de produtos vacinais contra o sorogrupo B, depositadas no período de 1990 a 2005, e comparar esses pedidos com as vacinas registradas. O levantamento dos pedidos de patentes foi realizado utilizando-se as bases de dados eletrônicas do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) e do Escritório de Patentes Europeu (EPO), a partir de janeiro de 1995. Várias patentes solicitaram proteção dos antígenos presentes em vacina já registrada, o que não caracteriza inovação. Os maiores depositantes de patentes são as multinacionais, o que mostra a necessidade de incremento dessa pesquisa aplicada por instituições brasileiras.

**Palavras-chave.** patentes, controle sanitário, vacinas meningocócicas.

### ABSTRACT

Vaccines are important instruments for public health. Sanitary registration is an important tool for the national regulatory authorities to control the medicines use and it is the basic source of information for the National Sanitary Surveillance System – NRAs. For meningococcal meningitis, caused by *Neisseria meningitidis* (Nm), many vaccines were developed against serogroups A, C, W135, and Y using the capsular polysaccharides. Considering that the serogroup B polysaccharide is poorly immunogenic in human, other vaccines strategies were tried. This study aimed at identifying the applied patents for meningitis B antigens during the period from 1990 to 2005, and these were compared to the registered products. The European Patent Office and the National Institute for Industrial Propriety data basis were used to survey the patents request. Several patents requested the antigens safekeeping, which are included into the registered vaccine, and it does not characterize an innovation. The majority of the patents depositories belong to multinational companies and the Brazilian institutions should put in practice the process of requesting the patent for their research products.

**Keywords.** patents, sanitary control, meningococcal vaccine.

## INTRODUÇÃO

As vacinas são um dos instrumentos mais importantes para a saúde pública. O investimento feito em uma campanha de imunização é rapidamente recuperado pela economia nos gastos com a internação e tratamento das doenças imunopreveníveis, além de evitar mortes e sequelas em decorrência da doença<sup>1</sup>.

Hoje há um grande investimento em pesquisa e desenvolvimento (P&D) para novas vacinas<sup>2</sup>. O instrumento legal que garante o interesse das empresas nessa área são as patentes, que permitem um monopólio de 20 anos da vacina desenvolvida. Os pré-requisitos para a concessão de uma patente são novidade, atividade inventiva e aplicação industrial, conceitos presentes em todas as legislações de propriedade industrial. Existem diferenças na interpretação, principalmente com relação à atividade inventiva, que é o conceito menos objetivo<sup>3</sup>.

Esse monopólio, que estimula o investimento em P&D, pode, por outro lado, tornar as vacinas muito caras, reduzindo o benefício econômico e social gerado, tornando os novos produtos inacessíveis a grande parte da população<sup>2</sup>.

Apenas uma pequena parcela das vacinas patenteadas apresenta eficácia/segurança para humanos. O mecanismo legal para garantir que a eficácia/segurança da vacina seja adequada para o uso é o processo de registro sanitário, que tem a finalidade de assegurar o acesso da população a produtos de qualidade<sup>4</sup>. A preocupação com a qualidade, que é importante para todos os medicamentos, é crítica para as vacinas, que são administradas em indivíduos saudáveis e de toda uma faixa etária.

O registro sanitário é um dos instrumentos de que a vigilância sanitária dispõe para controlar a entrada em circulação de todos os medicamentos e constitui a base das informações sobre eles para o Sistema de Vigilância Sanitária<sup>5</sup>. Constitui uma avaliação das investigações realizadas com uma substância ativa, suas características químico-farmacêuticas, especificações e a capacidade de produção da empresa, visando outorgar autorização para sua comercialização<sup>6</sup>.

No caso da meningite meningocócica, doença causada pela bactéria *Neisseria meningitidis* (Nm), várias vacinas foram desenvolvidas desde a década de 1970. O desenvolvimento dessas vacinas foi um desafio científico muito grande, devido à diversidade de estruturas capsulares (polissacarídeos) que essa bactéria apresenta. Inicialmente, foram desenvolvidas vacinas contra sorogrupos dessa

bactéria que provoca doenças em seres humanos, que são A, C, W e Y. As primeiras vacinas foram preparadas apenas com os polissacarídeos capsulares desses sorogrupos, sendo que, na década de 1990, foram lançadas vacinas em que os polissacarídeos foram conjugados a proteínas imunogênicas<sup>7-8</sup>.

O maior problema foi o sorogrupo B. O polissacarídeo desse sorogrupo não imuniza seres humanos, por essa razão outras estratégias vacinais foram tentadas. Na década de 1990, algumas vacinas que utilizaram misturas de proteínas da superfície do sorogrupo B foram lançadas no mercado<sup>9-10</sup>.

Além disso, com o avanço da genética e com a era pós-genômica, algumas tentativas têm sido desenvolvidas no sentido de produzir uma preparação candidata à vacina que seja capaz de conferir proteção contra *N. meningitidis* sorogrupo B<sup>11</sup>.

O sequenciamento do genoma de *N. meningitidis* possibilitou a predição de 600 antígenos em potencial. Destes, 29 foram capazes de induzir a produção de anticorpos em modelos animais. Atualmente, sabe-se que a abordagem vacinal à base de OMV (*outer membrane vesicle*) está relacionada à obtenção de proteínas com alta variabilidade em sua estrutura primária. Essa nova abordagem, associada aos avanços no entendimento base molecular da resposta imune, promete introduzir novas candidatas para as preparações vacinais capazes de induzir proteção para a diversidade de cepas existentes<sup>11</sup>.

Dessa forma, com o intuito de garantir o sigilo e os direitos ao uso de antígenos em potencial, muitos autores que identificaram novos antígenos recorreram ao pedido de patente de suas descobertas<sup>11</sup>.

O objetivo deste trabalho foi mapear as patentes depositadas no período de 1990 a 2005 sobre antígenos vacinais contra o sorogrupo B de *Neisseria meningitidis*, comparando os pedidos com as vacinas registradas para o sorogrupo. Os resultados deste trabalho poderão orientar as ações tanto de propriedade industrial, como ações reguladoras no âmbito desses imunobiológicos.

## METODOLOGIA

O levantamento dos pedidos de patentes relativos aos antígenos vacinais contra *Neisseria meningitidis* sorogrupo B foi realizado através de bases de dados eletrônicas e gratuitas do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) e do Escritório de Patentes Europeu (EPO). O período de investigação

escolhido começa em 1º de janeiro de 1995, data em que começa a ser permitida a concessão de patentes para produtos e processos farmacêuticos no país, de acordo com a lei nº 9.279/96 (LPI).

Foram levantados os pedidos de patentes depositados e publicados até outubro de 2012, e o acesso às bases de dados para a realização do levantamento ocorreu no período compreendido entre janeiro e outubro de 2012.

A busca foi realizada através da utilização das seguintes palavras-chave no título e no resumo: *Neisseria*, vacina meningite, vacina meningocócica B e antígenos meningite B.

Dentro dos mecanismos de busca de pedidos de patentes utilizados neste trabalho, vale ressaltar que a Lei de Propriedade Industrial (LPI) prevê um período de sigilo de 18 meses, contados a partir da data de depósito do pedido, que pode ser abreviado, ou não, pelo requerente, sendo ao final deste prazo publicado o pedido. Com isso, os pedidos relativos aos anos mais recentes, por estarem no período de sigilo, poderão não constar no levantamento. Somados a este fato, deve-se considerar que a publicação na Revista de Propriedade Industrial e na base de dados eletrônica pode sofrer alguma defasagem.

Com relação ao levantamento dos registros de vacinas contra meningite B, foi utilizada a Base de dados da ANVISA.

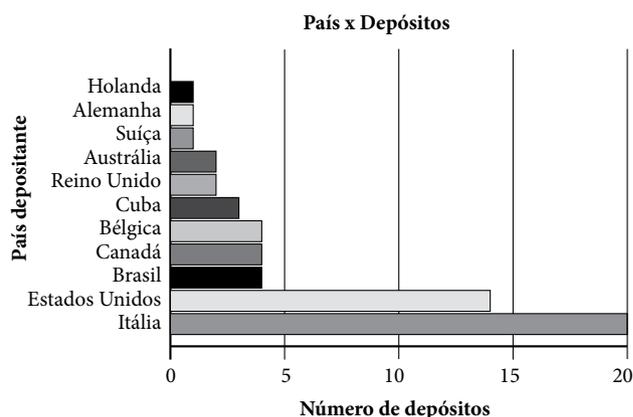
Como no Brasil não existe associação entre patentes concedidas e vacinas registradas, foi necessário realizar uma investigação a respeito dos pedidos de patentes relacionados aos antígenos vacinais contra *Neisseria meningitidis* sorogrupo B e a identificação de novos antígenos nas vacinas tradicionais registradas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Patentes

Após o levantamento realizado e a seleção dos resultados, de forma a incluir somente os pedidos cujo objeto de proteção relacionava-se diretamente aos antígenos vacinais contra o sorogrupo B de *Neisseria meningitidis*, foram selecionados 56 pedidos de depósito de patente no Brasil, no período estudado.

Na Figura 1, é apresentado o perfil de distribuição dos pedidos de patentes relacionados aos antígenos vacinais contra o sorogrupo B de *Neisseria meningitidis*, depositados e publicados no período de 1995 a 2012 no Brasil, por país de origem do depositante.



**Figura 1.** Distribuição dos pedidos de patentes relacionados a vacinas antimeningite B depositados no Brasil por vários países, no período de 1990 a 2005

Observou-se que o maior número de depósitos deu-se na Itália, seguido dos Estados Unidos. É interessante observar que o Brasil é o terceiro país em depósitos. A participação de países como a Itália e os EUA nesse cenário pode ser facilmente explicada quando são analisados os investimentos em P&D realizados nesses países. Esses investimentos acabam refletindo em uma maior participação no mercado mundial.

Além disso, a participação expressiva da Itália e dos Estados Unidos também se deve ao fato de que a maior parte dos estudos que culminou no sequenciamento completo do genoma de *Neisseria meningitidis* sorogrupo B ocorreu no Instituto TIGR, nos EUA, com a colaboração do laboratório Novartis da Itália.

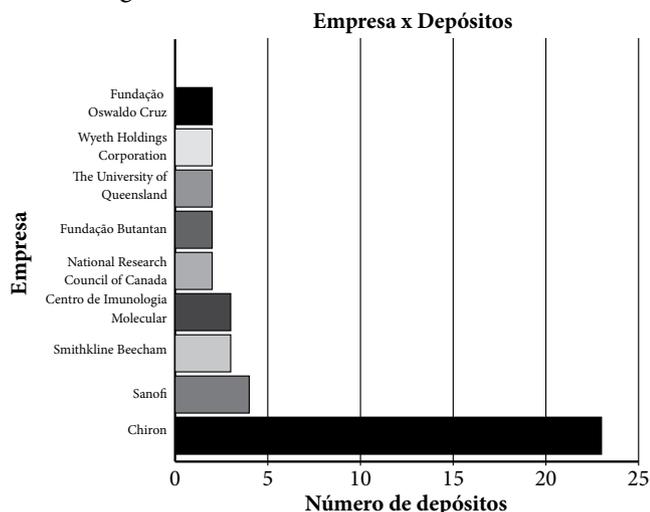
Embora o Brasil apareça em terceiro lugar na participação de pedidos de patentes, tal posição pode ser vista sob duas óticas diferentes. Uma dentro do contexto de patentes nacionais em medicamentos, e outra sob a ótica de patentes biotecnológicas. Se a análise desse resultado for realizada de forma descontextualizada, pode-se dizer que essa representação é muito pequena diante do cenário internacional.

Por outro lado, a participação do Brasil no campo patenteável farmacêutico pode ser dividida em dois momentos, um anterior ao ano 1996, em que a legislação brasileira de propriedade industrial não estabelecia proteção ao setor farmacêutico e tão pouco ao setor farmacêutico-biotecnológico, e outro que corresponde ao período pós-1996, em que o Brasil começou a reconhecer essas patentes. Essa informação também deve ser levada em conta quando avaliamos o cenário nacional de patentes em imunobiológicos.

Comparando a posição do Brasil, apresentada na Figura 1, com os dados apresentados por Gemal et al.<sup>6</sup> para patentes em comprimidos de liberação modificada, observa-se que para este tipo de medicamentos o Brasil possui uma representatividade mínima, correspondendo a apenas 1% o total de pedidos depositados por residentes no país. Esse resultado demonstra que, nesse caso, os maiores beneficiários da adoção de patentes na área farmacêutica foram as companhias transnacionais. Tais dados refletem a necessidade de um maior investimento no setor de P&D, para que seja possível o país acompanhar o desenvolvimento tecnológico mundial ou pelo menos começar a modificar a sua participação no cenário nacional farmacêutico.

No que diz respeito à tecnologia de imunobiológicos, os dados apresentados neste trabalho podem apontar para uma direção oposta, já que estamos atrás apenas da Itália e dos Estados Unidos. Isso pode indicar que o desenvolvimento biotecnológico pode ter sido mais bem impulsionado no período em que o Brasil começou a reconhecer as patentes farmacêuticas do que no apresentado para medicamentos micromoleculares, já que o país não chegou a realizar atividades de P&D de maior densidade tecnológica neste segmento farmacêutico.

O primeiro marco da biotecnologia farmacêutica moderna foi a produção de insulina humana recombinante, no início da década de 1980. Já a produção de medicamentos sintéticos iniciou-se no final do século XIX. Nessa ocasião, o Brasil estava muito menos preparado para acompanhar a evolução tecnológica do que recentemente, fato que possivelmente explica a menor diferença observada na biotecnologia.



**Figura 2.** Distribuição dos pedidos de patentes relacionados a vacinas antimeningite B depositados no Brasil pelas principais empresas depositantes, no período de 1990 a 2005

Na Figura 2, os 56 pedidos de depósitos estão apresentados de acordo com a distribuição de pedidos por empresas depositantes.

Esses dados demonstram que a maioria dos pedidos de depósitos é oriunda de empresas transnacionais.

Dentre as empresas apresentadas na Figura 2, destaca-se a Chiron, empresa do grupo Novartis, como sendo a maior solicitadora de depósitos de patentes em vacinas contra meningite B. Isso pode ser explicado, pois o grupo de pesquisas que sequenciou o genoma da *Neisseria meningitidis* faz parte da divisão de pesquisas dessa empresa e vem, desde 1986, realizando pesquisa e lançando produtos na área de vacinas.

Outras empresas que também apresentaram depósitos nessa área de interesse foram a Sanofi e a Smithkline Beecham, com quatro e três depósitos respectivamente.

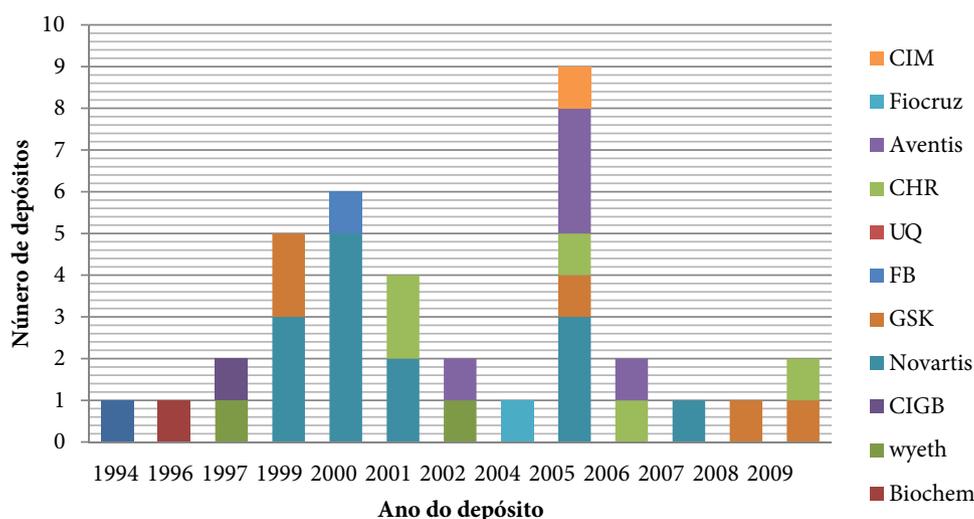
O Brasil também apresentou participação através da Fundação Butantan e da Fundação Oswaldo Cruz, ambas as instituições com dois depósitos cada.

Esses resultados nos levam a pensar que, embora no campo de desenvolvimento biotecnológico o Brasil apresente resultados melhores na área de patentes do que o apresentado para outras classes farmacêuticas, tal colaboração poderia ser melhorada, pois os grupos brasileiros de pesquisa na área ainda se dedicam na maior parte das vezes à pesquisa básica, cujo indicador de produção são os artigos. Além disso, falta a mentalidade de trabalho voltada para a produção industrial, o que acontece com frequência em outros países, como é o caso da Itália, país sede da Novartis.

Esse cenário precisa ser modificado, não só puramente pelo aspecto de desenvolvimento tecnológico, mas como, e principalmente, pelo aspecto do impacto desse investimento no setor de saúde pública e pela questão de soberania nacional ou de desenvolvimento estratégico.

Na Figura 3, são apresentados os dados dos pedidos de depósitos de patentes, distribuídos ao longo do período estudado.

De acordo com os dados apresentados, verificou-se que o número de depósitos relacionados às vacinas contra meningite B começou a ter significância a partir do final da década de 1990. Esse período, caracterizado como de grande avanço na área da biotecnologia, gerou em nosso país, e no mundo, um grande número de pedidos de patentes



**Legendas:** CIM – Centro de Imunologia Molecular; CHR – Children’s Hospital & Research Center at Oakland; UQ – The University of Queensland; FB – Fundação Butantan; GSK – Glaxosmithkline Biologicals S.A.; GIGB – Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CU); Biochem – Biochem Vaccines Inc (CA).

**Figura 3.** Distribuição de pedidos de patentes relacionados às vacinas contra meningite B, depositados e publicados no período de 1994 a 2012 no Brasil, tomando por base o processamento do exame realizado no INPI

referentes a produtos, processos e até mesmo organismos transgênicos, obtidos por processos biotecnológicos.

A publicação do genoma completo da *Neisseria meningitidis* sorogrupo B, em 2000, levou a um segundo pico de depósitos em 2005, em consequência da mudança da tecnologia<sup>12</sup>.

Com relação ao objeto dos pedidos de patentes investigados, observou-se uma grande variação. Um grande número de pedidos requereu seqüências de proteínas candidatas a antígenos vacinais. Outras patentes tratavam de processos de purificação e superexpressão dessas proteínas. Parte das patentes tratava de associação entre antígenos e adjuvantes. Em um grande número os objetos são descritos de forma superficial ou extremamente genérica.

A discussão sobre as patentes de vacinas contra a meningite B deve levar em consideração o processo de concessão de patentes no Brasil, que é único no mundo<sup>13</sup>.

No Brasil, os pedidos de patentes são depositados primeiramente no INPI, órgão vinculado ao Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior<sup>14</sup>. Após avaliação inicial desse órgão, os pedidos considerados patenteáveis de produtos e processos farmacêuticos são encaminhados para anuência prévia da ANVISA, via a Coordenação de Propriedade Intelectual (COOPI), divisão da agência que atua na área<sup>15</sup>.

A análise técnica da COOPI poderá emitir novas exigências, concedendo ou não a anuência. Concluído o exame, o pedido de patente será deferido ou indeferido pelo INPI, concedendo-se assim a carta-patente<sup>16</sup>.

Tem-se, na verdade, uma atuação coordenada entre a ANVISA e o INPI, de modo a garantir melhores padrões técnicos no processo de decisão de patentes farmacêuticas, dado o grau de importância dos medicamentos para a saúde pública<sup>13</sup>.

Nesse sentido, a COOPI, através do instituto legal da anuência prévia, vem atuando no exame de pedidos de patente, na tentativa de evitar a concessão de patentes indevidas e triviais, que não apresentam nenhuma contribuição tecnológica ou terapêutica e que tão somente servem como instrumento para reserva e prolongamento da exclusividade no mercado<sup>17</sup>.

Grandes impasses ocorreram e ainda ocorrem no tocante à propriedade industrial no campo da biotecnologia. Os requisitos de patenteabilidade de tais processos geram muitas controvérsias entre os órgãos envolvidos (ANVISA e INPI), principalmente com relação ao conceito da atividade inventiva<sup>16</sup>.

A documentação patenteável deve possuir uma descrição suficiente daquilo que é reivindicado como invenção, para que possa permitir a um terceiro a reprodutibilidade tanto para fins de pesquisa quanto em escala industrial<sup>3</sup>.

Para a análise de tais pedidos de patentes no campo da biotecnologia, os critérios utilizados são basicamente os mesmos já estabelecidos para as outras áreas tecnológicas, entretanto, existem algumas diferenças com relação à repetibilidade e suficiência descritiva da invenção, visto que nem sempre é possível ser alcançada uma descrição escrita completa da invenção e, com isso, a realização prática torna-se inviável e inacessível ao público interessado no assunto<sup>3</sup>.

Várias patentes encontradas reivindicam as sequências de proteínas da membrana externa da *Neisseria meningitidis* sorogrupo B (NM B). Essa reivindicação está em desacordo com a LPI por dois motivos. Primeiro, trata-se de sequências naturais presentes na NM B. Segundo, a LPI permite apenas o patenteamento de micro-organismos transgênicos<sup>18</sup> e estas novas sequências são, a princípio, uma característica alcançável pela espécie em condições naturais.

Recentemente, as vacinas desenvolvidas na década de 1990 foram reavaliadas, utilizando-se a proteômica<sup>19</sup>. Essa avaliação permitiu identificar nessas preparações várias proteínas minoritárias, inclusive antígenos que estão sendo reivindicados nos pedidos de patentes. Como esses antígenos se encontram em preparações vacinais desde a década de 1990, eles não podem ser considerados novos, logo não são patenteáveis.



**Figura 4.** Status das patentes no INPI, no período de 1990 a 2005

Dentre os 56 pedidos, nacionais e internacionais, depositados no Brasil, 37 depósitos efetuados ainda estão em fase de publicação do pedido

ou “entrada na fase nacional”, ou seja, são pedidos que se encontram em análise formal e que provavelmente não estão sob análise técnica no INPI, o que significa que há um grande número de pedidos em espera para serem analisados. Ainda com relação ao total de pedidos encontrados, oito pedidos encontram-se em análise técnica, quatro depósitos foram arquivados por falta de pagamento de anuidades ou por falta de pedido de exame, quatro pedidos foram indeferidos por não apresentarem requisitos de patenteabilidade e apenas três pedidos foram deferidos pelo INPI. Dos pedidos deferidos, encaminhados para a ANVISA, dois foram anuídos e um foi não anuído (Figura 4).

Confere ressaltar que a avaliação desses pedidos pelos critérios anteriormente discutidos, de patenteabilidade e atividade inventiva, levaria a indeferir um grande número desses processos.

### Registro

A avaliação reguladora sobre as vacinas pode ser dividida em três estágios: desenvolvimento, licença e pós-licença. O estágio de desenvolvimento consiste de duas partes, denominadas de pesquisas pré-clínicas e desenvolvimento e pesquisas clínicas e desenvolvimento. Na parte de pesquisas pré-clínicas e desenvolvimento estão incluídos os detalhes de desenvolvimento e produção da vacina. São experimentos realizados em laboratório, que podem utilizar técnicas *in vitro* e, quando necessário, também podem fazer uso de técnicas *in vivo*. Nesta etapa são realizados os testes de controle, que deverão subsidiar os estudos clínicos em humanos, ou seja, é nessa etapa que são investigadas as características relativas à segurança e à qualidade da candidata a vacina<sup>20</sup>. Atualmente, existem três vacinas disponíveis contra a meningite meningocócica sorogrupo B<sup>21</sup>, produzidas a partir de OMV, provenientes de Cuba, Noruega e Nova Zelândia<sup>22-24</sup>.

No Brasil, na década de 1990, foi registrada uma vacina contra NM B, produzida pelo Centro de Biologia Molecular de Havana, Cuba, conhecida como VA-MENGOC-BC. Essa vacina baseia-se nas vesículas de proteínas da membrana externa (OMV) do sorotipo B:4.P1.15, prevalente naquele país. Embora esse sorotipo também seja prevalente no Brasil, aqui existe uma variedade maior de outros sorotipos<sup>24</sup>. Sendo assim, os resultados obtidos com a vacinação ficaram abaixo do esperado, conseguindo índice de eficácia de 74% em crianças com mais de 4 anos de idade, porém a proteção ainda foi menos

satisfatória para crianças abaixo dos 4 anos de idade, nas quais registrou-se uma eficácia de 37%<sup>25</sup>.

Apesar desses dados, a Comissão Mista Brasil-Cuba, constituída pelo Ministério da Saúde Brasileiro, com a finalidade de avaliar o emprego da vacina VAMENOC-BC em todo o Brasil no biênio 1989-1990, estimou uma eficácia de 75%, resultante de uma avaliação realizada em seis estados da Federação. Tal resultado levou o governo brasileiro a validar o uso da vacina em situações endêmicas<sup>25</sup>.

Com relação à capacidade imunológica destas vacinas, sabe-se que a imunogenicidade produzida a partir da OMV está diretamente relacionada à proteína de membrana externa Por A, proteína classe 1. Devido à proteína Por A apresentar alta variabilidade em sua estrutura primária, as vacinas que a utilizam em suas preparações apresentam uma baixa capacidade de controle endêmico contra a doença meningocócica causada pelo sorogrupo B<sup>26</sup>.

Fora do Brasil, diversas vacinas contendo proteínas de membrana externa vêm sendo testadas quanto a sua segurança, eficácia e imunogenicidade e já possuem registro em seus países de origem, como é o caso da vacina da Noruega e da Nova Zelândia<sup>27</sup>.

A base da vacina norueguesa consiste de um extrato obtido com deoxicolato a partir de vesículas de proteínas de membrana externa e LOS, adsorvidos ao hidróxido de alumínio. Essa vacina se baseia nas proteínas de membrana externa do sorotipo B:15:P1.16. Os estudos realizados na Noruega com jovens na faixa de 13 a 21 anos de idade mostraram que essa vacina apresentou índice de eficácia de 57%. Este valor foi calculado a partir do título de anticorpos encontrados na faixa da população investigada, sendo o mesmo considerado insuficiente pelas autoridades do país, não justificando assim um programa contínuo de vacinação pública<sup>22</sup>.

Com relação à outra vacina, proveniente da Nova Zelândia, ainda existe falta de consenso entre a comunidade científica. Parte dos pesquisadores considera a vacina segura e eficaz, enquanto outros questionam os estudos epidemiológicos apresentados<sup>23</sup>.

Dessa forma, diversas vacinas têm sido experimentadas contra o meningococo B, entretanto ainda existem muitas controvérsias sobre a eficácia desses produtos, principalmente devido à baixa imunogenicidade apresentada por algumas preparações proteicas e também à elevada variação fenotípica desses antígenos.

Os resultados apresentados nos vários países demonstraram que a estratégia clássica de produção de vacinas contra *Neisseria meningitidis* sorogrupo B teve resultados abaixo do esperado. Por outro lado, com o avanço da tecnologia genética e com a era pós-genômica, algumas tentativas têm sido feitas no sentido de produzir uma preparação candidata a vacina que seja capaz de conferir proteção contra a grande diversidade de cepas de *N. meningitidis* B. Essa nova abordagem faz parte daquilo que os autores chamam de vacinologia reversa<sup>19</sup>.

Sendo assim, o registro de vacinas preparadas por essa nova tecnologia irá requerer uma preparação maior das autoridades reguladoras dentro das funções definidas pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Sabe-se que a qualidade, segurança e eficácia das vacinas deve ser assegurada primeiramente pelo produtor, contudo a atuação das Autoridades Reguladoras Nacionais (ARN) não pode ser prescindida, já que a sua atuação é prevista na legislação de diversos países em desenvolvimento. A regulação de vacinas é um processo complexo, que depende, dentre outros fatores, da infraestrutura nacional de desenvolvimento de conhecimento na área de biotecnologia. Em 1999, a OMS definiu seis principais funções das ARN, que são<sup>4</sup>:

1. Publicação dos requerimentos necessários para o licenciamento de um produto;
2. Vigilância sanitária das vacinas (segurança e eficácia);
3. Promover um sistema seguro para a liberação de lotes;
4. A utilização de laboratórios oficiais de controle para a realização de ensaios analíticos que garantam a segurança e eficácia do produto, quando necessário;
5. Inspeccionar as fábricas, atuando na implementação das Boas Práticas de Fabricação;
6. Avaliar os ensaios clínicos.

De maneira geral, as ARN, tanto de países desenvolvidos quanto de países em desenvolvimento, atuam de maneira bastante similar, atendendo aos seis itens preconizados pela OMS. As ARN diferem somente no que diz respeito à exportação e importação de vacinas. Nos Estados Unidos, o FDA (*Food Drug Administration*) atua somente no mercado nacional, além de certificar as exportações. Na Europa, a EMEA (*European Medicine Evaluation Agency*) atua de maneira similar junto aos

países da Comunidade Europeia, embora já tenha expressado interesse em adquirir funções reguladoras adicionais para vacinas produzidas na Europa que tenham como alvo os países em desenvolvimento<sup>4</sup>.

No âmbito do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, o órgão responsável pelo registro de medicamentos é a ANVISA. Durante algum tempo, o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) também colaborou com esse processo<sup>6</sup>.

Recentemente, a ANVISA vem alinhando-se cada vez mais com as iniciativas da OMS e da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), com o intuito de melhorar a cooperação internacional entre as ARN no campo das vacinas<sup>4</sup>.

## CONCLUSÃO

As tentativas de obtenção de uma vacina eficiente contra o meningococo B, até o momento, não apresentaram resultados satisfatórios. As OMVs apresentam-se eficientes somente para o controle de surtos causados por cepas homólogas à da vacina, além de apresentarem baixa imunogenicidade em crianças abaixo de 2 anos de idade. Diante deste fato, com o sequenciamento gênico do meningococo B e o surgimento da vacinologia reversa, novas tecnologias para o desenvolvimento de vacinas têm sido testadas<sup>28</sup>.

As novas tecnologias para o desenvolvimento de vacinas levaram a um grande incremento no número de patentes relativas ao meningococo B. Várias dessas patentes solicitaram proteção sobre antígenos que já estavam presentes nas vacinas tradicionais (OMV), não justificando a princípio esta concessão.

Levando em conta que as patentes podem gerar um monopólio e que este pode tornar as vacinas muito caras, reduzindo o benefício econômico gerado e tornando os novos produtos inacessíveis a grande parte da população, esses pedidos devem analisados criteriosamente, para proteger os interesses da saúde pública e garantir que as patentes sejam concedidas somente em casos de inovação tecnológica ou terapêutica.

Além disso, o desenvolvimento de novas vacinas levará à solicitação de registro das mesmas. A incorporação desses novos produtos vem acompanhada por um conjunto de exigências legais sob o ponto de vista regulador, no sentido de garantir a segurança e eficácia destes produtos e assegurar que os mesmos não ofereçam riscos nem danos à saúde da população.

Com o surgimento dessas novas vacinas, surge também a necessidade de preparação do Estado para atender a essa nova demanda, tanto no sentido do entendimento das novas tecnologias, quanto na incorporação desses novos produtos no mercado Nacional.

A qualidade, segurança e eficácia das vacinas devem ser asseguradas primeiramente pelo produtor, contudo deve haver a participação das ARN.

Segundo a OMS, a avaliação, licença, controle e vigilância de produtos biológicos é o maior desafio para as ARN, que se confronta com o crescente número de novos produtos, com padrões de qualidade complexos e novas técnicas que crescem com o rápido avanço da ciência.

Dessa forma, diante dos riscos e desafios que envolvem os produtos imunobiológicos, e mais especificamente as vacinas contra a meningite meningocócica sorogrupo B, o processo de registro e o controle de qualidade desses produtos devem basear-se em uma rigorosa análise técnico-científica, que deve ser realizada por profissionais que disponham de conhecimento técnico específico suficiente para emitir um parecer que fornecerá ferramentas na decisão sobre a concessão do registro sanitário. Por se tratar de um produto desenvolvido com uma tecnologia ainda não totalmente dominada por muitos grupos, esse tipo de vacina merece atenção no que diz respeito à importância do investimento na formação de profissionais que estejam aptos a atender a esta demanda de vigilância sanitária, que engloba tanto a concessão de registro do produto quanto a avaliação de parâmetros de qualidade importantes.

## REFERÊNCIAS

1. Da Ponte FC. Vacinação, controle de qualidade e produção de vacinas no Brasil a partir de 1960. *Hist Ciênc Saúde*. 2003;10(2):619-53.
2. Greco M. The future of vaccines: an industrial perspective. *Vaccine*. 2002;20:101-3.
3. Piatti S. Critérios de análise de las patentes farmacêuticas. 2006. [acesso em jul 2009]. Disponível em: <http://www.deolhonaspateentes.org.br/?cid=707>
4. Nishioga SA. Cooperation between regulatory authorities from developing countries in the evaluation of vaccine clinical trials. *Cad Saúde Pública*. 2008;24(9):2191-2.
5. Said DMP. Registro Sanitário de medicamentos: uma experiência de revisão [dissertação de mestrado]. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/Fundação Oswaldo Cruz; 2008.

6. Gemal AL, da Costa JAC, Costa CI, Leal EC. Registro sanitário de produtos biológicos: papel do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. *Rev Brasil Vigil Sanit*. 2006;2:157-65.
7. Ramsay ME, Andrews N, Kaczmarski EB, Miller E. Efficacy of meningococcal serogroup C conjugate vaccine in teenagers and toddlers in England. *Lancet*. 2001;357:195-6.
8. Griffiss JM, Yamasaki R, Estabrook M, Kim JJ. Meningococcal molecular mimicry end the search for an ideal vaccine. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1991;85(Supl 1):32-6.
9. Cobb BA, Wang Q, Tzianabos AO. Polysaccharide processing and presentation by MHCII pathway. *Cell*. 2004;117(5):677-87.
10. Tappero JW, Lagos R, Ballesteros AM, Plikaytis B, Williams D, Dykes J, et al. Immunogenicity of 2 serogroup B outer-membrane protein meningococcal vaccines: a randomized controlled trial in Chile. *JAMA*. 1999;281(16):1520-7.
11. Capecci B, Serruto D, Adu-Bobie J, Rappuoli R, Pizza M. The genome revolution vaccine research. *Curr Issues Mol Biol*. 2004;6(1):17-27.
12. Tettelin H, Saunders NJ, Heidelberg J, Jeffries AC, Nelson KE, Eisen JA, et al. Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. *Science*. 2000;287:1809-15.
13. Basso M. A ANVISA e a concessão de patentes farmacêuticas. Curitiba, PR: Instituto de Tecnologia do Paraná; 2004.
14. Brasil. Lei nº 9.279/96, de 14 de maio de 1996. Regulamenta direitos e obrigações relativos à propriedade industrial. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília (DF)*; 15 maio 1996; Seção 1(93):8353-66.
15. Brasil. Lei nº 10.196/01, de 14 de fevereiro de 2001. Altera e acresce dispositivos à Lei nº 9.279/96, de 14 de maio de 1996, que regula direitos e obrigações relativos à propriedade industrial. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília (DF)*; 16 fev 2001; Seção 1(34):4.
16. Zalfa VMA. Comprimidos de liberação modificada: análise dos pedidos de patente depositados no Brasil [dissertação de mestrado]. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/Fundação Oswaldo Cruz; 2008. p.9-12.
17. Silva HM. Avaliação da análise dos pedidos de patentes farmacêuticas feita pela ANVISA no cumprimento do mandato legal da anuência prévia [dissertação de mestrado]. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública/Fundação Oswaldo Cruz; 2008.
18. Diretrizes para o exame de pedidos de patente nas áreas de biotecnologia e farmacêutica depositados após 31 de dezembro de 1994. [acesso em maio 2009]. Disponível em: [http://www.inpi.gov.br/menu-esquerdo/patente/pasta\\_manual/DiretrizesQuimica.pdf/view](http://www.inpi.gov.br/menu-esquerdo/patente/pasta_manual/DiretrizesQuimica.pdf/view)
19. Rappuoli R. Reverse vaccinology. *Curr Opin Microbiol*. 2000;3:445-50.
20. Wood D, Shin J, Duval B, Schmitt H. Assuring the quality, safety and efficacy of HPV vaccines: the scientific basis of regulatory expectations pre-and post-licensure. *Vaccine*. 2006;24 Suppl 3:187-92.
21. Costa EA, Amaral Jr C, Juarez E. Eficácia da vacina antimeningocócica (VA-MENGO BC) nas condições de uso no Brasil, no período 1989/90. *Info Epidemiol SUS*. 1995;3(2):35-9.
22. Bjune G, Hoiby EA, Gronnesby JK, Arnesen O, Fredriksen JHO, Haltstensen A, et al. Effect of outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease in Norway. *Lancet*. 1991;338:1093-6.
23. Oster P, Lennon D, O'Hallahan J, Mulholland K, Reid S, Martin D. MeNZB™: a safe and highly immunogenic tailor-made vaccine against the New Zealand *Neisseria meningitidis* serogroup B disease epidemic strain. *Vaccine*. 2005;23:2191-6.
24. Sierra GVA, Gampa HC, Valcarcel NM, Garcia IL, Izquierdo PL, Sotolongo PE, et al. Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: protect trial and mass vaccination results in Cuba. *NIPH Ann*. 1991;14:195-210.
25. Brasil. Ministério da Saúde. Comissão Mista Brasil-Cuba. Relatório sobre a avaliação da eficácia da vacina antimeningocócica BC de origem cubana. *Info Epidemiol SUS*. 1995;3(2):7-32.
26. Urwin R, Russell JE, Thomson E, Holmes EC, Feavers IM, Maiden MC. Distribution of surface protein variants among hyperinvasive meningococcal: implications for vaccine design. *Infect Immun*. 2004;72(10):5955-62.
27. Esclarecimentos sobre registros de produtos biológicos, incluindo vacinas. 2005. [acesso em jun 2009]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/registro/biologicos\\_hemoterapicos.htm](http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/registro/biologicos_hemoterapicos.htm)
28. De Filippis I. Quest for a broad-range vaccine against *Neisseria meningitidis* serogroup B: implications of genetic variations of the surface-exposed proteins. *J Med Microbiol*. 2009;58:1127-32.

## Determinação de bisfenol A (BFA) em água mineral por meio de CG/DCE – uma nova proposta de metodologia para análise

### Bisphenol A (BPA) determination in mineral water by using CG/DCE – a new analysis methodology proposal

RIALA6/1513

Marcia Helena de Rizzo da MATTA\*, Alecsandra Leite PEREIRA, Êmerson MONTAGNER, Guilherme Vilalba FORTUNATO

\*Endereço para correspondência: Centro de Ciências Exatas e Tecnologia (CCET), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), CP 549, Campo Grande, MS, Brasil, CEP: 79070-900. E-mail: marciaufms@gmail.com

Recebido: 08.03.2012 – Aceito para publicação: 28.12.2012

#### RESUMO

Neste trabalho foi avaliada a metodologia para determinar bisfenol A (BFA) em água mineral, utilizando-se a extração em fase sólida (SPE), a derivação com anidrido trifluoroacético (TFAA) e a análise por cromatografia em fase gasosa com detector de captura de elétrons (GC/ECD). A curva analítica forneceu coeficiente de correlação (R) de 0,999, valores de recuperação entre 88 e 106%, limites de detecção e de quantificação de 2,5 e 25,0 ng.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. A metodologia foi aplicada em quatro amostras de diferentes marcas de água mineral, dentre as quais apenas uma apresentou resultado detectável de 0,46 ng.mL<sup>-1</sup>. Este estudo sugere que o BFA pode ser facilmente detectado e quantificado na matriz utilizada por meio de metodologia proposta, a qual demonstrou ser seletiva, precisa e exata.

**Palavras-chave.** bisfenol A, água mineral, GC/ECD.

#### ABSTRACT

This study evaluated the methodology for determining bisphenol A (BPA) in mineral water by using the solid phase extraction (SPE), the derivatization with trifluoroacetic anhydride (TFAA), and the gas chromatography with electron capture detector (GC/ECD) analysis. The analytical curve provided the correlation coefficient (R) of 0.999, and the recovery values from 88 to 106%. The limit of detection was 2.5 and the limit of quantification was 25.0 ng.mL<sup>-1</sup>. Four mineral water samples from different brands were analyzed by this methodology and among them only one (sample 3) showed detectable result of 0.46 ng.mL<sup>-1</sup>. This study suggested that BPA could be easily detected and quantified in mineral water samples by employing the proposed methodology, which was selective, accurate and precise.

**Keywords.** bisphenol A, mineral water, GC/ECD

## INTRODUÇÃO

Atualmente, as maiores preocupações em relação à exposição de humanos e outros animais aos agentes e substâncias químicas, que promovem alterações no sistema endócrino e nos hormônios, denominados desreguladores endócrinos (DE), são: se essas substâncias podem produzir efeitos tóxicos em baixas concentrações; quais substâncias estão associadas aos efeitos tóxicos a baixas concentrações; se essas substâncias estão presentes em concentrações ambientalmente relevantes que possam ser uma ameaça à saúde de humanos e animais; se existe uma concentração limiar abaixo da qual essas substâncias químicas podem ser consideradas como seguras<sup>1</sup>.

Hipóteses prevendo alterações no funcionamento do sistema endócrino de algumas espécies animais expostas a determinadas substâncias químicas tóxicas não são novas, pois em 1938 foi feita a primeira demonstração de que alguns produtos químicos poderiam ter ação estrogênica quando administrados em animais. Recentemente, essa questão voltou à tona com atenção por parte da comunidade científica, principalmente devido ao surgimento de novas hipóteses, extremamente sérias e mais específicas, que levantam a possibilidade da exposição a agentes químicos ambientais com ação estrogênica – que promovem alterações no sistema endócrino humano e nos hormônios – poder estar relacionada ao aumento da incidência de câncer de mama, queda da quantidade de esperma, diminuição da fertilidade, defeitos congênitos secundários à exposição fetal e outras alterações<sup>2</sup>.

Dentre as várias substâncias capazes de afetar o sistema endócrino, destaca-se o bisfenol A (BFA)<sup>1</sup>.

O BFA, 2,2-bis(4-hidroxifenil)propano, é uma substância química produzida em grandes quantidades para uso principalmente na produção de plásticos policarbonato e resinas epóxi. A produção mundial foi estimada em 2,5 milhões de toneladas em 2001<sup>1,3-5</sup>. O policarbonato, composto de monômeros de BFA, possui várias qualidades comerciais desejáveis, como transparência, moldabilidade e alta força de impacto<sup>6</sup>.

A exposição humana ao BFA não é insignificante, considerando que policarbonatos e resinas epóxi, tendo como base o BFA, apresentam várias aplicações, como, por exemplo, garrafas de bebidas, potes de comida para bebês, revestimento anticorrosivo em latas de alimento, fabricação de discos compactos, selantes dentários, equipamentos de segurança e dispositivos médicos<sup>6,7</sup>.

Desde o reconhecimento de que o BFA possui propriedades estrogênicas fracas, muitos estudos foram feitos para estimar a exposição humana e as concentrações ambientais do composto. O BFA migra em níveis de  $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  dos produtos do policarbonato<sup>8</sup> ou de revestimento epóxi em latas<sup>9</sup> à água durante processos térmicos. O BFA migra também das mangueiras de PVC (cloreto de polivinila) à água em temperatura ambiente e pH neutro<sup>10</sup>. Tal composto tem sido recentemente relatado como o mais potente mimetizador antropogênico<sup>11</sup>. Análises do BFA demonstraram que este composto induz proliferação, alteração na região reprodutiva da fêmea, bem como câncer no testículo e na próstata, redução de esperma, desmasculinização, feminilização, alteração nas funções de imunidade e diminuição de fertilidade em pássaros, peixes e mamíferos<sup>12</sup>.

Nos últimos anos, o consumo de água engarrafada tem crescido de maneira bastante acentuada no mundo todo, sendo a maioria das garrafas feita de polietileno tereftalato (PET) – um plástico derivado do petróleo –, das quais podem migrar determinadas substâncias, como o BFA<sup>13</sup>. Estudos de laboratório demonstram que o BFA biologicamente ativo é liberado a partir de garrafas de policarbonato, seguindo a simulação de uso normal. Por isso, acredita-se que uma importante fonte de BFA esteja na ingestão de alimentos e bebidas que tenham estado em contato com resinas epóxis ou plásticos policarbonato<sup>14-17</sup>. A proposta deste trabalho foi, portanto, desenvolver e validar uma metodologia de análise simples, rápida, eficiente e não onerosa para determinação de BFA em água mineral – armazenada em diferentes embalagens, utilizando-se extração em fase sólida (EFS) e análise por cromatografia em fase gasosa com detector de captura de elétrons (CG-DCE) –, bem como contribuir ineditamente para o início do monitoramento do contaminante em questão nas águas minerais comercializadas no nosso país.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Padrões, soluções e materiais

A solução estoque de BFA (Aldrich, EUA, 95%) na concentração de  $102 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  e soluções de trabalho de BFA na concentração de  $1,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  foram preparadas em etanol (Vetec, Brasil, 95%).

A solução de água/metanol na proporção 9/1 (v/v) foi feita com água ultrapurificada (Elga, condutividade

18,2 mΩ.cm<sup>-1</sup>) e metanol (Dinâmica, Brasil, grau HPLC/UV), este último também utilizado no decorrer do processo analítico, no qual também foram utilizados acetato de etila (Mallinckrodt, México, grau HPLC), hexano (Vetec, Brasil, 95%, grau análise de pesticidas) e anidrido trifluoracético TFAA (Aldrich, EUA, ≥ 99%).

Para a EFS foram utilizados cartuchos STRATA-X de 200 mg x 3 mL (Phenomenex, EUA) em um sistema de extração de 12 posições da Supelco (EUA) acoplado à bomba de vácuo da Tecnal (Brasil), com pressão de 20 mmHg.

Para procedimentos de secagem no tratamento analítico foi utilizado nitrogênio (5.0, White Martins, Brasil, grau analítico).

### Amostra testemunha

Para os ensaios de testemunha foi utilizada, como amostra, água isenta de BFA e de todos os demais reagentes descritos, aplicados ao método proposto, a título de isentar a matriz de possíveis interferências na determinação do analito.

### Branco

Os ensaios de branco consistiram em realizar todo o procedimento de extração sem a passagem de amostra pelo sistema de extração, a fim de verificar a isenção de possíveis interferências na análise do BFA.

### Amostras

Foram usadas quatro amostras de água mineral, descritas na Tabela 1, tendo-se como critério de seleção os diferentes materiais utilizados nas embalagens: PET, PVC, PP (polipropileno) e vidro, atendendo a uma necessidade de aplicação da metodologia desenvolvida, visando possibilitar o estudo da verificação da presença de BFA nas amostras.

**Tabela 1.** Descrição das amostras reais de água mineral

Amostra	Tipo	Embalagem	Volume
1	Água mineral natural	PET	1,50 L
2	Água mineral natural	PVC	1,50 L
3	Água mineral natural	PP	310 mL
4	Água mineral natural com gás*	Vidro	330 mL

\*Submetida a 60 minutos em ultrassom (Spencer, Unique, Brasil) para desgaseificação.

Não foi necessário executar procedimentos específicos para conservação das amostras, visto que foram adquiridas várias unidades, de mesmo lote e de

cada tipo de embalagem, no comércio local (Campo Grande/MS), abrigadas sob ausência de luz, em local fresco, à temperatura ambiente até serem submetidas ao procedimento analítico, dentro do prazo de validade especificado nas embalagens.

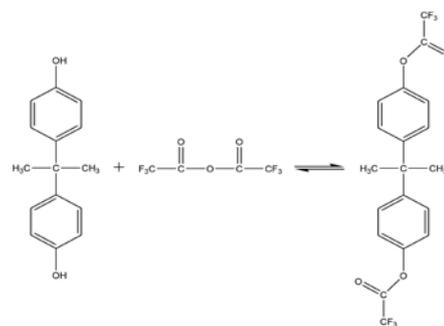
### Preparo das amostras

#### Extração

A extração do analito foi efetuada por EFS, utilizando-se 500 mL de amostra para cada ensaio. Os cartuchos foram condicionados com a passagem sequencial, sob vácuo, com vazão de 1,5 mL.min<sup>-1</sup> de 5,0 mL de acetato de etila e 5,0 mL de metanol, repouso de 5 min, e 15,0 mL de água ultrapura, recebendo em seguida a amostra com vazão aproximada de 4 mL.min<sup>-1</sup>, sendo, no término deste processo, o cartucho utilizado lavado com 1,0 mL de solução água/metanol (9:1) (v/v) e seco sob vácuo durante 80 min. A eluição foi efetuada com 4,0 mL de metanol com vazão de 1 mL.min<sup>-1</sup>, e o eluato levado à secura sob fluxo brando de nitrogênio, sendo o extrato obtido redissolvido em 2,0 mL de metanol, em frasco apropriado com tampa para posterior realização da reação de derivação.

#### Derivação

Visando o aumento de sensibilidade, de modo a proporcionar melhor interação do analito frente à coluna utilizada, conforme proposto por Costa<sup>18</sup>, os extratos obtidos foram secos novamente sob suave corrente de N<sub>2</sub>, e a derivação foi efetuada adicionando-se 200 µL de TFAA a cada frasco, fechando-os e agitando-os por 30 s. Após a homogeneização, foram mantidos em repouso por 15 min em estufa a 40 °C, sendo posteriormente secos sob fluxo de N<sub>2</sub>, retomados ao volume de 1,0 mL com hexano, lacrados e reservados sob refrigeração para análise imediata. A Figura 1, a seguir, ilustra a reação de derivação do BFA com TFAA.



**Figura 1.** Reação de derivação do BFA com TFAA

## Análises

As análises foram efetuadas em cromatógrafo a gás acoplado ao detector por captura de elétrons CP-3800 (Varian), equipado com uma coluna capilar WCOT de sílica fundida, CP-Sil 13CB (50 m x 0,32 mm x 0,4 µm) da Varian. Utilizou-se hélio (5.0 analítico, White Martins) como gás de arraste e nitrogênio (4.6, White Martins) como gás de *make-up*. O volume de injeção foi de 1,0 µL no modo sem divisão (*splitless*). Para geração e tratamento dos dados cromatográficos foi utilizado o software SATURN 2100. As condições cromatográficas estão descritas na Tabela 2.

**Tabela 2.** Condições cromatográficas do método analítico

Temperatura do injetor (°C)	270
Temperatura do detector (°C)	280
Programação de temperatura da coluna	Inicial: 120 (2 min)
	120-210 (15 °C.min <sup>-1</sup> )
	210-280 (10 °C.min <sup>-1</sup> ) Final: 280 (5 min)
Pressão na coluna (psi)	12,3
Vazão do gás de arraste (mL.min <sup>-1</sup> )	2,1
Vazão do gás de <i>make-up</i> (mL.min <sup>-1</sup> )	30
Tempo de análise (min)	20

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Validação do método

#### Seletividade

Os cromatogramas obtidos das amostras do branco, da testemunha e do padrão BFA evidenciaram que no tempo de retenção do BFA (12,9 min) não foram registrados picos cromatográficos, indicando que não houve interferências da matriz no padrão, garantindo, portanto, que o método é especialmente seletivo.

#### Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Os LD e LQ foram determinados pela relação sinal: ruído da linha base, empregando-se soluções diluídas até se obter um sinal referente ao analito com uma altura média igual a três vezes o sinal referente ao ruído para o LD e dez vezes para o LQ<sup>19</sup>. Determinou-se, portanto, para o equipamento os valores de 7,5 e 25,0 ng.mL<sup>-1</sup> (LD e LQ, respectivamente) e para o método os valores de 1,5 x 10<sup>-2</sup> e 5,0 x 10<sup>-2</sup> ng.mL<sup>-1</sup> (LD e LQ, respectivamente).

#### Linearidade, faixa de trabalho e sensibilidade

O tempo de retenção do BFA derivado com TFAA obtido foi de 12,9 min.

Foram feitas análises em triplicata das soluções padrão de BFA derivado com TFAA para a elaboração da curva analítica. A equação da curva analítica obtida, linear numa faixa de 25 a 250 ng.mL<sup>-1</sup>, foi:  $y = 60,284 + 1,216x$ , com  $R = 0,9928$ . Os valores obtidos de inclinação e do fator de correlação evidenciam que existe uma correlação fortíssima entre as concentrações estudadas e os sinais gerados pelo equipamento, indicando a possibilidade de distinção entre duas concentrações próximas, revelando que o método mostrou-se sensível<sup>20</sup>.

### Ensaio de recuperação

Os ensaios de recuperação, parâmetros necessários para avaliar a precisão e exatidão do método<sup>20</sup>, efetuados por meio das análises cromatográficas, apresentaram excelentes resultados.

As amostras fortificadas e derivadas com TFAA foram submetidas ao procedimento analítico (em triplicata), sendo os dados concernentes às análises apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Dados obtidos nos ensaios de recuperação de BFA

Níveis de LQ	Concentração (ng mL <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	CV (%) <sup>c</sup>	Recuperação (%) <sup>b</sup>
1LQ	25	15,5	88
3LQ	75	10,9	79
5LQ	125	13,2	106

<sup>a</sup>Concentração de padrão de BFA na matriz; <sup>b</sup>Coefficiente de variação; <sup>c</sup>Recuperação média

### Exatidão e precisão

A porcentagem de recuperação determina a exatidão do método. Na Tabela 3 observa-se que a recuperação das amostras (79-106%) está dentro do limite (70-120%) estabelecido pela literatura de análise de resíduos<sup>19-21</sup>.

Avaliou-se a precisão do método pelos valores dos coeficientes de variação percentual [CV (%)], que sofreram variação de 10,9 a 15,5%, com média de 13,2%, sendo, portanto, o método considerado preciso, dado que os valores determinados ficaram abaixo do recomendado pela literatura, que é de 20%<sup>19,20</sup>.

### Aplicação do método em amostras comerciais de água mineral

Os resultados obtidos com a aplicação do método proposto (em triplicata) em quatro tipos de amostras de água mineral são apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Resultados da análise de BFA em água mineral

Amostra	Concentração (ng.mL <sup>-1</sup> )
1	≤ LD
2	≤ LD
3	0,46
4	≤ LD

LD: limite de detecção; n = 3

Uma vez que o limite máximo de migração do BFA, das embalagens para os alimentos e bebidas, permitido no Brasil, referenciado no estabelecido pela Comunidade Europeia em 2004, é de 0,6 µg.g<sup>-1</sup> de material plástico<sup>22,23</sup>, a quantidade de BFA encontrada nas amostras está dentro do permitido.

Mesmo sendo prejudicial à saúde humana e ao meio ambiente, não existem limites estabelecidos para o BFA em lançamento de efluentes, visto que nada consta na Resolução nº 430 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) sobre o BFA<sup>24</sup>. Mundialmente, também não há uma quantidade consensual de ingestão diária para o ser humano.

Apesar dos muitos pontos conflitantes, há um consenso comum entre muitos pesquisadores relacionado às evidências das atividades deletérias de algumas substâncias exógenas, dentre elas o BFA, para o sistema endócrino, denotando a importância das metodologias de detecção e quantificação desses compostos a fim de que seja possível elaborar um sistema de vigilância e prevenção, tanto para o meio ambiente quanto para a saúde humana.

Consideramos de imensa importância que os órgãos nacionais ligados à saúde e ao meio ambiente passem a considerar os contaminantes endócrinos, entre eles o BFA, passíveis de controle, estabelecendo limites para esses compostos em produtos de utilização e consumo humano, como, por exemplo, bebidas e alimentos, uma vez que são considerados extremamente danosos e sérios ameaçadores da reprodução das espécies, principalmente da própria reprodução e sobrevivência humana.

## CONCLUSÃO

Uma metodologia utilizando a CG/DCE para análise de BFA em água mineral foi desenvolvida e validada, vindo a somar às metodologias existentes, ampliando o leque de instrumentação utilizado para verificação e monitoramento desse contaminante.

A EFS mostrou-se adequada, fácil de realizar e relativamente rápida.

O método proposto forneceu parâmetros analíticos apropriados (LD, LQ e linearidade da curva analítica), sendo considerado seletivo, preciso e exato, conforme os valores obtidos das recuperações e de CV (%).

Quando aplicado a amostras reais, o fato de apenas uma delas, aliás, a menos provável pelo tipo de material, ter apresentado valor detectável de BFA evidencia a necessidade de monitorar e acompanhar os níveis desse contaminante nos vários tipos de recipientes e embalagens de alimentos, bebidas e medicamentos, entre outros, utilizados comercialmente, de modo a fornecer suporte para uma modelagem matemática do consumo humano desse composto, avaliando os possíveis riscos à saúde e a prevenção dos mesmos.

Os resultados obtidos visam demonstrar a aplicabilidade da metodologia proposta em análises de monitoramento de BFA em água mineral, com alto grau de confiabilidade, não expressando formas ou rotas de contaminação.

## AGRADECIMENTOS

À Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPP)/UFMS, pelo apoio financeiro, e ao Ministério da Educação (MEC), pela bolsa concedida e pelo auxílio financeiro, relativos ao Programa de Educação Tutorial (PET).

## REFERÊNCIAS

1. Biles JE, Mcneal TP, Begley TH, Hollifield HC. Determination of bisphenol A in reusable polycarbonate food-contact plastics and migration to food-simulating liquids. *J Agric Food Chem*. 1997;45:3541-4.
2. Goloubkova T, Spritzer PM. Xenoestrogênios: o exemplo do bisfenol-A. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2000;44:323-30.
3. Fürhacker M, Scharf S, Weber H. Bisphenol A: emissions from point sources. *Chemosphere*. 2000;41:751-6.
4. Staples CA, Dorn PB, Klecka GM, O'Block ST, Haris LR. A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere*. 1998;36:2149-73.
5. Leandro FZ, Marchi MR. Bisphenol A: emissions from point sources. *Chemosphere*. 2000;41(5):751-6.
6. Nira BJ, Steinmetz R. Xenoestrogens: the emerging story of bisphenol A. *Trends Endocrinol Metabol*. 1998;9:124-8.
7. Bisphenol A. *The New York Times*. [acesso em 2012 jul 18]. Disponível em: [http://topics.nytimes.com/top/reference/timestopics/subjects/b/bisphenol\_a/index.html].
8. Krishnan AV, Starhis PS, Permuth F, Tokes L, Feldman D. Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology*. 1993;132:2279-86.

9. Brotons JA, Olea-Serrano MF, Villalobos M, Pedraza V, Olea N. Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environ Health Perspect*. 1995;103:608-12.
10. Yamamoto T, Yasuhara A. Determination of bisphenol A migrated from polyvinyl chloride hoses by GC/MS. *Bunseki Kagaku*. 2000;49:443-7.
11. Kuo HW, Ding WH. Trace determination of bisphenol A and phytoestrogens in infant formula powders by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2004;1027:67-74.
12. Zafra A, Olmo M, Suárez B, Hontoria E, Navalón A, Vilchez JL. Gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of bisphenol A and its chlorinated derivatives in urban wastewater. *Water Res*. 2003;37:735-42.
13. Muerza AF. Impacto ambiental del agua embotellada. [acesso em 2012 jul 18]. Disponível em: [[http://www.consumer.es/web/es/medio\\_ambiente/urbano/2007/05/13/162594.php](http://www.consumer.es/web/es/medio_ambiente/urbano/2007/05/13/162594.php)].
14. Brede C, Fjeldal P, Herikstad H. Increased migration levels of bisphenol A from polycarbonate baby bottles after dishwashing, boiling and brushing. *Food Addit Contam*. 2003;20:684-89.
15. Kang JH, Kondo F, Katayama Y. Human exposure to bisphenol A. *Toxicology*. 2006;226:79-89.
16. Le HH, Carlson EM, Chua JP, Belcher SM. Bisphenol A is released from polycarbonate drinking bottles and mimics the neurotoxic actions of estrogen in developing cerebellar neurons. *Toxicol Lett*. 2008;176:149-56.
17. Fox JE, Gullede J, Englhaupt E, Burow ME, McLachlan JA. Pesticides reduce symbiotic efficiency of nitrogen-fixing rhizobia and host plants. *PNAS*. 2007;104:10282-7.
18. Costa LA. Desenvolvimento e validação de metodologia de análise de bisfenol A em amostras de águas naturais por CG-EM [dissertação de mestrado]. Campo Grande (MS): Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2008.
19. Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSE, Melo LFC. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim Nova*. 2004;27:771-80.
20. Brito NM, Amarante Junior OP, Polese L, Ribeiro ML. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. *Pesticidas: R Ecotox Meio Ambiente*. 2003;13:129-46.
21. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Aprova o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. *Diário Oficial da União, Brasília (DF)*; 2 jun 2003; Seção 1.
22. Sociedade Brasileira de Química (SBQ) – Regional Rio de Janeiro. Canadá proíbe o uso de policarbonato na confecção de mamadeiras a partir de 2009. [acesso em 18 jul 2012]. Disponível em: [<http://www.uff.br/sbqrio/novidades/bisfenol%20policarbonato%20mamadeira.html>].
23. Official Journal of the European Union. Commission Directive 2004/19/EC of 1 March 2004 amending Directive 2002/72/EC relating to plastic materials and articles intended to come into contact with foodstuffs. [acesso em 2012 jul 18]. Disponível em: <http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/commdir200419ec.pdf>
24. Brasil. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. *Diário Oficial da União, Brasília (DF)*; 16 maio 2011; Seção 1:89.

## Emprego de casca de arroz como adsorvente para execução de técnica de MSPD para determinar aflatoxinas em cebolas

### Use of rice husk as an adsorbent for performing MSPS technique for determining the aflatoxins occurrence in onion

RIALA6/1514

Ana Paula Moura Guimarães CARVALHO, Helen Cristina dos Santos HACKBART, Michele Moraes de SOUZA, Eliana BADIALE-FURLONG\*

\*Endereço para correspondência: Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos, Escola de Química e Alimentos EQA, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rua Engenheiro Alfredo Huch, 475, Campus Cidade, Rio Grande, RS, Brasil, CEP: 96201-900. E-mail: dqmebf@furg.br

Recebido: 08.12.2011 – Aceito para publicação: 28.12.2012

#### RESUMO

Foi estudada a extração simultânea de aflatoxinas (AFLAs) B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> em cebolas por meio de técnica de dispersão da matriz em fase sólida (MSPD), utilizando-se a casca de arroz como adsorvente. A identificação e quantificação das aflatoxinas foram realizadas empregando-se cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de fluorescência (CLAE-FL). O melhor adsorvente foi constituído de mistura de casca de arroz: terra diatomácea (1:1) (p/p), empregado na proporção de 1:1 (p/p) com a massa de amostra e a mistura clorofórmio:metanol (5:25) (v/v) como eluente. A metodologia mostrou limites de detecção que variaram de 0,05 a 1 µg.kg<sup>-1</sup>, de exatidão entre 78 e 93%, e coeficientes de variação compreendidos entre 11 e 14%. Após a validação, a metodologia foi testada quanto à sua aplicabilidade para determinar a ocorrência das aflatoxinas em amostras de cebola, as quais foram classificadas segundo a norma do MAPA. A contaminação com aflatoxina foi verificada em 43% das amostras analisadas com teor máximo de 90µg.kg<sup>-1</sup> de AFLAB<sub>2</sub>.

**Palavras-chave.** MSPD, CLAE-FL, CCDAE

#### ABSTRACT

The simultaneous determination of aflatoxins (AFLA) B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> was investigated in onions by means of matrix solid-phase dispersion (MSPD) extraction methodology, and using rice husk as adsorbent element. The AFLA identification and quantification were carried out by using high efficiency thin layer chromatography (HPTLC) and high efficiency liquid chromatography coupled to a fluorescence detector (HPLC-FD). The best adsorbent was the compound constituted by the rice husk:celite mixture (1:1) in a 1:1 ratio with the mass of the sample, and employing the mixture chloroform:methanol (5:25) as eluent. The methodology showed the limit of detection ranging from 0.05 to 1 µg.kg<sup>-1</sup>, and of the accuracy from 78 to 93%; and variation coefficients ranged from 11 to 14%. After being validated, the methodology was tested on its applicability in determining the aflatoxins occurrence in onion samples, which were classified according to the standard MAPA. Aflatoxin contamination was found in 43% of analyzed samples with a maximum content of 90 µg.kg<sup>-1</sup> of AFLAB<sub>2</sub>.

**Keywords.** MSPD, HPLC-FD, HPTLC.

## INTRODUÇÃO

Métodos acessíveis e exequíveis são ferramentas estratégicas e eficientes para garantir a segurança alimentar, pois tornam possível monitorar a contaminação por metais, pesticidas ou compostos tóxicos produzidos por micro-organismos, como as micotoxinas, em amostras alimentares e ambientais<sup>1-5</sup>.

Os métodos envolvendo extração em fase sólida vêm se mostrando promissores para extração de analitos traços, em materiais complexos ou com elevada atividade de água, além de atender a demanda atual por métodos que gerem o mínimo de resíduo para descarte<sup>1,6-8</sup>. O limite para aplicação do método está no custo dos adsorventes, em geral derivados de sílica (C8 e C18) que são pouco eficientes durante a reutilização<sup>7</sup>.

Um substituto para os adsorventes convencionais poderia ser a casca de arroz, abundante no Rio Grande do Sul, cujo emprego em determinações analíticas seria uma importante alternativa para a sustentabilidade da cadeia produtiva do arroz<sup>9</sup>. O seu potencial como adsorvente decorre de sua superfície de contato e constituição química caracterizada por 35% de celulose, 12% de lignina, 25% hemicelulose, 14% de óxidos de silício, além de outros óxidos como os de magnésio e cálcio<sup>10-13</sup>. Cabe salientar que os óxidos de silício associados à celulose podem adsorver moléculas apolares ou moderadamente polares, como as aflatoxinas, ocratoxina A, deoxinivalenol, dentre outros contaminantes presentes como traços em matrizes alimentares<sup>10</sup>.

O emprego de métodos analíticos simples e confiáveis com possibilidade de empregar resíduos da agroindústria, como a casca do arroz, de forma diferenciada contribui duplamente para a preservação do meio ambiente; uma disponibilizando nova alternativa para emprego de resíduos com valor agregado, e outra diminuindo o custo das análises e a geração de descartes analíticos.

O método de extração por MSPD ainda é pouco usual para extração de micotoxinas de amostras com elevado teor de umidade, mas, considerando-se o seu fundamento, pode ser promissora para tal. Nela, o adsorvente promove uma melhor interação dos solventes extratores com o contaminante, uma vez que, durante a homogeneização da dispersão, ocorre a quebra das paredes celulares. Dessa forma, é possível a redução dos volumes de solvente para a recuperação do analito de interesse e a diminuição das quantidades iniciais de

amostras, além da eliminação de etapas de concentração dos extratos<sup>14-18</sup>.

A cebola (*Allium cepa* L.), por sua atividade de água elevada, condição de cultivo, armazenamento e distribuição, está entre os alimentos com risco de veicular contaminantes produzidos por fungos, que encontram condições de infectar e até produzir metabolitos secundários em circunstâncias adversas, como nesse tecido subterrâneo<sup>19</sup>. A importância econômica da cebola decorre de suas propriedades condimentares, antioxidantes e outros benefícios funcionais que conferem a essa hortaliça o terceiro lugar, depois do tomate e da batata, em consumo mundial<sup>2</sup>.

As diferentes espécies de fungos do gênero *Aspergillus* vêm sendo relacionadas com os defeitos em cebolas, porém, são poucas as informações sobre identificação das espécies contaminantes ou a ocorrência de micotoxinas nelas, especificamente as aflatoxinas, que são as mais prováveis de serem produzidas por espécies desse gênero fúngico nas condições de umidade, contaminação elevada e acidez do meio<sup>4,20</sup>.

As aflatoxinas são responsáveis por uma série de danos crônicos em animais e humanos, tais como a diminuição da velocidade de crescimento, depressão do sistema imunológico e efeito carcinogênico demonstrado<sup>21</sup>. Outro aspecto que justifica a necessidade de dispor de método rápido e confiável para determinar essas micotoxinas em cebolas é o seu emprego frequente em diversas formulações alimentícias domésticas e industriais<sup>2,19</sup>.

Avaliar a ocorrência de aflatoxinas em variedades de cebolas e relacionar sua ocorrência com variáveis bióticas e abióticas é um subsídio importante para o estabelecimento de estratégias de manejo adequado desse vegetal, visando torná-lo competitivo no mercado nacional e internacional, dispor de critérios classificatórios baseados em qualidade micotoxicológica, bem como garantir a segurança alimentar dos consumidores.

Neste trabalho foi estudada a extração simultânea das aflatoxinas (AFLA) B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> de cebolas empregando o método de dispersão da matriz em fase sólida (MSPD), tendo casca de arroz como adsorvente. A identificação e quantificação das micotoxinas foram realizadas empregando cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de fluorescência (CLAE-FL).

## MATERIAL E MÉTODOS

### Padrões de Micotoxinas

Os padrões das AFLA B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> foram adquiridos da Sigma Aldrich, Brasil. As soluções estoque foram preparadas dissolvendo 5 mg em 100 mL de uma mistura de benzeno:acetoneitrila p.a. (98:2). A partir dessas soluções estoque foram diluídas as soluções de trabalho contendo 1,5 µg.mL<sup>-1</sup>; 1,5 µg.mL<sup>-1</sup>; 7,4 µg.mL<sup>-1</sup> e 5,6 µg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente para AFLA B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e AFLA G<sub>2</sub>, confirmadas espectrofotometricamente, considerando suas respectivas absorvidades molar<sup>22</sup>.

### Preparo do Adsorvente

A casca de arroz, fornecida por uma empresa beneficiadora do grão localizada na região sul do Rio Grande do Sul, foi moída em moinho de facas, seguindo-se da separação das frações granulométricas. A fração de 0,5 mm foi lavada 3 vezes com hexano (proporção massa:solvente 1:4) sob agitação orbital em mesa agitadora a 160 rpm durante 30 min, a 25 °C. A mistura foi filtrada e o resíduo sólido foi novamente submetido a 3 lavagens consecutivas com metanol nas mesmas condições operacionais. O material lavado foi seco em estufa com circulação de ar a 105 °C até peso constante. A eficiência do tratamento foi avaliada pela limpeza do cromatograma resultante da eluição do extrato de casca com clorofórmio:metanol (3:27). A casca de arroz tratada foi caracterizada quanto aos seus teores de umidade, nitrogênio total, extrato etéreo, cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido clorídrico<sup>22</sup>.

### Amostras

Cebolas da variedade crioula, com e sem defeitos, foram coletadas no município de São José do Norte, no Rio Grande do Sul, em março de 2009, pelos técnicos da EMATER-RS, que realizaram a classificação segundo Regulamento Técnico de Qualidade da Cebola do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)<sup>23</sup>. Outras amostras foram coletadas em feiras e mercados da região sul do Rio Grande do Sul, empregando amostragem aleatória simples para tomada de 1 kg de cebola roxa nacional; roxa importada, branca nacional, branca importada, branca cultivar orgânico e amarela importada. No laboratório, as amostras foram classificadas conforme o regulamento técnico<sup>23</sup>, formando 11 grupos para análise: roxa nacional, calibres 2 e 3; roxa importada, calibres 2 e 4; branca nacional e

importada, calibres 2 e 4; roxa cultivar orgânico nacional, calibre 2; branca cultivar orgânico nacional, calibre 2; e amarela importada, calibres 2 e 4. As cebolas de cada grupo foram descascadas e homogeneizadas em moinho de facas, constituindo as amostras analíticas.

### Testes Preliminares da Extração MSPD

Aproximadamente 500 g de cebolas, calibre 2, sem defeito, foram descascadas e homogeneizadas em moinho de facas. Foram tomadas massas conhecidas do homogeneizado, colocadas em béquer de vidro e fortificadas com 100 µL de solução de AFLA G<sub>2</sub>, de forma a resultar em um nível de contaminação da ordem 10 µg.kg<sup>-1</sup>. As amostras fortificadas foram transferidas para um graal de porcelana e maceradas com o adsorvente, empregando pistilo até a total dispersão da matriz no adsorvente. A mistura homogeneizada foi transferida para uma coluna de vidro (12 cm de altura e 1 cm de diâmetro interno), compactada com auxílio de um bastão de vidro até preencher a marca de 10 mL na coluna.

Os efeitos das variáveis testadas para adequação da extração por MSPD foram:

- adsorventes: C18; alumina neutra; casca de arroz:alumina (1:1);
- proporção de amostra e adsorvente (p/p): 1:1; 1:3; 3:1;
- tempo de interação entre adsorvente e amostra: 1, 2, 3 h;
- eluentes: metanol; acetoneitrila; clorofórmio; clorofórmio:metanol (27:3) e (25:5)<sup>14,18</sup>;
- volumes do eluente: 25, 30, 35 mL.

Os eluatos foram coletados em frascos âmbar e o solvente evaporado sob nitrogênio. Para aplicação em placas cromatográficas, os resíduos secos foram ressuspensos em 500 µL de benzeno e homogeneizados em banho de ultrassom. Foram usadas cromatoplasas de nanosílica (ADAMANT, marca Macherey-Nagel, Alemanha, partículas médias 2-10 µm distribuídas em camada de 0,1 mm de espessura), em que foram aplicadas soluções padrão AFLA G<sub>2</sub>, de forma que em cada ponto correspondessem a 3, 5, 8, 10 ng da micotoxina. Os extratos ressuspensos em 500 µL de benzeno também foram aplicados.

O eluente da separação cromatográfica foi uma mistura de tolueno:acetato de etila:ácido fórmico (3:2:1)<sup>24</sup> que percorreu 10 cm no caminho cromatográfico. Em

seguida, as cromatoplasmas foram secas à temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C). A fluorescência dos padrões e amostras foi visualizada em câmara escura sob luz ultravioleta (326 nm). A estimativa dos valores de *R<sub>f</sub>* (distância percorrida pelo eluato/distância percorrida pelo soluto) e da intensidade de fluorescência comparada das amostras e padrões foi avaliada por três analistas treinados.

A eficiência das condições de extração aplicadas à determinação simultânea das AFLAs B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> foi indicada pela recuperação obtida a partir de uma amostra de cebola fortificada nos níveis 24, 20, 16 e 20 ng.kg<sup>-1</sup>, respectivamente, de cada micotoxina.

Após o estabelecimento das melhores condições de extração pelo método de MSPD, as AFLAs foram determinadas em CCDAE e em cromatógrafo líquido, marca Shimadzu, composto por bomba LC-AT, desgaseificador DGU, controlador CBM-20A, detector SPD-20A, injetor manual 7725i com alça de 20 µL, detector FL-10AXL e *software* LC Solution-Shimadzu (CLAE-FL). Acoplado estava uma coluna Ascentis Supelco C18 (15 cm x 4,6 mm e 3 µm). Para eluição foi empregada acetonitrila e metanol, grau cromatográfico, da marca J.T. Baker (Mallinckrodt, Phillipsburg, NJ, EUA), e a água ultrapura, adquirida do sistema Direct-Q UV3<sup>®</sup> (resistividade 18,2 MΩ cm, Millipore, EUA), foi acidificada com ácido acético (99:1). Os solventes, água ultrapura, metanol e acetonitrila foram eluídos na proporção de 60:28:12 (v/v/v) com vazão de 9 mL.min<sup>-1</sup><sup>25</sup>.

#### *Indicativos de Eficiência do Método*

O método adaptado foi avaliado quanto aos limites de detecção (LD), limites de quantificação (LQ), expressos em µg.kg<sup>-1</sup>, exatidão através dos ensaios de recuperação e precisão pelos coeficientes de variação estimados a partir do resultado de seis determinações para cada sistema cromatográfico<sup>26</sup>, ou seja, CCDAE e CLAE-FL nas condições previamente estabelecidas.

O efeito matriz foi avaliado para a técnica de CLAE-FL, comparando o sinal gerado pela injeção da solução padrão diluída no extrato da matriz e a área do sinal gerado pela injeção do padrão no eluente<sup>7</sup>.

#### *Aplicabilidade do Método*

O método validado foi empregado para determinar a ocorrência das AFLAs em 14 amostras de cebola, separadas pela variedade e classe (regulamento técnico), coletadas no comércio ou local de produção,

conforme descrito. As cebolas foram descascadas, cortadas e homogeneizadas em moinho de facas. As amostras analíticas foram pesadas em balança analítica (marca Gilbertini), 3,0 g de amostra e 3,0 g de adsorvente (casca de arroz:terra diatomácea; 1:1), seguindo-se de homogeneização em graal com auxílio de pistilo durante 5 min. A mistura foi transferida para uma coluna de vidro (1 cm de diâmetro interno e 12 cm de comprimento) e compactada de forma a preencher um volume de 10 mL (calibração da coluna), usando um êmbolo de vidro. As micotoxinas foram eluídas por gravidade à temperatura de 25 °C com 35 mL da mistura de clorofórmio:metanol (25:5). O eluato foi evaporado sob nitrogênio e o resíduo redissolvido com 500 µL de benzeno para determinação em CCDAE e 1 mL de acetonitrila para determinação em CLAE-FL, nas condições descritas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição percentual média e os coeficientes de variação de cada fração centesimal da casca de arroz empregada neste trabalho foram: umidade 12,1 (0,9); nitrogênio total 0,1 (0,01); extrato etéreo 1,0 (0,07); cinzas totais 19,3 (1,3); e cinzas insolúveis em HCl 9,4 (0,7).

O percentual de cinzas insolúveis em ácido indica a presença de óxidos de silício<sup>11-13</sup>, o que sugere que a casca é promissora para ser empregada como adsorvente na extração das aflatoxinas<sup>24,27,28</sup>. Os carboidratos (hemicelulose, celulose) e a lignina, estimados por diferença em 76%, correspondem aproximadamente aos valores mencionados por Graminha et al.<sup>12</sup>.

Estas características da casca de arroz, aliadas a sua abundância no Rio Grande do Sul, nortearam o interesse em aplicá-la para fins analíticos como adsorvente em métodos de extração tipo MSPD, beneficiando o meio ambiente, barateando o custo e a eficiência analítica para determinação de traços em amostras com elevado teor de umidade. No caso específico da determinação de micotoxinas, a extração por partição convencional gera um volume elevado de resíduos de solvente para descarte, além da necessidade de evaporação destes nas etapas de concentração, justificando a importância de um procedimento de extração que evite esses volumes<sup>17-18</sup>.

### Testes Preliminares

Nesta etapa de avaliação do potencial de emprego da casca de arroz tratada como adsorvente foi escolhida a

AFLA G<sub>2</sub> como modelo para estudo, determinando a sua recuperação, a cada tratamento, através de CCDAE. Essa técnica cromatográfica tem mostrado bons resultados na rotina de laboratório<sup>25</sup>, além de ser sensível, econômica, permitir determinação simultânea de várias amostras e gerar menores volumes de resíduos de solventes para descarte, uma das ênfases neste trabalho<sup>3,4</sup>. A AFLA G<sub>2</sub> é a micotoxina que apresenta os maiores limites de detecção no grupo e também a menos tóxica para manuseio pelos analistas<sup>3</sup>.

Para evitar a compactação do adsorvente durante a eluição, a casca de arroz foi homogeneizada com terra diatomácea na proporção 1:1 (p/p)<sup>27</sup>. Os valores da recuperação da AFLA G<sub>2</sub> sob o efeito dos adsorventes e eluentes e suas proporções nos testes preliminares estão na Tabela 1.

**Tabela 1.** Recuperação de AFLA G<sub>2</sub> nos testes preliminares de extração

Adsorvente (2 g)	Solvente (25 mL)	AFG <sub>2</sub> (%)
*CAT/celite (1/1)	Metanol	60
*CAT/celite (1/1)	Clorofórmio	70
*CAT/celite (1/1)	Acetonitrila	50
Alumina neutra	Metanol	30
Alumina neutra	Clorofórmio	40
Alumina neutra	Acetonitrila	-
C18	Metanol	50
C18	Clorofórmio	40

\*CAT: casca de arroz tratada.

Os eluentes metanol e clorofórmio, separadamente, mostraram boa capacidade para desorver a AFLA G<sub>2</sub> da casca de arroz, atingindo níveis de recuperação entre 60 e 70%, respectivamente. Nos demais adsorventes testados, as recuperações obtidas para a micotoxina, empregando os mesmos solventes, foi inferior a 50%, o que motivou também o emprego desse adsorvente.

Na sequência, foi testada a eficiência da mistura casca de arroz:terra diatomácea para determinação simultânea das quatro AFLAs, tendo como eluente a mistura clorofórmio e metanol nas proporções recomendadas por Soares e Rodriguez-Amaya<sup>23</sup>, que obtiveram recuperações superiores a 80% durante a determinação dessas micotoxinas de matrizes complexas.

Os valores de recuperação média das quatro micotoxinas foram 67% (CV:5) para a AFLAB<sub>1</sub>; 80% (CV:7) para a AFLAB<sub>2</sub> e G<sub>1</sub>; 76% (CV:10) para a AFLAG<sub>2</sub>, com variabilidade média de 7%. A mistura

de clorofórmio:metanol (5:25) elevou a recuperação da AFLA B<sub>1</sub> para a faixa de 75% e das demais para 85%. O tempo de interação amostra-adsorvente não afetou os níveis das micotoxinas extraídas por dispersão da matriz em fase sólida antes da eluição, conforme já relatado por outros autores<sup>14</sup>.

Os cromatogramas obtidos em CCDAE eram limpos, sem a presença de manchas que dificultassem a visualização das micotoxinas nos seus respectivos R<sub>f</sub>, onde os pontos não apresentavam sinais de efeito Langmuir ou anti-Langmuir. Fatos que demonstram que a extração pelo método de MSPD, tendo casca de arroz:terra diatomácea (1:1) como adsorvente e clorofórmio:metanol (5:25) como eluente, pode ser adotado para determinação dos contaminantes por CCDAE e também em CLAE-FL. Os efeitos das condições testadas foram avaliados em termos de percentuais de recuperação comparados entre as condições testadas. O aumento do volume de eluente de 25 para 30 mL promoveu um aumento médio de 10% na recuperação das AFLAs, porém o aumento de 30 para 35 mL promoveu aumento de apenas 1,2%. Foi adotado o volume de 35 mL para eluição das micotoxinas do adsorvente para garantir a eluição completa dos analitos.

### Indicativos de Mérito do Método Adaptado para Extração de AFLAs em MSPD

Estabelecidas as condições de extração em MSPD e as cromatográficas para separação e detecção das micotoxinas, o método desenvolvido foi validado através dos indicativos de eficiência recomendados por Ribani et al.<sup>26</sup> e pela RE n° 889 da ANVISA<sup>29</sup> para a identificação e quantificação das AFLAs nos extratos por CCDAE e CLAE-FL. Cabe salientar que as condições cromatográficas para separação das micotoxinas foram previamente estabelecidas empregando misturas de padrões para serem separadas em CCDAE-UV e CLAE-FL. Na Tabela 2, estão os dados referentes à eficiência do método proposto empregando determinação das AFLAs pelas diferentes técnicas cromatográficas.

Os indicativos de eficiência encontrados para CCDAE mostram que o método de extração por MSPD com adsorvente casca de arroz propicia condições para determinação simultânea de AFLAs de forma confiável e dentro de limites aceitáveis, mesmo empregando cromatografia planar. Os limites detectados das micotoxinas neste método possibilitam monitorá-las

**Tabela 2.** Indicativos de eficiência do método padronizado

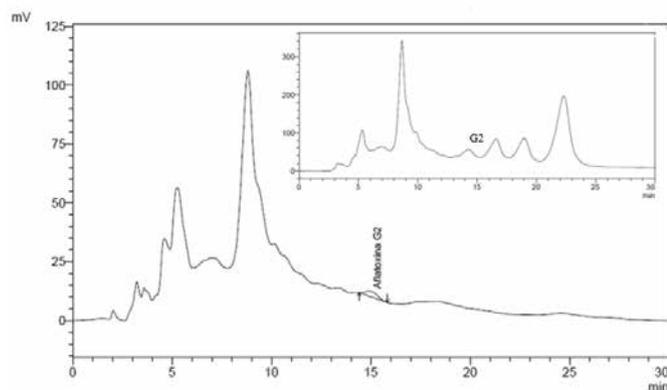
Micotoxina/propriedades	AFLA B <sub>1</sub>		AFLA B <sub>2</sub>		AFLA G <sub>1</sub>		AFLA G <sub>2</sub>	
	HPTLC	HPLC	HPTLC	HPLC	HPTLC	HPLC	HPTLC	HPLC
Rf e T. retenção (min)	0,3	17,1	0,25	13,40	0,22	11,25	0,18	8,9
L. Detecção (µg.kg <sup>-1</sup> )	1,0	0,08	3,30	0,1	1	0,08	3	0,05
L. Quantificação (µg.kg <sup>-1</sup> )	3,0	0,26	9	0,3	3	0,3	9	0,2
Recuperação média (%)	78,0	78,0	88,3	93,0	88,5	88,0	88,7	81,0
CV (%)	11,8	13,5	12,3	12,0	12,5	14,0	11,0	12,5

T: tempo; CV: coeficiente de variação; L: limite.

dentro dos níveis da legislação vigente, mesmo não sendo esta específica para cebolas<sup>29</sup>.

A cromatografia CLAE-FL é a técnica atualmente mais empregada para quantificar micotoxinas simultaneamente, e em especial no caso das AFLAs, pelas suas propriedades características em separação cromatográfica com emprego de colunas de fase reversa, que propiciam os melhores coeficientes de separação para essas micotoxinas<sup>28,30</sup>.

A eficiência dos procedimentos completos confirmaram a eficiência da extração de AFLAs de amostras de cebolas empregando o método de MSPD proposto, pois indicam que os extratos estavam adequados para separação e quantificação em qualquer sistema cromatográfico com detector de fluorescência (Figura 1)<sup>14,17,28,30,31</sup>.



**Figura 1.** Cromatograma de amostra de cebola contaminada e padrão de micotoxinas

O efeito de matriz para o método MSPD, com casca de arroz, estimado para as concentrações médias dos padrões de AFLAs foi maior para a AFLA G<sub>2</sub> (Tabela 3), pois as áreas detectadas no solvente e no extrato da matriz apresentaram a maior diferença entre si, porém, ainda assim, confiável para a determinação desta<sup>7</sup>.

Alguns autores empregaram esse método de extração tendo alumina neutra como adsorvente,

acetoneitrila como eluente de extratos de produtos agrícolas contaminados com AFLAs, com alto teor de pigmentos, como a pimenta em pó, feijão verde e gergelim, que resultaram em recuperações variando entre 88 e 95%, desvio padrão inferior a 6%, limites de detecção 0,25 e 0,1 µg.kg<sup>-1</sup>, respectivamente, para as AFLAs B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> e G<sub>2</sub><sup>16</sup>. As AFLAs em cereais, frutas secas, ervas, especiarias, legumes, amendoim e nozes extraídas por MSPD, tendo C18 como adsorvente, resultaram em recuperações entre 78 e 86%, coeficiente de variação entre 4% e 7% e limites de quantificação variando entre 0,125 a 2,5 µg.kg<sup>-1</sup><sup>14,15</sup>. Apesar desses resultados promissores verificados com diferentes adsorventes, o método de MSPD não vem sendo aplicado para amostras com elevado teor de umidade, como a cebola.

**Tabela 3.** Efeito de Matriz nas determinações de aflatoxinas extraídas em MSPD

Micotoxinas	Conc. Média µg.mL <sup>-1</sup>	Área na Matriz	Área no Solvente	Efeito de matriz (%)
AFLA B <sub>1</sub>	0,024	276.851	308.769	90
AFLA B <sub>2</sub>	0,014	39.777	43.589	93
AFLA G <sub>1</sub>	0,024	224.346	221.140	101
AFLA G <sub>2</sub>	0,04	51.477	64.053	80

Também não foram encontrados relatos sobre emprego de casca de arroz como adsorvente para o método de MSPD aplicado para determinação de micotoxinas, porém, os indicativos de mérito do método adaptado neste trabalho foram semelhantes aos encontrados com os adsorventes convencionais empregados para outras matrizes e teores de umidade inferiores aos das cebolas.

### Aplicabilidade do Método

O método validado foi adotado para determinar a ocorrência de AFLAs em amostras de cebola nacional e importada, classificadas conforme a portaria 529 do MAPA<sup>23</sup>.

Embora danos ocasionados por contaminação fúngica sejam frequentes em cebolas<sup>19</sup>, não foram

encontrados dados sobre a ocorrência das micotoxinas em cebolas no Brasil. Condições de umidade relativa superior a 80% favorecem a brotação e o desenvolvimento de podridão ocasionada por fungos do gênero *Aspergillus*<sup>23</sup>. A irrigação e armazenamento inadequados também são fatores desencadeadores de brotamento e podridão fúngica<sup>2,23</sup>, portanto, o risco de ocorrência de AFLAs é provável em regiões úmidas ou com temperaturas médias superiores a 25 °C, visto que outras espécies fúngicas podem hospedar-se no material. Este é o caso das condições de cultivo e armazenamento das amostras deste trabalho, em que a ocorrência de espécies toxigênicas do gênero *Aspergillus* é provável<sup>21</sup>.

Ficou demonstrado que o método desenvolvido permite quantificar AFLAs em cebolas de diferentes tipos e classes, ou seja, é robusto para todas as variedades de cebolas avaliadas. A contaminação foi verificada com pelo menos uma das micotoxinas em 43% das amostras, o que pode ser considerado um valor elevado e sugere a necessidade de estabelecimento de um plano de amostragem para identificar os pontos críticos de risco desse vegetal a contaminação micotoxicológica.

A amostra analítica composta por cebolas da variedade crioula com defeito da mancha negra estavam contaminadas com as AFLAB<sub>2</sub> (90 µg.kg<sup>-1</sup>), G<sub>1</sub> (82 µg.kg<sup>-1</sup>) e G<sub>2</sub> (17 µg.kg<sup>-1</sup>) simultaneamente. Nas amostras de cebolas da variedade roxa, das classes de calibre 2 e 3, foram também detectada a presença de AFLAG<sub>2</sub> (15 e 8,5 µg.kg<sup>-1</sup>), ao passo que na variedade branca nacional, calibre 2, foi detectada contaminação simultânea com AFLAG<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> (84 e 16 µg.kg<sup>-1</sup>, respectivamente). Quanto às amostras importadas, uma da variedade branca, calibre 4, apresentou contaminação com AFLA G<sub>1</sub> (30,5 µg.kg<sup>-1</sup>). À exceção das primeiras, todas apresentavam aparência aceitável e sem defeitos aparentes.

Estes resultados chamam a atenção, pois amostras com características tão distintas estavam contaminadas. No entanto, não foi detectada, dentro dos limites do método, a AFLAB<sub>1</sub> em nenhuma das amostras, nem mesmo naquelas que apresentavam podridão fúngica característica (mancha negra). Esse defeito é atribuído principalmente à presença de *Aspergillus niger*, que não é considerado produtor de aflatoxinas<sup>23</sup>, embora possam ocorrer simultaneamente outras espécies do gênero que podem ser toxigênicas.

A AFLAG<sub>2</sub> foi detectada em cinco amostras em coocorrência, em lotes em que não foram observados defeitos fúngicos aparentes. O maior nível encontrado foi

para a aflatoxina G<sub>1</sub> (84µg.kg<sup>-1</sup>). Se observada a legislação brasileira (RE nº 7/2011)<sup>32</sup> quanto aos limites das AFLAs em outros alimentos, as amostras de cebola contaminadas teriam que ser descartadas por estarem impróprias para comercialização e uso. Mesmo não sendo observados os defeitos previstos como inaceitáveis pela portaria do MAPA<sup>23</sup>, em vigência para definir a qualidade de cebolas.

A contaminação de cebolas, na frequência e níveis detectados, adquire importância quando se considera que, mesmo não sendo um alimento de base nutricional, o consumo estimado per capita é de 7,2 kg.ano<sup>-1</sup>, sempre associado a outros materiais de risco como arroz e trigo<sup>23</sup>, o que pode representar um problema para a saúde humana. A ação farmacológica atribuída às cebolas é outro fator que pode motivar seu consumo acima da estimativa por alguns segmentos da população, na busca de soluções para problemas patológicos crônicos, justamente para quem a contaminação pode representar um impacto ainda maior.

## CONCLUSÃO

O método de MSPD tendo casca de arroz como adsorvente foi eficiente para extrair simultaneamente as aflatoxinas de cebolas, resultando em extratos aplicáveis a CCDAE e CLAE-FL. Os indicativos de eficiência do método atendem as recomendações de órgãos reguladores, sendo as recuperações superiores a 70%, coeficientes de variação inferiores a 15% e limites de quantificação que permitem observar diferentes legislações vigentes atualmente para estas micotoxinas.

A ocorrência de aflatoxinas em cebolas com diferentes características de tamanho, procedência e qualidade mostrou que elas também precisam ser monitoradas, pois, os níveis detectados foram superiores aos aceitáveis para comercialização e consumo com segurança.

## REFERÊNCIAS

1. Pinho PG. Análise de resíduos de agrotóxicos em tomates empregando dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) e cromatografia gasosa. *Quim Nova*. 2009;32:92-8.
2. Rodrigues SA, Caldas SS, Primel EG. A simple; efficient and environmentally friendly method for the extraction of pesticides from onion by matrix solid-phase dispersion with liquid chromatography-tandem mass spectrometric detection. *Anal Chim Acta*. 2010;678:82-9.
3. Yoshisawa T. Mycotoxin Analysis for Federative republic of Brazil. Japão: Training Course; 2001. 283p.

4. Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16(3):497-516.
5. Richard JJ. Some major mycotoxins and their mycotoxicose-Na overview. *Int J Food Microbiol*. 2007;119:3-10.
6. Lanças FM. *Extração em Fase Sólida (SPE)*. São Carlos: RiMa; 2004. 96p.
7. Krueve A, Künnapas A, Herodes K, Leito I. Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2008;1187:58-66.
8. Laganá A, Capriotti AL, Cavaliere P, Gubbiotti RS. Recent developments in matrix solid-phase dispersion extraction. *J Chromatogr A*. 2010;1217:2521-32.
9. Mayer DF, Hoffmann R, Ruppenthal JE. Gestão energética, econômica e ambiental do resíduo casca de arroz em pequenas e médias agroindústrias de arroz. In: *Simpósio de Engenharia de Produção da UNESP, 13, Anais eletrônicos*; Bauru, SP. Bauru: Unesp, 2006. [acesso 2010 nov. 10]. Disponível em: [http://www.simpep.feb.unesp.br/anais/anais\_13/artigos/124.pdf].
10. Foletto EL, Hoffmann R, Hoffmann RS, Portugal Jr. UL, Jahn SL. Aplicabilidade das cinzas da casca de arroz. *Quim Nova*. 2005;28(6):1190-8.
11. Hotza D, Della PV, Oliveira NPA, Junkes AJ. Estudo comparativo entre sílica obtida por lixívia ácida da casca de arroz e sílica obtida por tratamento térmico da cinza de casca de arroz. *Quim Nova*. 2006;29:1175-9.
12. Graminha EBN, Gonçalves AZL, Pirota RDPBP, Balsalobre MAA, da Silva R, Gomes E. Enzyme production by solid-state fermentation: application to animal nutrition: a Review. *Anim Feed Sci Technol*. 2008;144:1-22.
13. Rosa GC, Wallau MW, Nunes R. Caracterização de cinzas de cascas de arroz e seu uso como adsorvente de metais pesados. In: *XVII Encontro de Química da Região Sul (17-SBQsul)*; 18-20 nov 2009; Rio Grande, RS. FURG, 2009.
14. Blesa J, Soriano JM, Moltó JC, Marín R, Mañes J. Determination of aflatoxins in peanuts by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2003;1011:49-54.
15. Blesa J, Soriano JM, Moltó JC, Marín R, Mañes J. Limited survey for the presence of aflatoxins in foods from local markets and supermarkets in Valencia, Spain. *Food Addit Contam*. 2004;21:165-71.
16. You-Zhao H, Yan-Yun H, Ping Z, Zhao-Xiang Z. Determination of aflatoxins in high-pigment content samples by matrix solid-phase dispersion and high-performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem*. 2006;54:4126-30.
17. Laganá A, Bacaloni A, Cavaliere C, Cucci PF, Samperi R. Determination of aflatoxins in hazelnuts by various sample preparation methods and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2008;1179:182-9.
18. Rubert J, Soler C, Mañes J. Optimization of Matrix Solid-Phase Dispersion method for simultaneous extraction of aflatoxins and OTA in cereals and its application to commercial samples. *Talanta*. 2010;82:567-74.
19. Overy DP, Frisvad JC, Steinmeier U, Thrane U. Clarification of the agents causing blue mold storage rot upon various flower and vegetable bulbs: implications for mycotoxin contamination. *Postharv Biol Technol*. 2005;35(2):217-21.
20. CAST. Council of Agricultural Science and Technology. Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems. Task Force Report, n. 139. EUA: CAST; 2003.
21. Bemvenuti RH, Mendes GL, Scaglioni PT, Furlong EB, Souza-Soares LA. Biochemistry and metabolism of mycotoxins: a review. *African J Food Sci*. 2012;5:861-9.
22. AOAC. Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis of International* [CD-ROM]. 17. ed. 2000.
23. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA. Sistema de Produção de Cebola (*Allium cepa* L). [acesso 2011 jan 15]. Disponível em: [http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/cebola/autores.htm].
24. Soares LMV, Rodriguez-Amaya D. Survey of Aflatoxins, Ochratoxin A, Zearalenone, and Sterigmatocystin in some brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. *J Assoc Off Anal Chem*. 1989;72(1):22-6.
25. Dors GC, Pinto RH, Furlong EB. Parboiled rice: occurrence of mycotoxin and chemical composition. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2009;29:121-30.
26. Ribani M, Beatriz C, Bottoli G, Collins CH, Jardim ICSF, Melo LFC. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim Nova*. 2004;27:771-80.
27. Furlong EB, Soares LMV. Tricothecenes in wheat: a gas chromatographic method for quantitation and confirmation in wheat of deoxynivalenol, nivelenol, diacetoxycyperpenol, T2, HT2 toxins, T2 triol and T2 Tetraol. *J AOAC Int*. 1995;78:386-96.
28. Subrahmanyam S, Turner NW, Piletsky SA. Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. *Anal Chim Acta*. 2009;632:168-80.
29. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RE nº 899, 2003. Aprova “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília (DF)*, 29 maio 2003.
30. Jaimez J. Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. *J Chromatogr A*. 2000;882:1-10.
31. Laganá A, Cavaliere C, Foglia P, Guarino C, Nazzari M, Samperi R. Determination of aflatoxins in olive oil by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta*. 2007;596:141-8.
32. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RE nº 7, 2011. Aprova “Limites Máximos Tolerados para Micotoxinas”. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília (DF)*, 22 jan 2011; Seção 1(37-E):72-3.

# Fungos toxigênicos em camarões marinhos cultivados e potenciais toxigênicos das cepas isoladas de *Aspergillus* seção *Flavi* e seção *Nigri*

## Toxigenic fungi in cultivated marine shrimp and the toxigenic potential of *Aspergillus* sections *Flavi* and *Nigri* strains

RIALA6/1515

Rodrigo Maciel CALVET\*, Maria Marlúcia Gomes PEREIRA, Amilton Paulo Raposo COSTA, Regina Célia de Jesus FIALHO, Maria Christina Sanches MURATORI

\*Endereço para correspondência: Núcleo de Estudos, Pesquisa e Processamento de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela, CEP: 64049-550, Teresina, PI, Brasil.

Tel./Fax: (86) 3215-5754. E-mail: rodrigocalvet@hotmail.com

Recebido: 23.11.2011 – Aceito para publicação: 18.12.2012

### RESUMO

O objetivo do presente estudo foi quantificar, isolar e identificar a microbiota toxigênica em camarões marinhos cultivados no litoral do Piauí. Foram selecionadas, randomicamente, quatro propriedades (“A”, “B”, “C” e “D”), de onde foram coletadas 84 amostras de camarão de três fases de cultivo: “I”, “II” e “III”. A contagem de fungos foi realizada em ágar dicloran rosa de bengala cloranfenicol. As colônias isoladas de *Aspergillus* e *Penicillium* spp foram transferidas para tubos contendo ágar extrato de malte. As contagens de fungos nas amostras de camarões coletadas variaram de 1,85 a 2,73 UFC/g log<sub>10</sub> e não diferiram entre si em todas as fases de cultivo. Foram isoladas 64 cepas de fungos, e os gêneros mais prevalentes foram *Aspergillus* (34,4%) e *Penicillium* (25,0%). Foram identificadas dezoito cepas do gênero *Aspergillus*. Duas cepas de *A. ochraceus* e cinco cepas de *A. niger* foram produtoras de ocratoxina A. Uma cepa de *A. flavus* produziu aflatoxina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>, respectivamente, nas concentrações de 14,8 ng/g, 4,3 ng/g, 2,6 ng/g e 1,1 ng/g, e foi classificada como *A. flavus* atípico. Os camarões cultivados no litoral piauiense, quando recentemente capturados, apresentaram baixas contagens fúngicas em todas as fases de cultivo.

**Palavras-chave.** *Litopenaeus vannamei*, fungos toxigênicos, *Aspergillus*, carcinicultura, micotoxinas.

### ABSTRACT

The aim of this study was to isolate and to identify the toxigenic mycobiota in marine shrimp raised in Piauí coast. Four farms were randomly selected (“A”, “B”, “C” and “D”), from whence eighty-four shrimp samples of three farming stages “I”, “II” and “III” were collected. The fungi count was done on dichloran rose bengal chloramphenicol agar. The isolated *Aspergillus* and *Penicillium* spp colonies were transferred into tubes containing malt extract agar. The fungi counts in shrimps samples ranged from 1.85 to 2.73 CFU/g log<sub>10</sub>, and they did not differ between them at all of the cultivation stages. Sixty-four fungi strains were isolated; and *Aspergillus* (34.4%) and *Penicillium* (25.0%) genus were mostly prevalent. Eighteen strains of *Aspergillus* genus were identified. Two *A. ochraceus* strains and five strains of *A. niger* aggregate were ochratoxin A producers. One *A. flavus* strain produced aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> in concentrations of 14.8 ng/g, 4.3 ng/g, 2.6 ng/g and 1.1 ng/g, respectively, and it was classified as atypical *A. flavus*. When freshly captured, the shrimps raised in Piauí coast showed low fungal counts at all of the cultivation stages.

**Keywords.** *Litopenaeus vannamei*, toxigenic fungi, *Aspergillus*, shrimp culture, mycotoxins.

## INTRODUÇÃO

O Brasil produziu 80.000 toneladas de camarão em 2010, dos quais 78.399 toneladas foram absorvidas pelo mercado interno<sup>1</sup>. O Piauí foi um dos estados que contribuiu para essa produção e, em 2006, garantiu o oitavo lugar no ranking nacional em produtividade. A carcinicultura marinha foi introduzida no Piauí na década de 1980 e somente a partir da década de 1990, o *Litopenaeus vannamei* foi introduzido na região, tornando-se um marco para a carcinicultura piauiense<sup>2</sup>.

Entretanto, contaminações bacterianas, virais e fúngicas podem comprometer o desenvolvimento do setor, afetando diretamente a qualidade do produto final. Fungos são amplamente distribuídos na natureza e por esse motivo podem ser usados como parâmetro na avaliação microbiológica, determinando as condições higiênicas do ambiente de cultivo e do camarão cultivado, pois são utilizados como indicadores da qualidade higiênica<sup>3</sup>.

A pesquisa de fungos em alimentos é importante, pois algumas espécies são capazes de produzir micotoxinas e/ou causar deterioração<sup>4</sup>. No entanto, a RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, não estabelece valores para a quantificação desses micro-organismos em camarões, ou para a maioria dos alimentos de origem animal processados<sup>5</sup>. Desse modo, as contagens fúngicas não são mais realizadas como rotina para a avaliação da qualidade de alimentos, especialmente em produtos de origem animal. Desta forma, produtos que apresentem uma contagem fúngica significativa podem ser comercializados, mesmo comprometendo a saúde do consumidor pela possível presença de micotoxinas produzidas por fungos contaminantes do alimento, caso os fatores como temperatura e umidade não sejam controlados<sup>6,7</sup>.

As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos, com baixo peso molecular, que possuem efeitos carcinogênicos, teratogênicos e imunossupressores, podendo causar convulsões, alucinações e hemorragias nos animais e seres humanos que consomem alimentos contaminados. Os gêneros de maior importância, por serem produtores desses metabólitos, são *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*<sup>6-9</sup>.

Reis et al.<sup>10</sup> obtiveram contagens de fungos filamentosos e leveduras em camarões frescos de água doce comercializados *in natura* sem gelo que variaram de 5,11 a 7,68 UFC/g. Eles justificaram esses resultados devido às variações de temperatura características das

regiões tropicais e subtropicais e também à contaminação da água.

Lin e Dianese<sup>11</sup> desenvolveram método para identificação de fungos micotoxígenos, que utiliza o ágar leite de coco, e baseia-se na produção de fluorescência azul-violeta e de pigmentação específica no meio de cultura quando a micotoxina está presente.

Yousefi et al.<sup>12</sup> isolaram *Aspergillus flavus* em camarões tigre verdes (*Penaeus semisulcatus*) e verificaram que duas cepas produziram fluorescência no ágar coco sob luz ultravioleta. Posteriormente, a capacidade toxigênica destes isolados foi confirmada por cromatografia líquida de alta eficiência<sup>12</sup>, apesar dos vários métodos utilizados para a detecção de fungos toxígenos que se baseiam na produção de micotoxina em extrato sólido ou líquido, extração da toxina com solventes orgânicos, purificação, concentração e detecção por cromatografia de camada delgada<sup>13</sup>.

Aflatoxinas são produzidas por cepas de *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*, que muitas vezes podem crescer em alimentos armazenados; estudos filogenéticos de *A. flavus* mostraram que eles se dividem em dois subgrupos. A linhagem "S" produz altos níveis de aflatoxinas, apresenta numerosos esclerócios pequenos, com média inferior a 400 µm de diâmetro, isolados e denominados como atípicos e também chamado var *A. flavus parvisclerotigenus*<sup>14</sup>.

A linhagem "L" produz menos esclerócios com tamanho maior que 400 µm de diâmetro e apresenta baixa produção de aflatoxina<sup>15,16</sup>. A maioria das cepas do grupo I produz aflatoxina B, e a maioria das cepas do grupo II produz tanto aflatoxina B como aflatoxina G<sup>17-19</sup>.

A carcinicultura é uma atividade em expansão no litoral piauiense e os camarões produzidos são congelados para distribuição no mercado interno e externo, para serem consumidos das mais diversas formas, inclusive crus e, portanto, as condições higiênicas e sanitárias devem ser avaliadas para verificar a segurança do produto final ao consumidor. Sendo assim, objetivou-se quantificar, isolar e identificar a microbiota toxigênica de camarões marinhos cultivados no litoral do Piauí, bem como avaliar o potencial toxigênico das cepas isoladas de *Aspergillus* seção *Flavi* e seção *Nigri*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras

Foram selecionadas, randomicamente, quatro das catorze propriedades carcinicultoras existentes no litoral

do Piauí (região delimitada entre 2° 55' 51,39"S – 2° 58' 04,31"S a 41° 20' 09,35"O – 41° 26' 33,52"O), identificadas para fins de pesquisa como "A", "B", "C" e "D", onde foram coletadas amostras de camarão das três fases de cultivo: "I" (pós-larva<sub>8</sub> – PL<sub>8</sub> a PL<sub>18</sub>), "II" (PL<sub>18</sub> a 90 dias) e "III" (90 a 120 dias), em delineamento fatorial 4x3 (quatro propriedades e três fases) representado por três amostras de 100 g de camarão, totalizando 84 amostras.

Após as coletas, as amostras foram armazenadas em sacos plásticos esterilizados Nasco Whirl-Pak<sup>®</sup> lacrados, identificados e transportados em recipientes isotérmicos contendo gelo reciclável até o Laboratório de Controle Microbiológico de Alimentos do Núcleo de Estudos, Pesquisa e Processamentos de Alimentos da Universidade Federal do Piauí.

#### Determinação da microbiota e identificação de espécies de *Aspergillus*

A contagem total de fungos foi realizada em ágar dicloran rosa bengala com cloranfenicol, de acordo com a metodologia recomendada por Pitt e Hocking<sup>9</sup> para estimar microbiota total. A enumeração foi realizada através do método de dispersão em superfície: 25 g de cada amostra foram homogeneizados em 225 mL de água peptonada a 0,1%, por 30 min, em um agitador orbital. Foram realizadas diluições seriadas (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-3</sup>) e retiradas alíquotas de 0,1 mL inoculadas em duplicata. As placas foram incubadas a 25 °C por cinco a sete dias. Após esse período, foram selecionadas placas contendo entre 10 a 100 UFC, conforme recomenda Dalcerro et al.<sup>20</sup>. Os resultados foram expressos em UFC/g de amostra. As colônias de *Aspergillus* e *Penicillium* spp foram transferidas para tubos contendo ágar extrato de malte (MEA). A identificação de espécies de *Aspergillus* foi realizada de acordo com as chaves taxonômicas de Klich<sup>21</sup>, conforme segue: preparou-se uma suspensão de conídios a partir de cada cepa em 0,5 mL de meio constituído de 0,2% de ágar-ágar e 0,05% de Tween 80TM, distribuídos em tubo de hemólise previamente esterilizado a 121 °C por 15 minutos<sup>9</sup>. A seguir, introduziu-se a agulha de platina na suspensão de conídios, transferindo-os para três pontos equidistantes nas placas contendo Czapek Yeast Extract Agar (CYA), Malt Extract Agar (MEA) e Czapek Yeast Extract Agar 20% Sucrose (CY20S). Uma placa de CYA, MEA e CY20S foi incubada a 25 °C, e uma placa de CYA a 37 °C, todas por um período de sete dias. Após a incubação, visando à identificação das espécies, foram observadas as estruturas micromorfológicas e as

características macroscópicas das colônias (diâmetro, textura, forma, aspecto da superfície e do reverso, pigmentação dos conídios e pigmento solúvel, produção e cor de exsudato).

#### Capacidade toxígena de *Aspergillus*

*Potencial toxígeno dos Aspergillus da seção Flavi e da seção Nigri em Ágar Coco*

O potencial toxigênico dos *Aspergillus* isolados foi avaliado pela inoculação em ágar leite de coco e incubação por sete dias a 25 °C. Posteriormente, verificou-se a pigmentação produzida pelo fungo no meio de cultura e a fluorescência através de um cromatovisor com luz ultravioleta (UV) de 366 nm. A fluorescência característica da produção de micotoxina foi expressa com o símbolo (+) para positividade e (-) para negatividade<sup>11</sup>.

#### *Produção de aflatoxinas por Aspergillus da seção Flavi*

Foi realizado um pré-teste utilizando uma cepa de *A. parasiticus* (NRRL 2999) para avaliar sua capacidade toxígena, sendo que essa cepa produziu 0,5 µg de aflatoxina B<sub>1</sub> por mL. Em seguida, todas as cepas de *Aspergillus* da seção *Flavi* isoladas foram testadas para produção de aflatoxina B<sub>1</sub>, seguindo metodologia recomendada por Geisen et al.<sup>22</sup>, conforme segue: as cepas foram cultivadas em placas de MEA a 28 °C por sete dias. Após o período de incubação, o micélio foi transferido para um microtubo e acrescido de 1.000 µL de clorofórmio. A mistura foi agitada em microcentrífuga por 10 min a 1.400 rpm; o micélio foi removido e o extrato clorofórmico evaporado sob fluxo de N<sub>2</sub>. O resíduo foi redissolvido em 200 µL de clorofórmio. A detecção e quantificação de aflatoxina B<sub>1</sub> dos extratos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando um cromatógrafo Shimadzu<sup>®</sup>, modelo Prominence, com detector de fluorescência modelo RF-10AXL SUPER, de acordo com a metodologia proposta por Trucksess et al.<sup>23</sup>. Uma alíquota de 200 µL do extrato da amostra foi derivatizada com 700 µL de ácido trifluoroacético:ácido acético:água (20:10:70, v/v/v). As separações cromatográficas foram realizadas em uma coluna de fase reversa (de sílica gel, 150 x 4,6 mm id., 5,0 µm de tamanho de partículas, Varian, Inc., Palo Alto, EUA). A fase móvel utilizada foi acetonitrila, metanol e água (17:17:66 v/v/v) a uma vazão de 1,5 mL.min<sup>-1</sup>. A fluorescência de derivados de aflatoxina foi gravada em comprimentos de onda de excitação e emissão de

360 nm e 460 nm, respectivamente. A curva padrão foi construída em diferentes níveis de padrão de AFB<sub>1</sub>, de 1,01 ng/mL, 2,02 ng/mL e 4,04 ng/mL (Sigma Aldrich<sup>®</sup> Co., St. Louis, MO USA, pureza > 99%). A toxina foi quantificada pela correlação das alturas dos picos do extrato da amostra com o da curva padrão ( $y = 0,0003x - 0,0077$ ;  $R^2 = 0,99$ ). O limite de detecção do método analítico foi de 0,4 ng/g, com base na relação do sinal-ruído (3:1) e o limite de quantificação foi estabelecido como sendo 3 vezes o limite de detecção (1,4 ng/g).

#### Produção de ocratoxina A por *Aspergillus* da seção *Nigri*

Todas as cepas de *Aspergillus* da seção *Nigri* isoladas foram testadas para verificar a capacidade de produção de ocratoxina A (OTA), determinada seguindo a metodologia descrita por Bragulat et al.<sup>24</sup>: as cepas foram cultivadas em CYA a 28 °C por sete dias. Três fragmentos do ágar foram retirados da área central da colônia, pesados e transferidos para um microtubo, acrescido de 1.000 µL de metanol. A amostra foi agitada em microcentrífuga por 10 min a 1.400 rpm, o sobrenadante filtrado e evaporado até a secura sob N<sub>2</sub>. O resíduo foi redissolvido em 1.000 µL de metanol. Os extratos foram analisados por cromatografia em camada delgada, conforme metodologia da AOAC Official Method 973.37 (Nesheim et al.<sup>25</sup>). A cromatografia foi desenvolvida em uma cuba contendo como solvente de corrida uma solução de tolueno:metanol:ácido acético (90:5:5). Posteriormente, foram observados sob luz UV (365 nm), determinando somente a positividade ou negatividade<sup>11</sup> para OTA por comparação visual com um padrão de concentração conhecida (Sigma Aldrich<sup>®</sup> Co., St. Louis, MO USA, pureza > 99%). Para a confirmação da presença de OTA utilizou-se uma solução alcoólica de bicarbonato de sódio, borrifada sobre a mancha. O limite de detecção foi de 0,5 µg/kg.

#### Análise Estatística

Os resultados foram transformados em log<sub>10</sub> e realizou-se a análise de variância e aplicação do teste de SNK para comparação das médias de contagens fúngicas utilizando o Pacote Estatístico SIGMA STAT<sup>26</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As contagens fúngicas dos camarões das fazendas pesquisadas não diferiram entre si em todas as fases de cultivo (Tabela 1), caracterizadas em função do crescimento e ganho de peso dos animais.

**Tabela 1.** Médias das contagens de fungos nos camarões produzidos no litoral piauiense em três fases de cultivo

Fases de Cultivo	Propriedades			
	"A"	"B"	"C"	"D"
I	2,73 <sup>a</sup>	1,85 <sup>a</sup>	2,40 <sup>a</sup>	2,13 <sup>a</sup>
II	2,38 <sup>a</sup>	2,01 <sup>a</sup>	1,98 <sup>a</sup>	2,11 <sup>a</sup>
III	2,65 <sup>a</sup>	1,82 <sup>a</sup>	2,03 <sup>a</sup>	1,85 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> = letras iguais representam resultados semelhantes ( $p < 0,05$ ); UFC/g = unidade formadoras de colônias por grama em log<sub>10</sub>.

Os camarões analisados eram recém-capturados, bem nutridos, sadios e possuíam boa imunidade. As baixas contagens fúngicas observadas nas diferentes fases de cultivo podem estar relacionadas a diversos fatores, dentre os quais o equilíbrio da microbiota externa do corpo do animal e o tempo decorrido entre a coleta das amostras e a análise. Porém, existe a possibilidade dos fungos presentes nos camarões multiplicarem-se após a despesca e durante o processamento do produto, caso seja armazenado em temperatura inadequada, pois, ao encontrarem condições ideais, os fungos possuem um importante papel no processo de deterioração, ocasionando perdas da qualidade do produto final e produção de micotoxinas conforme Internacional Commission on Microbiological Specifications for Foods<sup>4</sup>.

A legislação vigente não possui parâmetros para a quantificação de fungos e leveduras para pescado processado e expostos à venda<sup>5</sup>, por isso não é possível comparar os resultados encontrados aos padrões de referência. No entanto, as contagens fúngicas nos camarões das diferentes fases recém-despescados são relativamente baixas quando comparadas aos resultados de Reis et al.<sup>10</sup>, e a manipulação indevida, posterior à despesca, pode acrescentar novos micro-organismos contaminantes, assim como favorecer o desenvolvimento de fungos preexistentes.

Foram isoladas 64 cepas de fungos pertencentes a sete gêneros (Tabela 2) nas amostras de camarão das diferentes fases de cultivo, sendo que as espécies prevalentes pertenciam aos gêneros *Aspergillus* (34,4%) e *Penicillium* (25,0%). Reis et al.<sup>10</sup> afirmam que camarões podem ser contaminados por fungos pela água do ambiente, no caso dos rios. A contaminação fúngica observada nos camarões cultivados no litoral piauiense pode ter ocorrido pela presença desses fungos na ração contaminada que se adaptou às condições de cultivo pela sua ampla difusão na natureza.

**Tabela 2.** Frequência absoluta e relativa de fungos filamentosos isolados de camarões cultivados no litoral piauiense

Gênero fúngico	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
<i>Aspergillus</i> spp	22	34,4
<i>Penicillium</i> spp	16	25,0
<i>Trichoderma</i> spp	09	14,1
<i>Cladosporium</i> spp	08	12,5
<i>Fusarium</i> spp	02	3,1
<i>Alternaria</i> spp	02	3,1
<i>Curvularia</i> spp	02	3,1
Total	64	100,0

Foram identificadas dezoito cepas do gênero *Aspergillus*, pertencentes às seções *Circundati*, *Terrei*, *Nigri* e *Flavi*. As espécies isoladas estão descritas na Tabela 3. Destas, duas cepas de *A. ochraceus* e cinco cepas de *A. agregados niger* apresentaram resultados positivos para a produção de OTA em cromatografia de camada delgada. Por ser uma análise qualitativa, não foi quantificada a concentração da produção de OTA.

Uma cepa de *A. flavus* produziu aflatoxina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> na concentração de 14,8 ng/g, 4,3 ng/g, 2,6 ng/g e 1,1 ng/g, respectivamente e foi classificada como *A. flavus* atípico<sup>14-19</sup>. Essa cepa apresentou todas as características morfológicas macroscópicas e microscópicas de um *A. flavus* diferenciando morfológicamente do *A. parasiticus*<sup>21</sup>. Esses dados assemelham-se aos estudos realizados por Saito e Tsuruta<sup>14</sup>, Geiser et al.<sup>15</sup>, Tran-Dinh et al.<sup>16</sup>, Pildain et al.<sup>17</sup>, Barros et al.<sup>18</sup> e Perrone et al.<sup>19</sup>, que identificaram morfológicamente *A. flavus* atípicos do grupo II (Linhagem “S”) que são produtores de aflatoxinas B e G. Assim, a classificação e identificação molecular e filogenética dessa cepa torna-se necessária posteriormente, pois não há resultados relativos a

essa variedade de fungos no Brasil, podendo ser uma variedade da seção *Flavi*, como afirmam Varga et al.<sup>27</sup>, que identificaram duas novas espécies da seção *Flavi* produtoras de aflatoxinas, e Gonçalves et al.<sup>28</sup>, que analisaram por biologia molecular cepas dessa seção isoladas de castanhas do Brasil.

Durante a despesca dos viveiros os camarões são transferidos para recipientes contendo água do canal de abastecimento, metabissulfito de sódio e gelo para manter a temperatura próxima a 0,0 °C. Em seguida, esses depósitos são conduzidos para a indústria, onde os camarões são lavados com água clorada a 5,0 ppm, congelados a -35 °C e armazenados a -20 °C até expedição. A concentração de cloro utilizada é eficiente como bactericida, entretanto, não há comprovação da eficácia em fungos presentes em camarões.

Santos et al.<sup>29</sup> e Veloso et al.<sup>30</sup>, ao testarem diferentes concentrações de metabissulfito de sódio e cloro em fungos do gênero *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp isolados de diferentes etapas de beneficiamento de camarões, concluíram que concentrações de 6,0% de metabissulfito inibiram o crescimento *in vitro* desses gêneros, enquanto 5,0 ppm de cloro não inibiu o crescimento fúngico.

Assim, os sulfitos podem ser utilizados como fungicidas para fungos fitopatogênicos produtores de esclerócitos<sup>31</sup> e as temperaturas utilizadas durante o processamento dos camarões inibem o desenvolvimento dos fungos e sua consequente produção de micotoxinas<sup>32</sup>. As amostras de camarão analisadas apresentaram espécies de fungos micotoxígenos, e sua presença no produto não indica necessariamente a existência de micotoxinas, pois, para isso, é preciso que o fungo encontre condições ideais para seu crescimento<sup>6-7</sup>, portanto as amostras analisadas são consideradas seguras para o consumo.

**Tabela 3.** Espécies do gênero *Aspergillus* isoladas de camarões cultivados no litoral piauiense

Seção	Números de isolados	Ocorrência (%)	AFB <sub>1</sub> (ng/g)	AFB <sub>2</sub> (ng/g)	AFG <sub>1</sub> (ng/g)	AFG <sub>2</sub> (ng/g)	OTA
Seção <i>Nigri</i>							
<i>A. agregados niger</i>	07	38,9					05(+)
Seção <i>Circundati</i>							
<i>A. ochraceus</i>	04	22,2					02(+)
Seção <i>Terrei</i>							
<i>A. terreus</i>	04	22,2					
Seção <i>Flavi</i>							
<i>A. flavus</i> *	02	11,1	14,8	4,3	2,6	1,1	
<i>A. oryzae</i>	01	5,6					
Total	18	100,0			01(+)		07(+)

AFB<sub>1</sub> = aflatoxina B<sub>1</sub>; AFB<sub>2</sub> = aflatoxina B<sub>2</sub>; AFG<sub>1</sub> = aflatoxina G<sub>1</sub>; AFG<sub>2</sub> = aflatoxina G<sub>2</sub>; OTA = ocratoxina A; (+) = produção de micotoxina; \* = *A. flavus* atípica do grupo II (Linhagem “S”)

As rações contaminadas por fungos micotoxígenos preexistentes na matéria-prima são consideradas como fontes de micotoxinas em carcinicultura, como afirmam Villarreal-Cavazos et al.<sup>33</sup> e Calvet et al.<sup>34</sup>, detectaram níveis de aflatoxina B<sub>1</sub> que variaram de 30 µg/kg a 360 µg/kg. Isto se deve ao fato das rações possuírem substratos potenciais para crescimento fúngico e produção desses metabólitos quando são armazenadas e expostas a fatores ambientais. Os fungos também podem contaminar os camarões cultivados, interferir na vida de prateleira pela sua capacidade proteolítica e consequentemente diminuir a qualidade do produto final.

No entanto, não existem padrões referenciais quanto à prevalência de fungos micotoxígenos em alimentos, necessitando um aprofundamento nas pesquisas com intuito de verificar a potencialidade dessas espécies, a possível presença de micotoxinas em camarões cultivados e os danos que podem causar para os consumidores do produto final.

Concluiu-se que os camarões cultivados no litoral piauiense, quando recém-capturados, apresentaram baixas contagens fúngicas em todas as fases de cultivo e os fungos prevalentes pertenceram aos gêneros *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp. Também foram isolados os gêneros *Trichoderma* spp, *Cladosporium* spp, *Fusarium* spp, *Alternaria* spp e *Curvularia* spp.

As espécies de *A. ochraceus* e *A. agregados niger* isoladas em camarões eram produtoras de OTA.

Foi isolada uma cepa de *A. flavus* atípica do grupo II (Linhagem "S") produtora de aflatoxina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> com diferenças macroscópicas e microscópicas do *A. parasiticus*, que necessitará, posteriormente, de uma identificação molecular para saber se não é uma cepa de *A. parasiticus* ou var *A. flavus parvisclerotigenus*<sup>14</sup>, pois até o momento deste estudo não há resultados relativos a essa variedade de fungos no Brasil.

#### AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo apoio financeiro.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão – FAPEMA.

Ao Laboratório de Micologia e Micotoxicologia do Instituto de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Ao Laboratório de Micologia da Universidad Nacional de Río Cuarto.

#### REFERÊNCIAS

1. ABCC. Associação Brasileira de Criadores de Camarão. Censo da produção anual de 2004. [Acesso 2011 set 24]. Disponível em: [http:// www.abccam.com.br/censo\_2010].
2. Moraes AM. Agronegócio do camarão no Piauí. Carta CEPRO. 2001;20(3):7-12.
3. Franco BDGM, Landgraf M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Atheneu; 2008. 182p.
4. ICMSE. Internacional Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microrganismos de los alimentos: características de los patógenos microbiano. Zaragoza: Acribia; 1996.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília (DF); 10 jan 2001; Seção 1(7-E):45-53.
6. Pereira MMG, Carvalho EP, Prado G. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Bol CEPPA. 2002;20(1):141-56.
7. Pereyra CM, Cavaglieri LR, Chiacchiera SM, Dalcerro AM. Fungi and mycotoxins in feed intended for sows at different reproductive stages in Argentina. Vet Med Int. 2010;01:1-7.
8. Ritter AC, Noll IB. Diferentes pré-inóculos, temperaturas e tempos de incubação na produção aflatoxina B1 em arroz. Cienc Rural. 2008;38(9):2552-6.
9. Pitt JI, Hocking AD. Fungi and Food Spoilage. 3. ed. Londres: Springer Dordrecht Heidelberg; 2009.
10. Reis JA, Hoffmann P, Marcos LM, Taddei FG, Gonçalves TMV, Hoffmann FL. Estudo higiênico-sanitário dos camarões dulcícolas *Macrobrachium amazonicum* e *M. jelskii*. Hig Aliment. 2004;18(116/117):57-8.
11. Lin MT, Dianese JC. A coconut-agar medium rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp. Phytopathol. 1976;66:1466-9.
12. Yousefi S, Dadgar S, Safara M, Zaini F. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* isolates from green-tiger shrimps (*Penaeus semisulcatus*). Iran J Microbiol. 2009;01(4):18-22.
13. Filtenborg O, Frisvad JC. A simple screening: method for toxigenic moulds in pure cultures. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie. 1980;13:128-30.
14. Saito M, Tsuruta O. A new variety of *Aspergillus flavus* from tropical soil in Thailand and its aflatoxin productivity. Proc Jpn Assoc Mycotocol. 1993;37:31-6.
15. Geiser DM, Pitt JI, Taylor JW. Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin producing fungus *Aspergillus flavus*. Proc Natl Acad Sci. 1998;95:388-93.
16. Tran-Dinh N, Pitt JI, Carter DA. Molecular genotype analysis of natural toxigenic and nontoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. Mycol Res. 1999;103(11):1485-90.
17. Pildain, MB, Vaamonde G, Cabral D. Analysis of population structure of *Aspergillus flavus* from peanut based on vegetative compatibility, geographic origin, mycotoxin and sclerotia production. Int J Food Microbiol. 2004;93:31-40.
18. Barros G, Torres A, Chulze S. *Aspergillus flavus* population isolated from soil of Argentina's peanut-growing region.

- Sclerotia production and toxigenic profile. *J Sci Food Agricult*. 2005;85(14):2349-53.
19. Perrone G, Susca A, Cozzi G, Ehrlich K, Varga J, Frisvad JC, et al. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. *St Mycol*. 2007;59:53-66.
20. Dalcerro A, Magnoli C, Chiacchiera S, Palacios G, Reynoso M. Mycoflora and incidence of aflatoxin B<sub>1</sub>, zearalenone and deoxynivalenol in poultry feeds in Argentina. *Mycopathol*. 1997;137(3):179-84.
21. Klich MA. A laboratory guide to the common *Aspergillus* species and their teleomorphs. Sidney: CSIRO – Division of Food Processing; 2002.
22. Geisen, R. Multiplex polymerase chain reaction for the detection of potential aflatoxin and sterigmatocystin producing fungi. *J Off Appl Microbiol*. 1996;19:388-92.
23. Trucksess MW, Stack ME, Nesheim S, Albert RH, Romer TR. Multifunctional column coupled with liquid chromatography for determination of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> in corn, almonds, Brazil nuts, peanuts and pistachionuts: collaborative study. *J AOAC Int*. 1994;6:1512-21.
24. Bragulat MR, Abarca ML, Cabañes FJ. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. *Int J Food Microbiol*. 2001;71:139-44.
25. Nesheim S, Hardin NF, Francis OJ, Langham WS. Analysis of ochratoxin A and B and their esters in barley: using partitions and thin-layer chromatography. I Development of the method. *J AOAC Int*. 1973;56:817-21.
26. Sigma Stat for windows version 1.0. Jandel Corporation; 2000.
27. Varga J, Frisvad JC, Samson RA. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. *St Mycol*. 2011;69:57-80.
28. Gonçalves JS, Ferracin LM, Vieira MLC, Lamanaka BT, Taniwaki MH, Fungaro MHP. Molecular analysis of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Brazil nuts. *World J Microb Biot*. 2012;28(4):1817-25.
29. Santos YFM, Muratori MCS, Rosa CAR, Calvet RM, Nunes EMCG, Marques ALA, et al. Sobrevivência do *Aspergillus* spp *in vivo* e *in vitro* submetido a diferentes concentrações de metabissulfito de sódio e cloro usado no beneficiamento do camarão. *In: XVIII Seminário de Iniciação Científica e I Seminário em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação da UFPI*; nov 2009; Teresina.
30. Veloso APB, Muratori MCS, Rosa CAR, Calvet RM, Nunes EMCG, Marques ALA, et al. Sobrevivência do *Penicillium* spp *in vivo* e *in vitro* submetido a diferentes concentrações de metabissulfito de sódio e cloro usado no beneficiamento do camarão. *In: XVIII Seminário de Iniciação Científica e I Seminário em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação da UFPI*; nov 2009; Teresina.
31. Patsoukis N, Georgiou CD. Effect of sulfite-hydrosulfite and nitrite on thiol redox state, oxidative stress and sclerotial differentiation of filamentous phytopathogenic fungi. *Pestic Bio Physiol*. 2007;88(2):226-35.
32. Jay JM. *Microbiologia de alimentos*. 6. ed. São Paulo: Artmed; 2005.
33. Villarreal-Cavazos DA, Barbosa CG, Ezquerria-Brauer JM, Scholz U, Cruz-Suárez LE, Ricque-Marie D. Efecto de las micotoxinas em la nutrición de camarones peneidos. *In: VII Memorias del Simposium Internacional de Nutrición Acuícola, VII Avances em Nutrición Acuícola*; 2004; Hermosillo. p. 463-479.
34. Calvet RM, Muratori MCS, Pereira MMG, Rosa CAR, Costa APR, Dalcerro AM. Aflatoxinas B<sub>1</sub> em ração de camarão cultivados no litoral do Piauí. *In: II Congresso Latino-Americano de Analistas de Alimentos, VIII Encontro Nacional de Analistas de Alimentos*; jun 2009; Belo Horizonte.

# Monitoramento de farinha de trigo e de milho fortificadas com ferro

## Monitoring the wheat and corn flours enriched with iron

RIALA6/1516

Márcia Liane BUZZO\*, Maria de Fátima Henriques CARVALHO, Paulo TIGLEA, Luciana Juncioni de ARAUZ, Edna Emy Kumagai ARAKAKI, Richard MATSUZAKI

\*Endereço para correspondência: Núcleo de Contaminantes Inorgânicos, Centro de Contaminantes, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira César, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 01246-902. Tel.: (11) 3068-2923. E-mail: marcialiane@ial.sp.gov.br  
Recebido: 12.09.2012 – Aceito para publicação: 28.12.2012

### RESUMO

A anemia é o mais comum dos distúrbios nutricionais no mundo. Existem vários fatores que podem causar essa doença, incluindo-se a deficiência de ferro. No Brasil, a fortificação de farinhas de trigo e de milho com ferro foi instituída em 2002. O presente estudo avaliou os teores de ferro em farinhas de trigo e de milho comercializadas no Estado de São Paulo, seguindo-se a legislação vigente. Os teores médios de ferro encontrados foram de 5,4 mg.100 g<sup>-1</sup> e 4,7 mg.100 g<sup>-1</sup>, respectivamente, para farinhas de trigo e de milho, e esses valores estão em conformidade com os dados da literatura nacional. As variabilidades observadas nos teores de ferro, de 1,0 a 11,7 mg.100 g<sup>-1</sup> na farinha de trigo e de 0,9 a 19,9 mg.100 g<sup>-1</sup> na farinha de milho, demonstram que alguns fabricantes não efetuam adequado controle do procedimento de fortificação de ferro, possivelmente em função de ocorrência de problemas no processo de produção. Este estudo aponta ainda a importância da manutenção de programas de monitoramento de alimentos como ferramenta que auxilia os produtores a se adequarem aos limites preconizados pela legislação, bem como para fundamentar o controle e a fiscalização de produtos consumidos pela população.

**Palavras-chave.** ferro, espectrometria de absorção atômica, anemia, fortificação de alimentos, análise de alimentos, saúde pública.

### ABSTRACT

Anemia is the most common nutritional disorders in the world. Several factors may cause this disease, including the iron deficiency. In Brazil, the procedure of wheat and corn flours enrichment with iron was instituted in 2002. The present investigation evaluated the iron contents in wheat and corn flours commercialized in the state of São Paulo, following the legislation in force. The mean values of iron were 5.4 mg.100 g<sup>-1</sup> and 4.7 mg.100 g<sup>-1</sup>, for wheat and corn flours, respectively, and they were compliant with the national literature findings. The iron contents varieties from 1.0 to 11.7 mg.100 g<sup>-1</sup> in wheat flour and from 0.9 to 19.9 mg.100 g<sup>-1</sup> in corn flour showed that some manufacturers do not perform adequate control of iron enrichment approach, possibly due to the occurrence of some problems in the technical procedure during the manufacturing process. This study also indicates the importance of maintaining the food monitoring programs as a tool, which may aid the producers to be in conformity with the limits established in the legislation, and also to support the control and the surveillance of products consumed by the population.

**Keywords.** iron, atomic absorption spectrometry, anemia, food fortification, food analysis, public health.

## INTRODUÇÃO

A anemia ferropriva é o mais comum dos distúrbios nutricionais no mundo<sup>1</sup>. Existem vários fatores que podem causar anemia, incluindo a deficiência de nutrientes como ferro, folato ou vitamina B12. Outras causas incluem desequilíbrio hormonal, doenças crônicas, infecção ou sangramento excessivo<sup>2</sup>. Essa carência atinge adultos, principalmente mulheres em idade reprodutiva e em período de gestação, além de ocorrer com alta prevalência em crianças com até cinco anos de idade, estágio da vida em que ocorre um crescimento acelerado. A deficiência do ferro também influencia a capacidade de trabalho e resposta imune às infecções em adultos, e ainda pode alterar o desenvolvimento psicomotor, o processo de aprendizado e a concentração das crianças<sup>3</sup>.

Dados da Organização Mundial da Saúde mostram que cerca de 40% da população mundial (mais de dois bilhões de indivíduos) sofrem de anemia. As principais prevalências entre os grupos específicos são estimadas em: 50% em mulheres grávidas, bebês e crianças de um a dois anos de idade; 25% em crianças em idade pré-escolar; 40% em crianças em idade escolar; 30 a 55% em adolescentes<sup>4</sup>. No Brasil, estudo realizado sobre o diagnóstico de anemia por deficiência de ferro em crianças na região nordeste do país, com idade entre 6 e 30 meses, indicou que, do total de crianças, 58,1% apresentaram anemia com deficiência de ferro<sup>5</sup>. Pesquisa realizada com crianças em fase pré-escolar da Amazônia Ocidental revelou a prevalência de anemia ferropriva de 20,9%<sup>6</sup>. Ainda, em estudo realizado sobre a estimativa da deficiência de ferro em população feminina com idades entre 15 e 49 anos no município de João Pessoa, mostrou prevalência de 15% de anemia, observando-se maior prevalência em mulheres que não frequentavam escola<sup>7</sup>.

Entre os fatores associados ao aparecimento da anemia encontram-se as precárias condições socioeconômicas e ambientais, infecções, baixo peso em recém-nascidos e ingestão deficiente de alimentos fontes de ferro e de vitamina C<sup>8</sup>. Dessa forma, a importância da ingestão dietética dos nutrientes envolvidos na etiologia da anemia tem motivado os órgãos da saúde pública a instituir programas de fortificação de alimentos visando a prevenção da doença.

Diante desses fatos, a fortificação de alimentos vem sendo adotada nas últimas décadas tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento e é considerada a medida de melhor custo-benefício em

longo prazo para a redução da prevalência da anemia. A efetivação dessa medida nesses países foi obtida somente a partir de decisões políticas que culminaram o caráter compulsório da fortificação<sup>9,10</sup>. Além disso, esta prática é também recomendada pela Organização Mundial da Saúde como estratégia ideal em locais onde se encontram elevadas prevalências da doença, constituindo-se uma forma fácil, segura e barata para solucionar o problema<sup>4</sup>.

Considerando as recomendações de fortificação de produtos alimentícios com ferro e ácido fólico feitas pela Organização Mundial da Saúde e pela Organização Pan-americana da Saúde; que a anemia ferropriva representa um problema nutricional importante no Brasil, com severas consequências econômicas e sociais; e ainda que as farinhas de trigo e as farinhas de milho são largamente consumidas pela população brasileira, o Ministério da Saúde estabeleceu a Resolução RDC nº 344/2002<sup>11</sup>, que torna obrigatória a fortificação das farinhas de trigo e de milho com ferro e ácido fólico em todo o país. De acordo com essa resolução, cada 100 g de farinha de trigo e de milho devem fornecer, no mínimo, 4,2 mg de ferro.

Diante dessas considerações, os objetivos deste trabalho foram avaliar os teores de ferro em farinhas de trigo e de milho comercializadas no Estado de São Paulo, verificar o atendimento à legislação vigente e oferecer ferramentas para subsidiar ações para a melhoria da qualidade desses produtos consumidos pela população.

## MATERIAL E MÉTODO

### Amostras

No período entre setembro de 2007 e dezembro de 2010, foram coletadas 89 amostras de farinha de trigo (40) e farinha de milho (49) em diferentes pontos de comércio do Estado de São Paulo, pelos Grupos de Vigilância Sanitária (GVS) de 44 municípios, em cumprimento ao Programa Paulista de Alimentos. As amostras foram homogeneizadas, não sendo submetidas a qualquer pré-tratamento. As determinações do íon ferro foram realizadas em triplicata.

### Método analítico

Pesou-se 0,5 g de amostra em frasco erlenmeyer de 125 mL e, a seguir, acrescentou-se água ultrapura para hidratação e 2,5 mL de ácido clorídrico concentrado de grau analítico. Foram preparados dois brancos do reagente para cada tomada de ensaio. A digestão das

**Tabela 1.** Parâmetros de validação do método analítico

Matriz	MRC	Valor certificado (mg.kg <sup>-1</sup> )	Valor obtido (Exatidão) (mg.kg <sup>-1</sup> )	Precisão (%)	LD(mg.kg <sup>-1</sup> )	LQ(mg.kg <sup>-1</sup> )
Farinha de trigo	NIST1567aWheatflour	14,1 ± 0,5	14,4 (102%)	3,4	1,1	3,6
Farinha de milho	NIST 8433 CornBran	14,8 ± 1,8	13,7 (92,7%)	6,0	1,3	4,2

MRC = Material de referência certificado; LD = Limite de detecção; LQ = Limite de quantificação.

amostras foi efetuada sobre chapa elétrica ajustada na faixa de temperatura entre 100-120 °C, por duas horas. As amostras foram filtradas em papel de filtro quantitativo em balões volumétricos de 25 mL, e o volume foi completado quantitativamente com água ultrapura. A curva de calibração foi preparada pela diluição de solução padrão de ferro com concentração de 1.000 mg.L<sup>-1</sup> em solução de ácido clorídrico p.a. a 10% (v/v) para concentrações de 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 2,0 mg.L<sup>-1</sup>. Para a determinação de ferro, aplicou-se a técnica analítica de espectrometria de absorção atômica com chama (Perkin Elmer, modelo Analyst 100), utilizando-se comprimento de onda de 248,3 nm e fenda de 0,2 mm.

#### Validação do método analítico

Para a garantia da confiabilidade dos resultados obtidos, a exatidão do método analítico foi avaliada utilizando-se os Materiais de Referência Certificados: NIST 1567a Wheat Flour, para a matriz farinha de trigo, e NIST 8433 Corn Bran, para a matriz farinha de milho. Para as determinações dos valores de limite de detecção (LD) e de limite de quantificação (LQ) para as farinhas de trigo e milho foram realizadas 14 e 13 preparações independentes de uma amostra isenta de fortificação de cada produto, respectivamente. Para o cálculo de exatidão e precisão do método, foram preparadas 13 amostras independentes dos materiais de referência certificados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### Validação do método analítico

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos na validação do método analítico para os parâmetros exatidão, precisão, limite de detecção e quantificação, empregando-se os Materiais de Referência Certificados: NIST 1567a Wheat Flour e NIST 8433 Corn Bran.

A análise dos parâmetros de validação indica que o método empregado é adequado para a determinação de ferro nas matrizes em estudo. O preparo das amostras de farinha de trigo e farinha de milho utilizando a hidrólise ácida aliada ao emprego da técnica de espectrometria de

absorção atômica com chama mostrou-se simples, rápido e de baixo custo, permitindo o processamento simultâneo de um número relativamente grande de amostras.

#### Análise das amostras de farinha de trigo e farinha de milho

Em cumprimento à legislação em vigor e em atendimento ao Programa Paulista de Análise de Alimentos, os resultados obtidos das amostras de farinhas de trigo e de milho coletadas no período entre setembro de 2007 e dezembro de 2010 são apresentados na Tabela 2. A análise descritiva indicou que os valores médios de ferro encontrados, 5,4 mg.100 g<sup>-1</sup> e 4,7 mg.100 g<sup>-1</sup> para farinhas de trigo e de milho, respectivamente, são concordantes com aqueles apresentados na literatura nacional<sup>12-15</sup>.

Com relação aos valores mínimos de ferro encontrados em farinhas de trigo e de milho, estes sugerem que não houve a adição de ferro nos produtos estudados e estão concordantes com a literatura<sup>16</sup>, que indica que a concentração do nutriente naturalmente presente em farinhas de trigo e de milho sem fortificação com ferro é de 1,0 mg.100 g<sup>-1</sup> e 0,9 mg.100 g<sup>-1</sup>, respectivamente.

A Tabela 2 apresenta, ainda, os valores máximos de ferro em farinhas de trigo e de milho. Ressalta-se que os programas de fortificação em alimentos precisam considerar outros aspectos relacionados à saúde, incluindo precauções contra o aumento dos níveis de ferro em dietas. A ingestão em excesso desse elemento pode causar câncer, aumento de doenças cardiovasculares e afetar a absorção de outros minerais, como cobre e manganês<sup>17,18</sup>.

A adição de nutrientes a alimentos deve ser feita de modo a evitar também a ingestão de quantidades excessivas<sup>10</sup>. A Portaria 31/1998<sup>19</sup> estabelece que o nutriente adicionado ao alimento deve estar presente em concentrações que não impliquem em ingestão insignificante ou excessiva e, ainda, que não alcancem os níveis terapêuticos (para o tratamento da anemia ferropriva<sup>20</sup> em adultos, a dose terapêutica varia de 100 a 200 mg de ferro por dia).

Tendo em vista essa consideração, recomenda-se às autoridades competentes que se estabeleça um limite máximo de ferro nas farinhas de trigo e de milho, uma vez

**Tabela 2.** Análise descritiva dos resultados obtidos dos teores de ferro nas amostras de farinhas de trigo e milho

Produto	Nº de amostras analisadas	Média (mg.100 g <sup>-1</sup> )	Desvio-padrão (mg.100 g <sup>-1</sup> )	Valor mínimo (mg.100 g <sup>-1</sup> )	Valor máximo (mg.100 g <sup>-1</sup> )
Farinha de trigo	40	5,4	2,4	1,0	11,7
Farinha de milho	49	4,7	3,4	0,2	19,9

que os resultados obtidos neste estudo superaram em cerca de três e cinco vezes o valor descrito pela legislação para as farinhas de trigo e de milho, respectivamente.

Segundo dados do INMETRO<sup>21</sup>, por exemplo, o consumo anual per capita no Brasil para farinha de trigo é de 53 kg, o equivalente à ingestão diária de 145 g. A Resolução nº 269/2005<sup>22</sup>, do Ministério da Saúde, que aprova o Regulamento Técnico sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais, estabelece uma IDR de 14 mg de ferro para adultos. Sendo assim, considerando somente a ingestão de farinha de trigo, amostras contendo teor de ferro acima de 9,6 mg.100 g<sup>-1</sup> poderiam alcançar a IDR. Portanto, de acordo com os resultados obtidos no presente estudo, do total de amostras de farinha de trigo analisadas, 5% se enquadrariam nesse caso.

De acordo com a legislação em vigor, dentre as 89 amostras de farinhas de trigo e de milho analisadas, 75,3% foram consideradas satisfatórias por apresentarem teor de ferro com valor mínimo de 4,2 mg.100 g<sup>-1</sup>, enquanto 24,7% das amostras foram consideradas insatisfatórias por apresentarem teor de ferro abaixo do limite mínimo estabelecido (Tabela 3). Os resultados evidenciaram a necessidade de ações para corrigir eventuais falhas na produção. As variabilidades observadas dos teores de ferro nas amostras analisadas ocorreram possivelmente pela dificuldade em adequar o procedimento empregado nos moinhos. Um dos fatores pode estar ligado à dificuldade no ajuste do fluxo da adição da mistura contendo ferro e ácido fólico às farinhas. Proposta semelhante foi apresentada por Boen et al.<sup>14</sup>, que observaram variações nos teores de ferro em amostras de farinhas de trigo e de milho devido a problemas durante a adição e homogeneização do mineral.

Em 2011, em reunião realizada pela Comissão Interinstitucional para Implementação, Acompanhamento e Monitoramento das Ações de Fortificação de Farinhas de Trigo, Milho e de seus Subprodutos, foram identificados problemas na operação de adição de ferro e ácido fólico em farinhas de trigo. Assim, com objetivo de buscar soluções conjuntas e passíveis de serem implementadas para melhoria da qualidade do produto, foi proposta a ação conjunta entre a Associação Brasileira da Indústria do Trigo (ABITRIGO) e os moinhos para a resolução

das falhas no processo de produção. Entre estes podemos citar que os dosadores da mistura de ferro e ácido fólico são regulados com base no fluxo de farinha. Quando há variações, a dosagem será irregular, havendo falta ou excesso da mistura. Este é o sistema mais utilizado atualmente. Além disso, as Boas Práticas de Fabricação utilizam ímãs no final do processo para retirar sujidades que contribuem para a variação de dosagem de ferro na farinha. Ainda, a diferença de densidade entre a farinha e o ferro promove a segregação desde a adição, armazenagem, transporte e destino final (consumidor)<sup>23</sup>.

**Tabela 3.** Porcentagem de resultados satisfatórios e insatisfatórios obtidos nas amostras de farinhas de trigo e de milho

Produto	Nº de amostras analisadas	Resultados insatisfatórios	Resultados satisfatórios
Farinha de trigo	40	9 (22,5%)	31 (77,5%)
Farinha de milho	49	13 (26,5%)	36 (73,5%)
Total	89	22 (24,7%)	67 (75,3%)

Assim, a alta variabilidade nos teores de ferro verificada neste estudo poderá subsidiar as autoridades competentes para que se estabeleça um limite máximo de ferro nas farinhas de trigo e de milho. Além disso, visando a melhoria no controle de qualidade dos moinhos sem que haja interferência nas características do produto final, adicionalmente, seria recomendável aprimorar o procedimento industrial da adição de ferro nas farinhas, de modo a torná-las homogêneas e garantir a qualidade do produto final.

Além disso, o presente estudo aponta para a importância da manutenção de programas de monitoramento no país, tal qual o Programa Paulista de Alimentos, como ferramenta que pode auxiliar os produtores a se adequarem aos limites preconizados pela legislação, bem como fundamentar o controle e a fiscalização de produtos alimentícios consumidos pela população. É através da rotina de monitoramento e avaliação que se podem alcançar as metas estabelecidas por qualquer programa que tenha como objetivo melhorar o setor da saúde e evitar a repetição de estratégias não adequadas.

## CONCLUSÃO

As variabilidades dos teores de ferro observadas nas amostras analisadas (1,0 a 11,7 mg.100 g<sup>-1</sup> para farinha de trigo e 0,9 a 19,9 mg.100 g<sup>-1</sup> para farinha de milho) demonstraram que alguns fabricantes não controlam adequadamente o procedimento de fortificação de ferro, possivelmente devido a problemas no processo de produção. Assim, os resultados evidenciam a necessidade dos moinhos implementarem um sistema de controle de qualidade que assegure a precisão e homogeneidade na adição de ferro às farinhas, atendendo à legislação vigente.

Além disso, o estudo aponta para a importância da manutenção de programas de monitoramento de alimentos no país como ferramenta que pode auxiliar os produtores a se adequarem aos limites preconizados pela legislação, bem como fundamentar o controle e a fiscalização de produtos alimentícios consumidos pela população.

## AGRADECIMENTOS

Às equipes dos Grupos de Vigilância Sanitária do Estado de São Paulo pela coleta das amostras, e à Luci Elaine Machado pelo auxílio prestado no laboratório.

## REFERÊNCIAS

- Duque X, Moran S, Mera R, Medina M, Martinez H, Mendonza ME, et al. Effect of eradication of *Helicobacter pylori* and iron supplementation on the iron status of children with iron deficiency. *Arch Med Res*. 2010;41:38-45.
- Gropper SS, Kerr S, Barksdale JM. No-anemic iron deficiency, oral iron supplementation, and oxidative damage in college-aged females. *J Nutr Biochem*. 2003;14:409-15.
- Umbelino DC, Rossi EA. Deficiência de ferro: consequências biológicas e propostas de prevenção. *Rev Ciênc Farm Básic Apl*. 2006;27(2):103-12.
- OMS. Organização Mundial da Saúde. Guidelines on food fortification with micronutrients. [acesso 2013 jan 4]. Disponível em: [http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/9241594012/en/].
- Carvalho AGC, Lira PIC, Barros MFA, Aléssio MLM, Lima MC, Carbonneau MA, et al. Diagnóstico de anemia por deficiência de ferro em crianças do Nordeste do Brasil. *Rev Saúde Pública*. 2010;44(3):513-9.
- Castro TG, Silva-Nunes M, Conde WL, Muniz PT, Cardoso MA. Anemia e deficiência de ferro em pré-escolares da Amazônia Ocidental brasileira: prevalência e fatores associados. *Cad Saúde Pública*. 2011;27(1):131-42.
- Silva SCT, Vianna RPT. Estimativa da deficiência de ferro e folato e fatores associados em uma população feminina. *Adolesc Saúde*. 2010;7(4):30-8.
- Oliveira MAA, Osório MM, Raposo MCF. Concentração de hemoglobina e anemia em crianças no Estado de Pernambuco, Brasil: fatores sócio-econômicos e de consumo alimentar associados. *Cad Saúde Pública*. 2006;22(10):2169-78.
- Allen LH. Interventions for micronutrient deficiency control in developing countries: past, present and future. *J Nutr*. 2003;133:3875S-78S.
- Vellozo EP, Fisberg M. O impacto da fortificação de alimentos na prevenção da deficiência de ferro. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2010;32 Supl 2:134-9.
- Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico para a Fortificação das Farinhas de Trigo e das Farinhas de Milho com Ferro e Ácido Fólico. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília (DF)*; 18 dez 2002.
- Kira CS, Buzzo ML, Carvalho MFH, Duran MC, Sakuma AM. Avaliação dos teores de ferro em farinhas de trigo fortificadas, São Paulo, Brasil. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2006;65(3):181-5.
- Boen TR, Soeiro BT, Filho ERP, Lima-Pallone JA. Avaliação do teor de ferro e zinco e composição centesimal de farinhas de trigo e milho enriquecidas. *Rev Bras Ciênc Farm*. 2007;43(4):499-596.
- Boen TR, Soeiro BT, Pereira-Filho ER, Lima-Pallone JA. Folic acid and iron evaluation in brazilian enriched corn and wheat flours. *J Braz Chem Soc*. 2008;19(1):53-9.
- Soeiro BT, Boen TR, Pereira-Filho ER, Lima-Pallone JA. Investigação da qualidade de farinhas enriquecidas utilizando análise por componentes principais (PCA). *Ciênc Tecnol Aliment*. 2010;30(3):618-24.
- TACO. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. 4. ed. revisada e ampliada [acesso 2012 ago 9]. Disponível em: [http://www.unicamp.br/nepa/.../taco\_4\_edicao\_ampliada\_e\_revisada.pdf].
- Martínez-Navarrete N, Camacho MM, Martínez-Lahuerta J, Martínez-Monzó J, Fito P. Iron deficiency and iron fortified foods: a review. *Food Res Int*. 2002;35:225-31.
- Tapiero H, Gaté L, Tew KD. Iron: deficiencies and requirements. *Biomed Pharmacother*. 2001;55:324-32.
- Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 31, de 13 de janeiro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico Referente a Alimentos Adicionados de Nutrientes Essenciais. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília (DF)*; 30 mar 1998; Seção 1(60-E).
- Martindale: The complete drug reference. 34. ed. Suffolk: Pharmaceutical Press; 2005.
- INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Farinha de trigo especial. [acesso 2013 jan 04]. Disponível em: [http://www.inmetro.gov.br/consumidor/ produtos/farinha.asp].
- Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005. Aprova o Regulamento Técnico sobre Ingestão Diária Recomendada (IDR) de Proteína, Vitaminas e Minerais. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília (DF)*; 23 set 2005.
- Ministério da Saúde. II Reunião Ordinária da Comissão Interinstitucional para Implementação, Acompanhamento e Monitoramento das Ações de Fortificação de Farinhas de Trigo, Milho e de seus Subprodutos. [acesso 2013 jan 04]. Disponível em: [http://www.189.28.128.100/nutricao/docs/ferro/memoria2\_reuniao\_comissao\_interinstitucional\_para\_implementacao\_acompanhamento.pdf].

# Qualidade de saneantes e antissépticos utilizados em hospitais da rede pública

## Quality of the sanitizing and antiseptic products used in public hospitals

RIALA6/1517

Maria Cristina SANTA BÁRBARA<sup>1\*</sup>, Lígia Luriko MIYAMARU<sup>1</sup>, Helena Miyoco YANO<sup>1</sup>, Adriana Aparecida Buzzo ALMODOVAR<sup>1</sup>, Renata de França LIMA<sup>2</sup>, Mariângela Tirico AURICCHIO<sup>1</sup>, Adriana BUGNO<sup>1</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 01246-902. E-mail: mbarbara@ial.sp.gov.br

<sup>2</sup>Coordenação de Vigilância em Saúde (COVISA), Secretaria Municipal da Saúde, São Paulo

Recebido: 13.02.2012 – Aceito para publicação: 14.12.2012

### RESUMO

Neste estudo, foi avaliada a qualidade de produtos saneantes e antissépticos utilizados em hospitais da rede pública, por terem papel relevante como medida de controle e prevenção das infecções e doenças. O presente estudo, proveniente do Programa de Monitoramento do Município de São Paulo, avaliou 54 produtos, dos quais 47 contidos em embalagens originais lacradas e sete previamente diluídos nos hospitais. Vinte e seis amostras de detergentes e desinfetantes foram avaliadas quanto aos parâmetros microbiológicos, pH e teor de substância ativa; 25 antissépticos e três produtos esterilizantes foram analisados somente quanto ao teor de componente ativo. Cinco das amostras de desinfetantes em embalagem original estavam em desacordo com a legislação vigente, no que diz respeito ao componente ativo, à ausência de atividade antimicrobiana e/ou rotulagem. Sobre as amostras de desinfetantes diluídos nos hospitais, 60% não apresentaram atividade antimicrobiana. Das 13 amostras de detergentes, 30,8% demonstraram contaminação microbiana, e em três amostras foi detectada a ocorrência de *Pseudomonas*, o que indica a necessidade de melhoria nos processos de fabricação. Os produtos antissépticos e detergentes foram considerados satisfatórios em relação aos demais ensaios realizados. Ressalta-se, ainda, a escassez de publicações de dados de programas de monitoramento de produtos dessas categorias no nosso país.

**Palavras-chave.** qualidade, saneantes, antissépticos, procedimento.

### ABSTRACT

This study assessed the quality of sanitizing and antiseptic products used in public hospitals, considering their relevant role in controlling and preventing infections. The present study derived from the São Paulo City Monitoring Program analyzed 54 products, being 47 contained in the original sealed flasks, and seven which were previously diluted at the hospitals. Twenty six detergent and disinfectant samples were analyzed on microbiological parameters, pH, and active agent contents; and 25 antiseptic products and three sterilizers were assessed on the active agent contents only. Five disinfecting samples in original containers did not comply with the legislation in relation to active agent contents, absence of antimicrobial action and/or labeling. Among the diluted disinfecting products, no antimicrobial action was found in 60% samples. Of 13 detergent products, 30.8% showed microbial contamination, and three of them were contaminated with *Pseudomonas* spp. The antiseptic and detergent products showed to be satisfactory in the other parameters. It is noteworthy to evidence that the publication on data derived from the sanitary products monitoring programs is scarce in Brazil.

**Keywords.** quality, sanitizing agents, antiseptics, proceeding.

## INTRODUÇÃO

No Brasil, a infecção relacionada à assistência à saúde (IRAS) é definida como aquela adquirida após a admissão do paciente e que se manifesta durante a internação ou após a alta, sendo que se configura em grave problema de saúde pública. O impacto causado por tais infecções tem sido uma preocupação crescente entre os profissionais de saúde, devido à lotação de pacientes nos hospitais e ao surgimento de novos micro-organismos<sup>1,2</sup>. O ambiente hospitalar pode oferecer condições favoráveis para a veiculação microbiana, mesmo quando são empregados desinfetantes, antissépticos, antibióticos e quimioterápicos, oferecendo risco principalmente aos pacientes, considerando que estes podem apresentar o sistema imunológico comprometido pela própria doença<sup>3</sup>. A limpeza e a desinfecção tornaram-se fatores de grande importância no controle de infecção hospitalar, a fim de garantir a assepsia de ambientes e dos pacientes, bem como a segurança destes e das equipes de profissionais de saúde envolvidas<sup>4</sup>.

A desinfecção é um processo físico ou químico, que destrói a maioria dos micro-organismos patogênicos em objetos inanimados e superfícies, com exceção de esporos bacterianos<sup>5</sup>, os quais podem ser eliminados por agentes químicos, dependendo do tempo de exposição e da concentração.

Dentre os agentes químicos, os desinfetantes à base de compostos quaternários de amônio são tensoativos catiônicos que, além de bons agentes de limpeza, são recomendados para desinfecção de superfícies como pisos, paredes e mobiliários em ambientes relacionados à assistência à saúde, porém são inativados por material orgânico. Esses compostos possuem quatro radicais alquila ou arila e um quinto substituinte, usualmente um haleto (cloreto ou brometo). Como exemplo, pode-se citar o cloreto de benzalcônio (cloreto de alquil dimetil benzil amônio). A ação antimicrobiana varia de acordo com a composição das cadeias alquila ou arila e é atribuída à inativação de enzimas produtoras de energia, desnaturando proteínas essenciais das células e rompendo a membrana celular<sup>6</sup>.

Outro importante agente químico utilizado para desinfecção de artigos e superfícies é o hipoclorito de sódio. Apesar do baixo custo, apresenta a desvantagem de ser muito instável, aspecto considerado crítico para assegurar a eficácia na desinfecção. Portanto, o controle da qualidade de tais produtos é fundamental para garantir

o teor de cloro ativo e a eficácia antimicrobiana, sendo que águas sanitárias e alvejantes à base de compostos liberadores de cloro são regulamentadas pela Resolução RDC nº 55/2009<sup>7</sup>, enquanto saneantes com ação antimicrobiana são regulamentados pelas Resoluções RDC nº 14/2007<sup>8</sup> e RDC nº 35/2010<sup>9</sup>.

Entre os esterilizantes químicos utilizados em ambientes hospitalares, pode ser citado o ácido peracético, utilizado para esterilização de materiais termossensíveis como, por exemplo, os cateteres. É reconhecido como esporicida em baixas concentrações e tem como principal vantagem o fato de seus produtos de decomposição serem ácido acético, água, oxigênio e peróxido de hidrogênio. Em altas concentrações, o ácido peracético é volátil, tem odor pungente e riscos de explosão e incêndio<sup>2</sup>.

Em relação aos antissépticos, podemos dizer que são formulações com função de eliminar ou inibir o crescimento de micro-organismos quando aplicados sobre a pele ou mucosas. Esses produtos podem ser classificados como agentes bactericidas, quando apresentam a capacidade de destruir bactérias nas formas vegetativas, ou como agentes bacteriostáticos, quando somente inibem o crescimento microbiano. Os antissépticos também apresentam uma atividade residual, ou seja, atividade química persistente sobre a pele<sup>6</sup>. O iodopovidona é um antisséptico de uso tópico à base de complexo povidona-iodo em solução aquosa, que se apresenta na concentração de 7,5% a 10%, sendo muito utilizado em curativos, queimaduras, traumatismo, ferimentos superficiais da pele e na antisepsia complementar do campo operatório, embora seja contraindicado em pessoas sensíveis, neonatais e gestantes devido à possibilidade de intoxicação pela presença do iodo. O iodo livre, responsável pela ação antimicrobiana decorrente da penetração na parede celular, oxidação e substituição do conteúdo microbiano, é liberado gradualmente em baixas concentrações, o que reduz sua toxicidade<sup>10,11</sup>. O peróxido de hidrogênio é outro um agente químico utilizado para assepsia, sendo que na diluição a 10% é altamente oxidante, ativo, mesmo em presença de matéria orgânica, e que age produzindo radical hidroxila livre, que ataca a membrana lipídica, o DNA e outros componentes essenciais à célula<sup>2,4</sup>.

A limpeza deve preceder os procedimentos de desinfecção ou esterilização, pois reduz a carga microbiana através da remoção de sujidades e matérias orgânicas presentes nos materiais. Estudos têm demonstrado que

a limpeza manual ou mecânica, com água e detergente ou produto enzimático, reduz aproximadamente  $10^5$  UFC da carga microbiana<sup>2</sup>. Os produtos para fins de limpeza em geral devem conter um agente tensoativo capaz de reduzir a tensão superficial ao estar dissolvido em água, sendo os mais utilizados os detergentes à base de tensoativo aniônico e os limpadores à base de tensoativo aniônico de um modo geral.

Considerando os produtos utilizados em hospitais da rede pública do Município de São Paulo, foi estabelecido o Programa de Monitoramento da Qualidade de Produtos Saneantes Domissanitários e de Antissepsia, entre o Instituto Adolfo Lutz (IAL) e a Coordenação de Vigilância em Saúde do Município de São Paulo (COVISA), em 2010, com os objetivos de monitorar a qualidade de saneantes e antissépticos utilizados em hospitais da rede pública do Município de São Paulo, avaliar a pós-comercialização desses produtos para detecção de problemas relacionados à saúde pública e dar subsídios para avaliar a adequação dos procedimentos utilizados nesses estabelecimentos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado em 54 amostras, das quais:

- Treze detergentes, sendo nove detergentes de uso geral à base de tensoativo aniônico e quatro detergentes multiuso à base de tensoativo não iônico e álcool isopropílico;
- Vinte e cinco antissépticos, sendo três à base de peróxido de hidrogênio, nove tinturas de iodo e treze à base de iodopovidona;
- Três esterilizantes químicos à base de ácido peracético; e
- Treze desinfetantes, sendo oito desinfetantes à base de quaternário de amônio – dos quais quatro eram concentrados e quatro foram previamente diluídos nos hospitais – e cinco desinfetantes à base de hipoclorito de sódio – dos quais, três eram produtos prontos para uso, um era concentrado e um foi previamente diluído nos hospitais. Considerando a categoria, oito eram desinfetantes de uso geral e cinco eram desinfetantes hospitalares para superfícies fixas.

Todas as amostras foram coletadas entre março e dezembro de 2010, sendo que aquelas prontas para

uso ou concentradas foram coletadas na modalidade de análise fiscal, e as amostras diluídas no estabelecimento hospitalar, para análise de orientação.

A determinação de pH foi obtida por leitura direta em potenciômetro digital<sup>12</sup>. A determinação dos tensoativos aniônicos e catiônicos foi realizada por titulometria de neutralização com o indicador de brometo dimídium e extração em clorofórmio, utilizando como titulante a Hyamina e o lauril sulfato de sódio, respectivamente<sup>13</sup>. O teor de cloro ativo foi determinado por iodometria, titulando o iodo livre com tiosulfato de sódio<sup>14</sup>. O teor de ácido peracético foi determinado por permanganometria e iodometria, sendo a amostra previamente diluída em meio ácido. O teor de peróxido de hidrogênio em amostras de água oxigenada foi determinado por titulação com solução de permanganato de potássio padronizada e o teor de iodo livre, em amostras de tinturas de iodo e iodopovidona foi determinado com solução padronizada de tiosulfato de sódio<sup>12</sup>.

As análises microbiológicas realizadas nos detergentes de uso geral e multiuso compreenderam: contagem de bactérias aeróbias mesófilas e contagem de bolores e leveduras, ambos pela técnica de semeadura em profundidade; determinação do número mais provável de coliformes totais e fecais, pela técnica de tubos múltiplos; e identificação de micro-organismos contaminantes, pela técnica de presença-ausência<sup>14</sup>.

Os produtos que declaravam em seu rótulo possuir atividade antimicrobiana foram avaliados pela metodologia da diluição de uso, que empregou 60 cilindros carreadores na execução dos ensaios. Foi considerado satisfatório o desinfetante capaz de eliminar os micro-organismos em 59 dos 60 cilindros carreadores utilizados, o que confere um nível de confiança de 95%<sup>15</sup>. Embora a Resolução RDC nº 14/2007<sup>8</sup> preconize que desinfetantes de uso geral sejam avaliados frente a *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Choleraesuis*, neste estudo, a eficácia antimicrobiana foi avaliada frente a *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Choleraesuis* e *Pseudomonas aeruginosa*, considerando serem produtos utilizados em hospitais. Os produtos com componente ativo à base de ácido peracético não foram avaliados quanto à atividade antimicrobiana.

A análise de rotulagem foi realizada para os produtos: ácido peracético, desinfetantes, detergentes multiuso e antissépticos, de acordo com o Decreto nº 79.094/1977<sup>16</sup>, com a Resolução RDC nº 14/2007<sup>8</sup>, Resolução RDC nº 40/2008<sup>17</sup>, Resolução RDC nº

55/2009<sup>7</sup>, Resolução RDC nº 59/2010<sup>5</sup> e Instrução Normativa nº 03/2009<sup>11</sup>. Os dizeres de rotulagem foram comparados àqueles aprovados no ato de notificação ou registro na ANVISA/MS.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As três amostras de esterilizantes a base de ácido peracético apresentaram resultados satisfatórios para os ensaios de determinação do composto ativo e análise de rotulagem.

As nove amostras de detergente de uso geral apresentaram resultados satisfatórios tanto na determinação do composto ativo como na análise de rotulagem. As quatro amostras de detergentes multiuso também apresentaram resultados satisfatórios na análise de rotulagem. Apesar de não haver legislação que defina parâmetros microbiológicos para este tipo de produto, das treze amostras de detergentes avaliadas, 30,8% apresentaram evidências de contaminação microbiana, provavelmente favorecida pelo pH próximo da faixa de neutralidade, entre 7,4 e 8,0. Nestas, foi detectada a presença de micro-organismos aeróbios, com cargas que variaram entre  $7,1 \times 10^2$  e  $2,8 \times 10^4$  UFC/mL para bactérias aeróbias e até  $1,1 \times 10^4$  UFC/mL para fungos. Em três dessas amostras foi verificada também a presença de *Pseudomonas* spp. Em estudo anterior, Bugno et al.<sup>18</sup> verificaram que 42% das amostras de saneantes avaliadas apresentaram contaminantes microbianos, sendo obtida carga média de  $8,1 \times 10^4$  UFC/mL para bactérias;  $7,0 \times 10^2$  UFC/mL para fungos;  $5,1 \times 10^4$  NMP/mL para coliformes totais e  $2,3 \times 10^3$  NMP/mL para coliformes fecais, além de terem sido detectadas *Pseudomonas* spp, *Staphylococcus* spp, *Klebsiella* spp e *Escherichia coli*, entre outras. A presença de micro-organismos constitui importante fator de risco à saúde, especialmente no ambiente hospitalar. Os resultados sugerem a necessidade de um programa de controle da contaminação nas várias etapas de produção e distribuição de produtos, como parte das Boas Práticas de Fabricação e Controle (BPF e C), com a finalidade de assegurar a qualidade e a segurança dos saneantes que estão sendo ofertados.

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos para as amostras de desinfetantes, das quais quatro amostras já se apresentavam prontas para uso (A), quatro amostras eram constituídas de produtos concentrados e que foram diluídas no laboratório, na concentração de uso recomendada pelo fabricante (B), e outras cinco amostras previamente diluídas nos hospitais (C) a partir do produto concentrado no momento de uso. Se considerado o total de amostras avaliadas, 61,5% apresentaram eficácia antimicrobiana. Entretanto, se consideradas somente as preparações diluídas no estabelecimento de saúde, 60% delas não evidenciaram atividade antimicrobiana satisfatória, ao passo que, quando foram diluídas no laboratório, conforme recomendação no rótulo do produto, apenas 25% delas não apresentaram atividade antimicrobiana adequada. Esses resultados indicam a importância do processo de preparo, que envolve manipulação e diluição da preparação original concentrada dos produtos a serem usados nos hospitais. Em geral, a preparação dessas soluções de uso é realizada por funcionários de empresas prestadoras de serviços de limpeza no hospital e por isso é fundamental capacitá-los adequada e constantemente, para exercerem essa atividade.

Com relação aos demais parâmetros, três amostras de desinfetante à base de quaternário de amônio apresentaram-se insatisfatórias: uma quanto ao teor de ativo, outra por apresentar valor de pH fora da especificação do fabricante e a terceira por apresentar número de registro no Ministério da Saúde no rótulo divergente do documento de notificação enviado pela ANVISA e página eletrônica<sup>19</sup>, porém essa situação foi regularizada após as ações de vigilância sanitária decorrentes desta análise.

Dados anteriores – provenientes de solicitações de análises encaminhadas pela Vigilância Sanitária e referentes a preparações de soluções de iodo em que havia suspeitas de desvio da qualidade ou aplicação inadequada dos produtos, por ocasionarem queimaduras na superfície da pele quando aplicado em procedimentos cirúrgicos – ocasionaram a realização do monitoramento desses produtos. Porém, todas as amostras analisadas

**Tabela 1.** Amostras insatisfatórias de desinfetantes quanto aos parâmetros avaliados

Desinfetante	Componente ativo		Nº de amostras insatisfatórias		
	Quaternário de amônio	Hipoclorito	Microbiologia	Química	Rotulagem
(A) Pronto uso	01	03	01	03 (quaternário)	-
(B) Diluído no laboratório	03	01	01 (quaternário)	-	01 (quaternário)
(C) Diluído no hospital	04	01	03 (quaternário)	-	-

quanto aos ensaios de teor, pH e rotulagem atenderam às especificações farmacopeicas, apresentando resultados satisfatórios. Portanto, as queixas decorrentes poderiam ser devido à hipersensibilidade do paciente ao produto, ou talvez devido a aplicações excessivas, ocasionando contato prolongado na pele. As amostras de água oxigenada analisadas, da mesma forma, apresentaram resultados satisfatórios, demonstrando conformidade com os parâmetros farmacopeicos.

Em atendimento aos parâmetros estabelecidos pela legislação sanitária pertinente a esses produtos, após receberem os laudos das análises físicas com resultados insatisfatórios, os técnicos da COVISA efetuaram interdição cautelar dos lotes por meio de publicação em Diário Oficial da Cidade de São Paulo, sendo que a rede hospitalar municipal foi orientada a manter os lotes segregados, caso ainda os tivessem em estoque, enquanto o fabricante recebeu orientação quanto aos procedimentos e prazos para solicitação de análise de contraprova. O Centro de Vigilância Sanitária do Estado de São Paulo (CVS), a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e as unidades hospitalares receberam os laudos de análises de contraprova efetuadas e, sendo confirmado o resultado insatisfatório, foi realizada a interdição definitiva do lote<sup>19-20</sup>.

Com relação às análises de orientação em amostras diluídas no estabelecimento hospitalar, os resultados obtidos permitiram à autoridade sanitária e aos hospitais avaliarem a adequação dos procedimentos utilizados na diluição dos produtos, para evitarem comprometimento da eficácia da desinfecção.

## CONCLUSÃO

O Programa de Monitoramento da Qualidade de Produtos Saneantes Domissanitários e de Antissepsia mostrou-se importante instrumento de intervenção proativa da autoridade sanitária ao verificar a qualidade de produtos pós-comercialização e contribuir para implementação de rotinas adequadas de limpeza e desinfecção em ambientes hospitalares.

A presença de contaminação microbiana evidenciou deficiências no atendimento às BPF e C, o que deve ser alvo de intervenções futuras das autoridades sanitárias, a fim de melhorar o perfil de qualidade de produtos saneantes.

Ressalta-se, ainda, que publicações de dados de programas de monitoramento de produtos submetidos

ao regime de vigilância sanitária são escassas no nosso país.

## REFERÊNCIAS

1. Padoveze MC, Assis DB, Freire MP, Madalosso G, Ferreira SA. Surveillance programme for healthcare associated infections in the State of São Paulo, Brazil. Implementation and the first three years' results. *J Hosp Infect*. 2010;76(4):311-5.
2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Curso Básico de Controle de Infecção Hospitalar: Caderno C – Métodos de Proteção anti-infecciosa [acesso 2011 ago 01]. Disponível em: [http://www.cvs.saude.sp.gov.br/pdf/CIHCadernoC.pdf].
3. Andrade D, Angerami ELS. Reflexões acerca das infecções hospitalares às portas do terceiro milênio. *Medicina*. 1999;32:492-7.
4. Kalil EM, Costa AJF. Desinfecção e esterilização. *Acta Ortop Bras*. 1994;2(4):1-4.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 59, de 17 de dezembro de 2010. Dispõe sobre os procedimentos e requisitos técnicos para a notificação e o registro de produtos saneantes. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília (DF); 22 dez 2010; Seção 1:80-2.
6. Merianos JJ. Quaternary Ammonium Antimicrobial Compounds. *In: Block SS. Disinfection, Sterilization, and Preservation*. Pennsylvania: Lea & Febiger; 1991. p.225-55.
7. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 55, de 10 de novembro de 2009. Dispõe sobre regulamento técnico para produtos saneantes categorizados como água sanitária e alvejante à base de hipoclorito de sódio ou hipoclorito de cálcio. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília (DF); 13 nov 2009; Seção 1:42.
8. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 14, de 28 de fevereiro de 2007. Aprova o regulamento técnico para produtos saneantes com ação antimicrobiana harmonizado no âmbito do Mercosul através da Resolução GMC nº 50/06. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília (DF); 05 mar 2007; Seção 1(Supl):2-4.
9. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 35, de 16 de agosto de 2010. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para produtos com ação antimicrobiana utilizado sem artigos críticos e semicríticos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília (DF); 18 ago 2010; Seção 1:44-6.
10. Center for Disease Control and Prevention – CDC. Guideline for hand hygiene in health-care settings. *MMWR*. 2002; 51(RR-16):1-45.
11. Brasil. Ministério da Saúde. Instrução Normativa nº 03, de 28 de abril de 2009. Dispõe sobre a atualização do Anexo I da Resolução – RDC nº 199 de 26 de outubro de 2006, e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília (DF); 29 abr 2009; Seção 1:53-60.
12. United States Pharmacopeia – USP. USP 32. 32. ed. Rockville: United States Pharmacopeias Convention; 2009.
13. Longman GF. *The Analysis of detergents and detergents products*. London: John Wiley & Sons; 1977.
14. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Farmacopeia Brasileira. 5. ed. Brasília (DF): Anvisa; 2010. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd\_farmacopeia/index.htm].

15. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS. 65.3210.007 – Método da diluição de uso. [acesso 2011 Nov 01]. Disponível em: [<http://eee.ebah.com.br/content/ABAAABDJYAD/incqs-65-3210-007-metodo-diluicao-uso>].
16. Brasil. Ministério da Saúde. Decreto nº 79.094, 05 de janeiro de 1977. Regulamenta Lei nº 6360 de 23 de setembro de 1976, que submetem a Sistema de Vigilância Sanitária os produtos de medicamentos, insumos farmacêuticos, drogas, correlatos, cosméticos, produtos de higiene, saneantes e outros. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília (DF); 7 jan 1977; Seção 1(Supl):11.
17. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 40, de 5 de junho de 2008. Aprova o regulamento técnico para produtos de limpeza e afins harmonizados no âmbito do Mercosul através da Resolução GMC nº 47/07. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília (DF); 06 jun 2008; Seção 1:57-8.
18. Bugno A, Buzzo AA, Pereira TC, Santa Bárbara MC. Contaminantes microbiológicos em detergentes e seus congêneres. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2003;62(1):27-30.
19. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Pesquisa da Notificação de Produtos Saneantes. [acesso 2011 Nov 1]. Disponível em: [<http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/Notificado/Saneantes/NotificadoSaneante.asp>].
20. Brasil. Lei nº 6.437, 20 de agosto de 1977. Configura infrações à legislação sanitária federal, estabelece as sanções respectivas, e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília (DF); 24 ago 1977; Seção 1.

## Características físico-químicas e atividade antioxidante total de pitaias vermelha e branca

### Physicochemical characteristics and total antioxidant activity of red and white pitaya

RIALA6/1518

Wilson César de ABREU\*, Cristiane de Oliveira LOPES, Kelly Moreira PINTO, Letícia Almeida OLIVEIRA, Gustavo Bacelar Moreira de CARVALHO, Maria de Fátima Piccolo BARCELO

\*Endereço para correspondência: Laboratório de Bioquímica da Nutricional, Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, CP 3037, CEP: 37200-000. Tel.: (35) 3829-1995. E-mail: wilson@dca.ufla.br

Recebido: 16.12.2011 – Aceito para publicação: 18.09.2012

#### RESUMO

Neste estudo, foram avaliadas as características físico-químicas e a atividade antioxidante total (AAT) da casca e da polpa das pitaias vermelha e branca. Foram determinadas a composição centesimal, vitamina C, fenólicos totais e AAT nas cascas e polpas das pitaias. A AAT foi determinada utilizando-se duas metodologias: sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e sequestro do radical DPPH. As cascas e as polpas das pitaias analisadas apresentaram alto teor de umidade e baixo teor de proteínas e lipídios. Os teores de fibra alimentar total (FAT) e cinzas foram significativamente maiores nas cascas das pitaias, e os teores de glicídios e energia foram maiores nas polpas. O teor médio de vitamina C variou de 17,73 a 20,69 (mg.100 g<sup>-1</sup>) nas polpas e de 22,21 a 24,05 (mg.100 g<sup>-1</sup>) nas cascas. A casca da pitaya vermelha demonstrou menor teor de fenólicos totais (77,22 mg EAG.100 g<sup>-1</sup>). As pitaias analisadas mostraram alta AAT pela metodologia de sistema betacaroteno/ácido linoleico e baixa AAT pela técnica de DPPH. A pitaya vermelha apresentou a maior AAT com destaque na sua polpa. O potencial antioxidante e as características químicas das pitaias vermelha e branca podem contribuir na dieta benéfica à saúde humana.

**Palavras-chave.** fruto do cerrado, atividade antioxidante, fenólicos, vitamina C.

#### ABSTRACT

This study aimed at evaluating the physicochemical characteristics and the total antioxidant activity (TAA) of the red and white pitayas peel and pulp. Centesimal composition, vitamin C, total phenolics and TAA were determined in pitayas pulp and peel samples. TAA was determined by using two methodologies:  $\beta$ -carotene/linoleic acid system and free DPPH radical for scavenging activity. Both the pitayas peels and pulps showed high moisture content and low protein and lipid contents. The total food fiber and ashes contents were significantly higher in pitayas peels, and the highest glucide contents and of energy were found in the pulps. The average contents of vitamin C ranged from 17.73 to 20.69 (mg.100 g<sup>-1</sup>) in pulps and from 22.21 to 24.05 (mg.100 g<sup>-1</sup>) in peel samples. The red pitaya peel showed the lowest total phenolics contents (77.22 mg EAG.100g<sup>-1</sup>). The pitayas samples demonstrated a high TAA in beta-carotene/linoleic acid system methodology and low TAA by DPPH. The red pitaya showed the highest TAA values, especially in pulp samples. The antioxidant and the chemical characteristics of the red and white pitayas may contribute to a beneficial diet for human health.

**Keywords.** cerrado fruit, antioxidant activity, phenolics, vitamin C.

## INTRODUÇÃO

A pitiaia é uma fruta exótica que pertence à família cactácea e ao gênero *Hylocereus*, com origem nas regiões de florestas tropicais do México, América Central e América do Sul. Encontra-se distribuída pela Costa Rica, Venezuela, Panamá, Uruguai, Brasil, Colômbia e México, sendo os dois últimos os maiores produtores mundiais<sup>1</sup>. Dentre as várias espécies de pitiaia, destacam-se a *Hylocereus polyrhizus* (pitaia vermelha de polpa vermelha) e a *Hylocereus undatus* (pitaia vermelha de polpa branca), que estão entre as mais produzidas e comercializadas, uma vez que apresentam sabor agradável com grande aceitação sensorial pelos consumidores<sup>2,3</sup>. No Brasil a produção ainda é pequena, sendo encontrada principalmente na região de Catanduva, no estado de São Paulo<sup>4</sup>. Entretanto, devido ao bom valor de mercado e ao crescente consumo de frutas exóticas, a produção de pitaias tem despertado o interesse de outros produtores<sup>5</sup>.

As pitaias têm sido relatadas como fontes de vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, betacaroteno, licopeno, vitamina E, polifenóis, ácido ascórbico, potássio, magnésio e carboidratos. O óleo presente nas sementes das pitaias contém cerca de 50% de ácidos graxos essenciais, sendo 48% de ácido linoleico e 1,5% de ácido linolênico<sup>6-8</sup>. Com o aumento do consumo das pitaias, é necessário investigar o potencial nutricional e funcional das diversas espécies, especialmente aquelas com maior produção e comercialização. As tabelas de composição química de alimentos disponíveis no Brasil ainda não dispõem de dados sobre a composição química desse fruto, limitando o conhecimento sobre a contribuição nutricional da pitiaia na dieta do brasileiro.

A presença de diversas substâncias antioxidantes na pitiaia, como o ácido ascórbico, carotenoides e polifenóis, tem despertado o interesse nesse fruto devido ao potencial efeito benéfico dessas substâncias para a saúde humana. O estresse oxidativo está associado ao aparecimento de várias doenças degenerativas, como o câncer e doenças cardiovasculares<sup>9</sup>. Alguns estudos têm demonstrado que a pitiaia apresenta boa capacidade antioxidante *in vitro*<sup>7,9,10</sup>. Entretanto, esse potencial antioxidante pode variar entre as diferentes espécies de pitiaia e as diferentes origens.

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização físico-química e determinar a capacidade antioxidante total da polpa (parte comestível – mesocarpo) e das cascas (potencialmente comestível – epicarpo) das pitaias branca e vermelha.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras

As pitaias vermelhas (*Hylocereus polyrhizus*) e brancas (*Hylocereus undatus*) foram adquiridas na Ceasa de Uberlândia, Minas Gerais, sendo provenientes do Estado de São Paulo. Os frutos foram higienizados e as partes deterioradas foram removidas e descartadas. A polpa foi separada da casca manualmente e as amostras foram homogeneizadas separadamente em mixer por 1 minuto.

### Determinação da composição centesimal e energia

A composição centesimal da polpa e da casca das pitaias foi determinada de acordo com os procedimentos da AOAC<sup>11</sup>. O teor de umidade foi determinado em estufa a 105 °C até peso constante; as proteínas, pelo método de Kjeldahl, sendo utilizado o fator 6,25 para calcular o teor proteico; os lipídios (o extrato etéreo) foram determinados pelo método de extração com éter etílico em aparelho de Soxhlet; e as cinzas, por processo gravimétrico, por meio da carbonização das amostras, seguida de incineração em mufla a 550 °C até peso constante. A fração glicídica (extrato não nitrogenado) foi obtida por diferença de massa. O teor FAT foi determinado de acordo com o método gravimétrico de Prosky<sup>11</sup>, que se baseia em análises enzimáticas e gravimétricas, utilizando o kit enzimático da marca Sigma. Todas as análises foram realizadas na casca e na polpa com seis replicatas.

O teor de energia foi calculado com base no teor de proteínas, carboidratos e lipídios das amostras, utilizando os fatores de Atwater descritos por Mahan e Escott-Stump<sup>12</sup>, conforme a equação seguinte:

$$E \text{ (kcal)} = (\text{proteína} \times 4,0) + (\text{carboidrato} \times 4,0) + (\text{lipídio} \times 9,0)$$

Os resultados foram expressos em quilocalorias (kcal).

### Determinação do teor de sólidos solúveis, pH e acidez titulável

O teor de sólidos solúveis totais foi determinado utilizando-se o refratômetro Atago, modelo N-1, homogenizando-se a amostra e transferindo 1 ou 2 gotas para o prisma do refratômetro, desprezando-se partículas grandes de polpa. Os resultados foram expressos em °Brix. O potencial hidrogeniônico foi medido em potenciômetro portátil marca Ingold, modelo pH206,

sendo os resultados expressos em unidades de pH. A acidez total titulável foi determinada por titulação com NaOH 0,1N, conforme descrito pelo Instituto Adolfo Lutz<sup>13</sup>. Os resultados foram expressos em mg de ácido cítrico.100 g<sup>-1</sup> de polpa.

#### Teor de açúcares

Açúcares totais foram determinados pelo método de Antrona, conforme procedimento descrito por Dische<sup>14</sup>. O extrato foi obtido a partir de 5 g de amostra com volume completado para 50 mL com álcool etílico 95%. Essa solução foi fervida por 30 minutos em chapa elétrica e mantida em repouso por 12 horas. Após o repouso, o extrato foi filtrado e o resíduo lavado com 50 mL de álcool etílico 95%. O sobrenadante foi evaporado em chapa elétrica até atingir aproximadamente 5 mL, que foi completado para 50 mL com água destilada. Em tubos de ensaio, 1 mL dos extratos diluídos foram pipetados juntamente com 2 mL de antrona (9,10-dihidro-9-oxoantraceno). Os tubos foram fervidos por 8 minutos. Após esfriar à temperatura ambiente, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis a 620 nm e os resultados foram expressos em porcentagem (%) de açúcar total na matéria seca.

#### Teor de vitamina C

O teor de vitamina C foi determinado pelo método colorimétrico com 2,4 dinitrofenilhidrazina, conforme Strohecker e Henning<sup>15</sup>. A leitura foi realizada em espectrofotômetro Beckman 640 B, com sistema computadorizado, e os resultados foram expressos em mg.100 g<sup>-1</sup> de polpa.

#### Teor de compostos fenólicos totais

Os extratos utilizados para determinação de fenólicos totais e da AAT foram obtidos conforme descrito a seguir: foram pesados 5 g das amostras das polpas ou das cascas das pitaias vermelha e branca, às quais foram adicionados 20 mL de álcool metílico 50%. Essa mistura foi homogeneizada e deixada em repouso por 1 hora, à temperatura ambiente. Após esse período, a mistura foi centrifugada a 23.723 g, por 17 minutos. O sobrenadante foi coletado e foram adicionados 20 mL de acetona 70% ao resíduo. Este foi homogeneizado, deixado em repouso por 1 hora e centrifugado a 23.713 g, por 17 minutos. O sobrenadante foi coletado, adicionado ao primeiro

sobrenadante e o volume foi completado para 50 mL com água destilada.

O teor de fenólicos totais foi determinado pelo método proposto por Waterhouse<sup>16</sup>, empregando-se o reagente de Folin-Ciocalteu. Em resumo, 0,5 mL de extrato de cada amostra foram adicionados aos tubos contendo 2,5 mL de solução de Folin-Ciocalteu 10% (v/v). Em seguida, foram adicionados 2 mL de solução de carbonato de sódio 4% (v/v). Os tubos foram agitados e deixados em repouso, por 120 minutos, ao abrigo da luz. A cor azul produzida pela redução do reagente Folin-Ciocalteu pelos fenólicos foi medida espectrofotometricamente, na faixa de absorção de 750 nm. O cálculo do teor de fenólicos foi realizado a partir da equação da reta obtida da curva padrão do ácido gálico. Os resultados foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico por 100 g da amostra (mg EAG.100 g<sup>-1</sup>).

#### Determinação da AAT

A AAT foi avaliada por dois métodos: o método do sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico. A determinação da AAT pelo método DPPH foi realizada de acordo com os procedimentos propostos por Rufino et al.<sup>17</sup>, com modificações. Foi adicionado 0,1 mL de cada extrato a 3,9 mL de solução de DPPH. As leituras foram realizadas após 30 min em espectrofotômetro a 515 nm e os resultados expressos em percentual de sequestro de radical livre (% SRL), conforme equação a seguir:

$$\% \text{ SRL} = (A_c - A_m) \cdot 100 / A_c, \text{ sendo:}$$

$A_c$  = absorbância do controle

$A_m$  = absorbância da amostra

Para determinar a AAT pelo método sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico adotou-se o método proposto por Rufino et al.<sup>18</sup>. Resumidamente, foram adicionados 0,4 mL de extrato das amostras a 5 mL de solução sistema constituída de  $\beta$ -caroteno, ácido linoleico e água oxigenada. As leituras foram realizadas nos tempos 2 min e 120 min em espectrofotômetro UV-Vis a 470 nm e os resultados expressos em percentual de inibição da oxidação do  $\beta$ -caroteno (% I), conforme equação a seguir:

$$\% \text{ I} = (A_c - A_m) \cdot 100 / A_c, \text{ sendo:}$$

$A_c$  = absorbância inicial do controle – absorbância final do controle

$A_m$  = absorbância inicial da amostra – absorbância final da amostra

## Análise Estatística

Os dados foram analisados utilizando-se o software SISVAR versão 5.0. Os dados foram submetidos à análise de variância e complementada pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, quando necessário.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

De modo geral, as cascas e as polpas das duas espécies de pitaias analisadas neste estudo apresentaram alto teor de umidade e baixo teor de proteínas e lipídios (Tabela 1). Segundo Le Bellec et al.<sup>19</sup>, o teor de umidade do mesocarpo (polpa) das pitaias variam de 82 a 88% e proteínas entre 0,3 e 1,5%. Os teores de FAT e cinzas foram significativamente maiores nas cascas das pitaias enquanto o teor de glicídios e energia foram maiores nas polpas. O maior teor de FAT foi encontrado na casca da pitaita vermelha e o menor teor na polpa da pitaita branca. O teor de FAT encontrado na polpa da pitaita, parte usualmente comestível, é superior ao encontrado em frutas como a maçã, papaia, manga, banana e laranja<sup>20</sup>. As polpas das pitaias analisadas apresentaram baixo teor de energia, sendo esta proveniente principalmente dos glicídios. A composição química das pitaias analisadas apresentou semelhanças com outros frutos do cerrado. O valor energético da pitaita foi semelhante ao encontrado por Silva et al.<sup>21</sup> para gabirola e murici; a umidade foi semelhante ao caju-do-cerrado, gabirola e puçá; o teor de glicídios foi semelhante a gabirola e mangaba; o teor de FAT foi semelhante a mangaba e pitomba; o teor de proteínas foi semelhante a cagaita, muriçã e puçá; e o teor de lipídios foi semelhante a cagaita, araca e puçã. A pitaita é um alimento com baixo valor energético e boa fonte de fibra alimentar, podendo contribuir para uma dieta saudável.

**Tabela 1.** Composição centesimal das pitaias branca (*Hylocereus undatus*) e vermelha (*Hylocereus polyrhizus*)

Variáveis	Pitaita branca		Pitaita vermelha	
	Casca	Polpa	Casca	Polpa
Umidade	86,89 ± 0,31 <sup>b</sup>	86,08 ± 0,15 <sup>c</sup>	89,46 ± 0,20 <sup>a</sup>	85,52 ± 0,61 <sup>c</sup>
Proteína	0,78 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,87 ± 0,05 <sup>b</sup>	0,66 ± 0,04 <sup>d</sup>	1,06 ± 0,08 <sup>a</sup>
Extrato etéreo	0,08 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,47 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,07 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,36 ± 0,01 <sup>b</sup>
FG	4,75 ± 0,23 <sup>c</sup>	10,05 ± 0,45 <sup>a</sup>	2,06 ± 0,30 <sup>d</sup>	9,36 ± 0,43 <sup>a</sup>
FAT**	5,89 ± 0,11 <sup>b</sup>	2,14 ± 0,40 <sup>d</sup>	6,81 ± 0,70 <sup>a</sup>	3,26 ± 0,47 <sup>c</sup>
Cinza	1,55 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,39 ± 0,05 <sup>c</sup>	1,04 ± 0,07 <sup>b</sup>	0,36 ± 0,01 <sup>c</sup>
Energia (Kcal)	23,08 ± 1,01 <sup>c</sup>	48,01 ± 1,77 <sup>a</sup>	11,58 ± 2,83 <sup>d</sup>	44,87 ± 4,51 <sup>a</sup>

Letras iguais na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; FG= fração glicídica, FAT= fibra alimentar total. Valores médios ± desvio padrão (n = 6).

A acidez titulável foi significativamente maior nas cascas das pitaias. Ao contrário, o teor de açúcares totais e os sólidos solúveis foram significativamente maiores nas polpas da pitaita (Tabela 2). A pitaita branca apresentou pH superior na polpa, enquanto na pitaita vermelha não houve diferença de pH entre a casca e a polpa. O teor de açúcares totais foi maior nas polpas das pitaias comparado às cascas. A polpa da pitaita branca apresentou o maior teor de açúcares totais. Dados da literatura mostram que o pH da polpa da pitaita varia de 4,3 a 4,7, e o teor de sólidos solúveis varia de 7 a 11 °Brix, semelhante aos resultados encontrados no presente estudo<sup>17</sup>. Wu et al.<sup>22</sup> encontraram valores de sólidos solúveis e açúcares totais em pitaias branca e vermelha superiores aos valores encontrados no presente estudo. Segundo os autores, os teores médios de sólidos solúveis foram iguais a 14,8 e 11,1%, e açúcares totais 13,9 e 10,1%, em pitaias brancas e vermelhas, respectivamente. Os principais açúcares presentes nas pitaias são a glicose e frutose. Wichienchot et al.<sup>8</sup> encontraram teor de glicose significativamente maior na pitaita vermelha e teor de frutose significativamente maior na pitaita branca. Segundo os autores, o somatório de glicose, frutose e oligossacarídeos foi semelhante entre as pitaias branca e vermelha.

**Tabela 2.** Valores médios de sólidos solúveis, acidez titulável e pH das pitaias branca (*Hylocereus undatus*) e vermelha (*Hylocereus polyrhizus*)

Variáveis	Pitaita Branca		Pitaita Vermelha	
	Casca	Polpa	Casca	Polpa
Sólidos Solúveis (°Brix)	3,66 ± 0,51 <sup>b</sup>	10,83 ± 0,40 <sup>a</sup>	2,16 ± 0,41 <sup>c</sup>	11,00 ± 0,01 <sup>a</sup>
Acidez Titulável *	0,52 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,20 ± 0,05 <sup>c</sup>	0,39 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,24 ± 0,04 <sup>c</sup>
pH	4,67 ± 0,03 <sup>c</sup>	5,32 ± 0,02 <sup>a</sup>	4,76 ± 0,03 <sup>bc</sup>	4,88 ± 0,12 <sup>b</sup>
Açúcares totais (g.100 g <sup>-1</sup> )	0,97 ± 0,04 <sup>c</sup>	8,45 ± 0,36 <sup>a</sup>	0,92 ± 0,01 <sup>c</sup>	7,93 ± 0,20 <sup>b</sup>

Letras iguais na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. \*resultado expresso em mg de ac.cítrico.100g<sup>-1</sup> fruto. Valores médios ± desvio padrão (n = 6).

A casca da pitaita branca apresentou maior teor de vitamina C e a casca da pitaita vermelha o menor teor de fenólicos totais. As polpas das duas espécies analisadas não apresentaram diferença significativa nos teores de vitamina C e fenólicos totais (Tabela 3). Os teores de vitamina C foram superiores aos encontrados por Beltrán-Orozco et al.<sup>7</sup>, que encontraram em média 13 mg.100 g<sup>-1</sup> em pitaias do gênero *Stenocereus*. Por

outro lado, Choo e Yong<sup>10</sup> encontraram teores médios de vitamina C iguais 32,65 e 31,05 mg.100 g<sup>-1</sup>, em pitais *H. polyrhizus* e *H. undatus*, respectivamente. Esses valores foram superiores aos teores encontrados no presente estudo. Em outro estudo, Mahattanatawee et al.<sup>9</sup> encontraram valores de vitamina C iguais a 55,8 e 13 mg.100 g<sup>-1</sup>, e fenólicos 107,5 e 52,3 mg EAG.100 g<sup>-1</sup> em pitaias *Hylocereus sp.*, cv. Red Jaina (pitaia vermelha de polpa vermelha) e *Hylocereus sp.*, cv. David Bowie (pitaia vermelha de polpa branca), respectivamente. Pode-se observar que os teores de vitamina C e fenólicos totais podem variar de acordo com a espécie, cultivar e origem. Os teores de vitamina C encontrados no presente estudo são semelhantes ao teor médio encontrado em frutos como tomate, manga, maracujá, jabuticaba, jaca, tangerina murcote e umbu<sup>20,23</sup>. Dessa forma, é importante caracterizar as pitaias cultivadas em solo brasileiro para conhecer o seu potencial nutricional e funcional. Considerando os resultados encontrados, o consumo de 100g de pitaia de polpa vermelha supre 23 e 27,6% das recomendações diárias de vitamina C para um homem e uma mulher adulta<sup>24</sup>.

**Tabela 3.** Teor de vitamina C e fenólicos totais da parte comestível das pitaias de polpa branca e vermelha.

Variáveis	Pitaia branca		Pitaia vermelha	
	Casca	Polpa	Casca	Polpa
Vitamina C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	24,05 ± 2,32 <sup>a</sup>	17,73 ± 0,80 <sup>b</sup>	22,51 ± 2,56 <sup>a</sup>	20,69 ± 2,02 <sup>ab</sup>
Fenólicos totais (mg EAG.100 g <sup>-1</sup> )	116,14 ± 2,05 <sup>a</sup>	118,18 ± 6,03 <sup>a</sup>	77,22 ± 2,23 <sup>b</sup>	124,55 ± 2,95 <sup>a</sup>

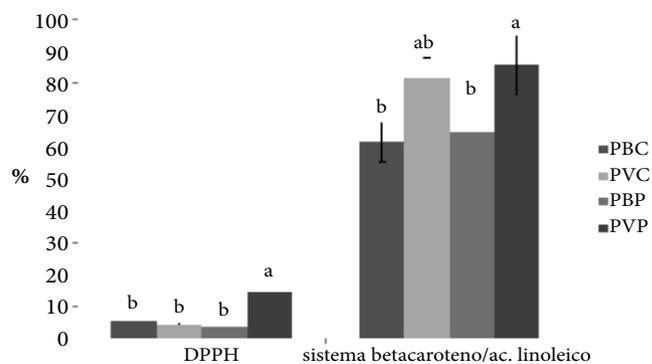
Letras iguais na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Valores médios ± desvio padrão (n = 6).

Lim et al.<sup>25</sup> e Wu et al.<sup>22</sup> encontraram teor médio de fenólicos totais em pitaias da polpa branca (21 mg.100 g<sup>-1</sup>) e vermelha (42 mg.100 g<sup>-1</sup>) inferiores aos encontrados no presente estudo. No entanto, Beltrán-Orozco et al.<sup>7</sup> encontraram teores de fenólicos totais em quatro espécies diferentes de pitaias superiores aos valores encontrados no presente estudo. Wu et al.<sup>22</sup> encontraram valores semelhantes de fenólicos totais nas cascas e polpa da pitaia vermelha, enquanto Choo e Yong<sup>10</sup> encontraram valores significativamente superiores nas polpas das pitaias vermelha e branca, comparados com as cascas. As diferenças no teor de fenólicos totais observadas em vários estudos provavelmente ocorreram devido

à utilização de frutos com diferentes origens e grau de maturação.

Na Figura 1, são apresentados os dados sobre a AAT das polpas e cascas das pitaias vermelhas e brancas medidas pelo método do DPPH e sistema betacaroteno/ácido linoleico.

As pitaias analisadas apresentaram alta AAT no método do sistema betacaroteno/ácido linoleico e baixa AAT no método do DPPH. A pitaia vermelha apresentou a maior AAT, com destaque para sua polpa. Isto pode estar associado ao alto teor de betacianinas presente na pitaia de polpa vermelha, uma vez que os teores de fenólicos e vitamina C encontrados na polpa dessa espécie de pitaia foram semelhantes aos teores encontrados na pitaia de polpa branca. Vaillant et al.<sup>26</sup> atribuíram a alta atividade antioxidante da pitaia vermelha ao seu alto conteúdo de compostos fenólicos e betacianinas. Choo e Yong<sup>10</sup> avaliaram as mesmas espécies de pitaias analisadas no presente estudo e não encontraram diferenças significativas na AAT das polpas das pitaias. Beltrán-Orozco et al.<sup>7</sup> avaliaram a AAT de pitaias vermelha e branca do gênero *Stenocereus*. Os autores observaram AAT significativamente maior na pitaia branca. Lim et al.<sup>25</sup> encontraram baixa AAT para pitaia *hylocereus undatus* utilizando o método do DPPH. Neste estudo, a pitaia apresentou menor teor de fenólicos totais e AAT entre nove frutos tropicais avaliados. A alta atividade antioxidante observada no método do sistema betacaroteno/ácido linoleico indica que o consumo dessas frutas pode contribuir para reduzir o risco de doenças associadas aos efeitos dos radicais livres.



PBC = pitaia branca casca, PVC = pitaia vermelha casca, PBP = pitaia branca polpa, PVP = pitaia vermelha polpa. Colunas com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Valores médios ± desvio padrão (n=6)

**Figura 1.** Capacidade antioxidante total da polpa e casca das pitaias vermelha e branca pelo método DPPH e Sistema betacaroteno/ácido linoleico.

## CONCLUSÃO

O consumo das duas espécies de pitais analisado no presente estudo pode contribuir para a composição de uma dieta saudável. A composição nutricional da polpa da pitáia vermelha mostrou-se levemente superior à polpa da pitáia branca. A casca da pitáia apresenta potencial de utilização na dieta humana constituindo importante fonte de fibras. Porém, é necessário investigar a possível presença de substâncias antinutricionais na casca da pitáia antes de recomendar seu consumo à população.

A pitáia vermelha apresentou o maior potencial antioxidante. Cabe ressaltar que as espécies de pitaias analisadas apresentaram expressiva AAT apenas pelo método sistema betacaroteno/ácido linoleico, sendo importante avaliar a capacidade antioxidante da pitáia utilizando outros métodos. O teor de fenólicos totais e vitamina C da pitáia podem contribuir para uma dieta benéfica à saúde humana devido a sua ação antioxidante.

## AGRADECIMENTO

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

- Mizrahi Y, Nerd A, Nobel PS. Cacti as crops. *Hort Rev*. 1997;18:291-320.
- Merten S. A review of *Hylocereus* production in the United States. *J PACD*. 2003;32(4):98-105.
- Junqueira KPJ, Faleiro FG, Junqueira NTV, Bellon G, Lima CA, Souza LS. Diversidade genética de itayas nativas do cerrado com base em marcadores RAPD. *Rev Bras Frutic*. 2010;32(3):819-24.
- Moreira RA, Ramos JD, Marques VB, Araújo NA, Melo PC. Crescimento de pitáia vermelha com adubação orgânica e granulada bioclástica. *Cienc Rural*. 2011;41(5):785-8.
- Bastos CD, Pio R, Scarpore Filho JA, Libardi MN, Almeida LFP, Galuchi TPD, et al. Propagação da pitáia vermelha por estaquia. *Ciênc Agrotecnol*. 2006;30(6):1106-9.
- Stintzing FC, Shieber A, Carle R. Evaluation of colour properties and chemical quality parameters of cactus juices. *Eur Food Res Technol*. 2003;216(4):303-11.
- Beltrán-Orozco MC, Oliva-Coba TG, Gallardo-Velázquez T, Osorio-Revilla G. Ascorbic acid, phenolic content, and antioxidant capacity of red, cherry, yellow and white types of pitaya cactus fruit (*Stenocereus stellatus* Riccobono). *Agrocienc*. 2009;43(2):153-62.
- Wichienchot S, Jatupornpipat M, Rastall RA. Oligosaccharides of pitaya (dragon fruit) flesh and their prebiotic properties. *Food Chem*. 2010;120(3):850-7.
- Mahattanatawee K, Manthey JA, Luzio G, Talcott ST, Goodner K, Balswin EA. Total antioxidant activity and fiber content of select Florida-grown tropical fruits. *J Agric Food Chem*. 2006;54(19):7355-63.
- Choo WS, Yong WK. Antioxidant properties of two species of *Hylocereus* fruits. *Adv Appl Sci Res*. 2011;2(3):418-25.
- Association of Official Analytical Chemists. Official methods of the Association of the Agricultural Chemists. Washington; 1998. 1094p.
- Mahan LK, Escott-Stump S. Alimentos, nutrição & dietoterapia. 11. ed. São Paulo: Roca; 2005.
- Instituto Adolfo Lutz. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3. ed. São Paulo; 1985. 371p.
- Dische Z. General color reactions. In: Whistler RL, Wolfran ML. Carbohydrate chemistry. New York: Academic; 1962. p.477-512.
- Strohecker RL, Henning HM. Analisis de vitaminas: métodos comprobados. Madri: Paz Montalvo; 1967. 428p.
- Waterhouse AL. Polyphenolics: determination of total phenolics. In: Wrolstad RE. Current protocols in food analytical chemistry. New York: J. Wiley; 2002. p. 11-8.
- Rufino MSM, Alves RE, Brito ES, Morais SM, Sampaio CG, Pérez-Jiménez J, et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. *EMBRAPA Com Téc*. 2007;127:1-4.
- Rufino MSM, Alves RE, Brito ES, Filho JM, Moreira AVB. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas no sistema  $\beta$ -caroteno/Ácido Linoléico. *EMBRAPA Com Téc*. 2006;126:1-4.
- Le Bellec F, Vaillant F, Imbert E. Pitahaya (*Hylocereus* spp.): a new fruit crop, a market with a future. *Fruits*. 2006;61(4):237-50.
- Tabela Brasileira de composição de alimentos. Campinas: NEPA/UNICAMP; 2006. 105p.
- Silva MR, Lacerda DBCL, Santos GG, Martins DMO. Caracterização Química de Frutos Nativos do Cerrado. *Cienc Rural*. 2008;38(6):1790-3.
- Wu LC, Hsu HW, Chen YC, Chiu CC, Lin YL, Ho JA. Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya. *Food Chem*. 2006;95(2):319-27.
- Couto MAL, Canniatti-Brazaca SG. Quantificação de vitamina C e capacidade antioxidante de variedades cítricas. *Ciênc Tecnol Alim*. 2010;30 Supl 1:15-9.
- Institute of Medicine/Food and Nutrition Board. Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. Washington: National Academy Press; 2000. 529p.
- Lim YY, Lim TT, Tee JJ. Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. *Food Chem*. 2007;103:1003-8.
- Vaillant F, Ana P, Indiana D, Manuel D, Max R. Colorant and antioxidant properties of red-purple pitahaya (*Hylocereus* sp.). *Fruits*. 2005;60(1):3-12.

# Ácido ascórbico, carotenoides, fenólicos totais e atividade antioxidante em sucos industrializados e comercializados em diferentes embalagens

## Ascorbic acid, carotenoids, total phenolics and antioxidant activity in industrialized juices sold in different packaging

RIALA6/1519

Samanta Thomas VALDÉS<sup>1</sup>, Maria das Graças VAZ TOSTES<sup>2</sup>, Ceres Mattos DELLA LUCIA<sup>1</sup>, Fabiana Rossi HAMACEK<sup>1</sup>, Helena Maria PINHEIRO-SANT'ANA<sup>1\*</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Departamento de Nutrição e Saúde, Universidade Federal de Viçosa, Campus Universitário S/N, Prédio CCB II, 5º andar, Viçosa, MG, Brasil, CEP: 36570-000. Tel./Fax: (31) 3899-3731/3899-2569/3899-2541. E-mail: helena.santana@ufv.br.

<sup>2</sup>Departamento de Farmácia e Nutrição, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, Brasil. Recebido: 26.10.2012 – Aceito para publicação: 28.12.2012

### RESUMO

Objetivou-se determinar o teor de ácido ascórbico (AA), carotenoides, fenólicos totais e atividade antioxidante em sucos de frutas comercializados em diferentes embalagens. Foram avaliados sucos industrializados dos sabores goiaba e uva de duas marcas (marca A: embalagem plástica e *tetrapak*; marca B: embalagem em lata, vidro e *tetrapak*). Os teores de AA e carotenoides foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A atividade antioxidante foi avaliada pelo teste de DPPH e fenólicos totais foram determinados utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu. O suco de goiaba da marca A em embalagem *tetrapak* apresentou maiores teores de licopeno ( $2,01 \pm 1,61$  mg/100 mL), enquanto o suco da marca B apresentou maiores teores de AA ( $22,1 \pm 2,0$  mg/100 mL) e  $\beta$ -caroteno ( $4,09 \pm 0,54$  mg/100 mL). Para ambos os sabores, os sucos da marca B obtiveram os maiores valores de atividade antioxidante e de fenólicos totais, sendo que para o sabor goiaba os maiores valores foram encontrados em embalagem de vidro, enquanto que para o sabor uva obtiveram-se maiores valores em embalagem *tetrapak*. Observou-se que diferentes marcas de sucos apresentaram diferentes conteúdos dos componentes avaliados e que a embalagem tem grande influencia no valor nutricional dos sucos, sendo a embalagem *tetrapak* a que apresentou os melhores resultados.

**Palavras-chave.** valor nutritivo, ácido ascórbico, betacaroteno, embalagem de produtos.

### ABSTRACT

We aimed to determine the content of ascorbic acid (AA), carotenoids, total phenolics and antioxidant activity in fruit juices sold in different packaging. We evaluated industrialized juices of guava and grape flavors of two brands (brand A: *tetrapak* and plastic packaging, brand B: tin, glass and *tetrapak*). The levels of AA and carotenoids were determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The antioxidant activity was evaluated by DPPH test and total phenolics were determined using Folin-Ciocalteu. Guava juice of brand A in the *tetrapak* packaging showed higher levels of lycopene ( $2.01 \pm 1.61$  mg/100 mL), while the juice of brand B showed higher levels of AA ( $22.1 \pm 2.0$  mg/100 mL) and  $\beta$ -carotene ( $4.09 \pm 0.54$  mg/100 mL). For both flavors, juice of brand B had the highest values of antioxidant activity and phenolic compounds, and for the guava flavor, the highest values were found in glass packaging, while for the grape flavor, we obtained higher values on *tetrapak* packaging. It was observed that different brands had different contents of the components evaluated and that the packaging has great influence on the nutritional value of juices, with the *tetrapak* packaging showing the best results.

**Keywords.** nutritive value, ascorbic acid, beta-carotene, product packaging

## INTRODUÇÃO

O número de consumidores que procuram por produtos seguros, frescos e com alegações funcionais tem aumentado continuamente, o que tem elevado o consumo de sucos e bebidas à base de frutas. Além disso, esses produtos também são apreciados pelas suas propriedades sensoriais e grande variedade de sabores<sup>1-3</sup>. Outros aspectos que têm contribuído para o aumento do consumo de sucos de frutas processados são a falta de tempo para preparar sucos *in natura*, a praticidade, a substituição ao consumo de bebidas carbonatadas e a preocupação com o consumo de alimentos mais saudáveis<sup>3</sup>. Nesse sentido, vários sucos de frutas têm conquistado a preferência dos consumidores, como o suco de goiaba e de uva.

A goiaba (*Psidium guajava*, L.) é um dos frutos de maior importância nas regiões tropicais e subtropicais, devido ao seu elevado valor nutritivo, sua excelente aceitação, sua capacidade de cultivo em condições adversas e pela grande aplicação industrial, sendo utilizada na fabricação de vários produtos, como sucos industrializados<sup>4</sup>. Esse fruto possui alto valor nutricional, sendo rico em vitamina C, licopeno e compostos fenólicos e alta atividade antioxidante<sup>5,6</sup>.

As uvas e seus produtos, por sua vez, são muito bem aceitos pelo consumidor brasileiro, sendo que o consumo de suco de uva no Brasil aumentou significativamente nos últimos anos<sup>7</sup>. O consumo de uva e seus produtos é estimulado pela *American Dietetic Association* (ADA), que considera o vinho tinto e o suco de uva como bebidas com evidências “moderadas a fortes” na prevenção da agregação plaquetária em ensaios *in vitro*, *in vivo* e em estudos epidemiológicos. Apesar de as evidências científicas ainda não permitirem consenso sobre o consumo desejável, o documento sugere como recomendação a ingestão diária de 250 a 500 mL de suco de uva<sup>8</sup>.

O consumo desses alimentos processados também é estimulado pelo alto valor nutritivo agregado, uma vez que apresentam compostos fenólicos que possuem importante atividade antioxidante<sup>9</sup>. A função antioxidante desses compostos é resultante da combinação entre propriedades quelantes e captação de radicais livres, bem como pela inibição de enzimas oxidativas<sup>10</sup>. As frutas, principalmente as de coloração vermelha/azul, são as mais importantes fontes de compostos fenólicos da dieta, os quais apresentam vários efeitos biológicos incluindo ações antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e vasodilatadora<sup>11</sup>.

Outro grupo de compostos encontrados em muitos alimentos de origem vegetal, principalmente aqueles de coloração amarela, laranja e vermelha, são os carotenoides. Esses compostos têm sido relacionados à diminuição do risco de câncer e doenças cardiovasculares<sup>12</sup>. A vitamina C, presente em frutas e hortaliças, desempenha funções biológicas relacionadas ao sistema imune, formação de colágeno, absorção de ferro, inibição da formação de nitrosaminas e atividade antioxidante<sup>13</sup>.

Apesar do alto conteúdo nutricional das frutas, os sucos de frutas industrializados são acondicionados em diferentes embalagens, que podem alterar seu valor nutricional. Contudo, as embalagens podem contribuir para a qualidade final do suco, uma vez que têm a função de conter o produto de forma a protegê-lo de contaminações externas, minimizar interações prejudiciais e prolongar a vida de prateleira<sup>14</sup>. No Brasil, no segmento de mercado de sucos estáveis à temperatura ambiente, são usados tradicionalmente frascos de vidro e embalagens cartonadas de acondicionamento asséptico<sup>15</sup>. Se mantidos em temperatura ambiente e embalados adequadamente, a vida de prateleira desses produtos é superior a um ano<sup>16</sup>, uma vez que os aspectos microbiológicos e enzimáticos estão devidamente controlados, evitando reações que comprometam a qualidade sensorial e nutricional do produto<sup>17</sup>.

Apesar de serem fontes de nutrientes, pouco se sabe a respeito do quanto os sucos industrializados podem conservar o seu valor nutritivo, pois a qualidade da fruta diminui rapidamente após a colheita e é afetada por todo o seu histórico ao longo do processamento até o consumo<sup>18</sup>. Embora o interesse pelo produto e o consumo de sucos industrializados tenha aumentado, são escassos os estudos que avaliaram o impacto da embalagem sobre o conteúdo de nutrientes, atividade antioxidante e fenólicos totais de sucos industrializados produzidos no Brasil.

Desta forma, o presente trabalho objetivou determinar o teor de ácido ascórbico (AA), carotenoides, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante em sucos de goiaba e uva industrializados e comercializados em diferentes embalagens.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material

Foram utilizados sucos industrializados dos sabores goiaba e uva, de duas marcas (A e B), envasados

em embalagens encontradas no comércio local. Foram selecionadas estas marcas por apresentarem mais de uma forma de envase para os mesmos sabores de sucos, o que permitiu a comparação entre diferentes marcas com os mesmos tipos de envases e sucos de mesmo sabor. Para a marca A, foram analisados os envases plástico e *tetrapak*; para a marca B, foram analisados os envases lata, vidro e *tetrapak*. As embalagens plástica e *tetrapak* continham 1 litro cada, as embalagens de lata e vidro continham 350 mL. O suco da marca A envasado na embalagem de plástico era concentrado e foi diluído conforme instruções do fabricante (7 partes de água para 1 de suco) para realizar as análises. Nas demais embalagens, o suco estava sob a forma pronta para consumo. As amostras foram transportadas em caixas de papelão até o Laboratório de Análise de Vitaminas do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa, onde foram realizadas as análises.

#### Reagentes e outros materiais

Para preparo das amostras, foram utilizados os seguintes reagentes com grau analítico: acetona e éter de petróleo, da Alphatec; ácido metafosfórico, da Proquimius; ácido acético, da Vetec; ácido sulfúrico 90% da Mallinckrodt Chemicals, USA; EDTA e água ultrapura tipo Milli Q<sup>®</sup>. Para filtração das amostras, foi utilizado papel de filtro livre de cinzas Inlab, tipo 50, 9 cm de diâmetro; seringas descartáveis esterilizadas de 5 mL, da Plastipack 25 x 7, parede fina 22G1; e unidades filtrantes HV Millex, em polietileno, 0,45 mm de porosidade da Millipore, Brasil. Para preparação da fase móvel para análise de carotenoides, foram utilizados metanol da Tedia, USA; acetonitrila da Tedia, USA; e acetato de etila da Tedia, todos grau HPLC. Para preparação da fase móvel para análise de AA, foram utilizados o fosfato de sódio monobásico anidro da Synth; ácido fosfórico da Proquimius; EDTA e água ultrapura tipo Milli Q<sup>®</sup>.

#### Extração e análise de carotenoides e AA

O processo de extração de carotenoides foi realizado de acordo com Rodriguez et al.<sup>19</sup>, com algumas modificações conforme segue: cerca de 5 mL das amostras foram misturados com 60 mL de acetona refrigerada (dividida em três volumes de 20 mL) e homogeneizadas em microtritador por aproximadamente 5 min. O material foi filtrado a vácuo em funil de Büchner, utilizando-se papel de filtro. Em seguida, o filtrado foi transferido, aos poucos, para um funil de separação, onde

foram adicionados 50 mL de éter de petróleo refrigerado, para a transferência dos pigmentos da acetona para o éter. Cada fração foi lavada com água destilada 3 vezes para retirar toda a acetona. A concentração do material foi feita por evaporação do extrato em éter de petróleo usando evaporador rotativo em temperatura de 37 °C. Os pigmentos foram, então, redissolvidos em quantidade conhecida de éter de petróleo (25 mL) e armazenados em frascos de vidro âmbar a -5 °C até a análise dos carotenoides.

O processo de extração de AA foi baseado em metodologia proposta por Campos et al.<sup>20</sup>. Cerca de 5 mL de amostra foram misturados com 15 mL de solução extratora contendo ácido metafosfórico 3%, ácido acético 8%, ácido sulfúrico 0,3 N e EDTA 1 mM, por aproximadamente 5 min e filtrada a vácuo em funil de Büchner, utilizando papel de filtro. O filtrado foi transferido para um balão volumétrico de 25 mL e o volume completado com água ultrapura. Centrifugou-se o filtrado por 15 min com velocidade de 4.000 rpm (1.789 g) e armazenou-se os extratos das amostras em  $6 \pm 2$  °C até o momento da análise.

Tanto o AA quanto os carotenoides foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para análise de carotenoides, alíquotas de 2 mL do extrato de suco de goiaba e 8 mL do extrato de suco de uva foram evaporadas sob fluxo de nitrogênio, sendo o resíduo seco redissolvido em 2 mL de metanol. Os extratos foram filtrados em unidades filtrantes com porosidade de 0,45 µm, sendo injetados 50 µL na coluna cromatográfica para análise. As análises de carotenoides seguiram as condições cromatográficas desenvolvidas por Pinheiro-Sant'Ana et al.<sup>21</sup>, as quais incluíram: sistema CLAE acoplado a detector de arranjos de diodos e coluna RP-18 Phenomenex Gemini, 250 x 4,6 mm, 5 µm, munida de coluna de guarda Phenomenex ODS (C18), 4 mm x 3 mm. Utilizou-se fase móvel composta de metanol:acetato de etila:acetonitrila (70:20:10, v/v/v) com fluxo de 2,0 mL/min.

Para análise do AA, as condições cromatográficas utilizadas foram: sistema CLAE acoplado a detector de arranjos de diodo e coluna RP-18 Lichrospher 100, 250 x 4 mm, 5 µm. Utilizou-se fase móvel composta por água ultrapura contendo 1 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1mM de EDTA e pH ajustado para 3,0 com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, com fluxo de 1,0 mL/min.

A análise qualitativa foi feita a partir da comparação entre os tempos de retenção e espectros de

absorção dos picos dos padrões de AA e carotenoides com as amostras de sucos, analisados sob as mesmas condições. Para a análise quantitativa utilizou-se curvas analíticas a partir de concentrações crescentes dos padrões autênticos dos compostos analisados.

#### Determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

A avaliação do limite de detecção (LD) foi realizada por diluições sucessivas dos padrões de  $\beta$ -caroteno, licopeno e AA nos sucos, seguida da determinação da menor quantidade detectável como sendo três vezes o valor da amplitude do ruído da linha de base ( $S/R \geq 3$ ). O limite de quantificação (LQ) foi considerado como sendo 10 vezes o LD<sup>22</sup>.

#### Análise de fenólicos totais e atividade antioxidante

Para obtenção do extrato utilizado na análise da atividade antioxidante e de fenólicos totais, tomou-se 0,2 mL da amostra e adicionou-se 10 mL de solução de metanol 60%. O extrato foi colocado em *shaker* por 30 min e posteriormente foi centrifugado por 10 min. O sobrenadante foi, então, transferido para um tubo de 10 mL que foi completado com metanol 60%.

Para avaliação da atividade antioxidante utilizou-se o teste de 1,1 Diphenyl-2-terrylhydrazyl radical (DPPH), conforme descrito a seguir: pipetou-se 100  $\mu$ L do extrato, adicionou-se 1,5 mL de solução metabólica de DPPH 0,1mM e agitou-se em vórtex por 1 min. Posteriormente, o extrato foi colocado em repouso para leitura da absorvância em espectrofotômetro a 517 nm<sup>23</sup>. Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

Para a análise de fenólicos totais, pipetou-se 500  $\mu$ L do extrato, adicionou-se 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu e 0,5 mL de solução de carbonato de sódio 7,5%, com posterior agitação em vórtex. Em seguida, o extrato foi incubado por 30 min para posterior leitura da absorvância a 765 nm<sup>24</sup>. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico em 100 g de amostra.

#### Delineamento experimental e análise estatística dos dados

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com 3 repetições, teste de Shapiro-Wilk ( $\alpha = 5\%$ ) para testar a homogeneidade das variâncias, a análise de variância (ANOVA) e o teste de Duncan ( $\alpha = 5\%$ ) para comparar as médias entre as variáveis analisadas. O software *Statistical Analysis System* (SAS), versão 9.4 (2008), licenciado para a UFV, foi utilizado para as análises estatísticas.

#### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 encontram-se os teores de carotenoides e AA dos sucos de goiaba e uva industrializados.

Pode-se observar a presença de licopeno em todas as amostras de sucos de goiaba, enquanto o  $\beta$ -caroteno não foi encontrado apenas no suco envasado na embalagem *tetrapak* da marca A. Nos sucos da marca B, foram detectados conteúdos de  $\beta$ -caroteno significativamente maiores em todas as embalagens quando comparados aos sucos da marca A. Para o licopeno, os sucos da marca A apresentaram as maiores concentrações ( $p < 0,05$ ) na embalagem *tetrapak*, contudo, quando avaliado o

**Tabela 1.** Conteúdo de carotenoides e ácido ascórbico (AA) em sucos de goiaba e uva de duas marcas, envasados em diferentes embalagens

Marca A	Suco de Goiaba			Suco de Uva		
	$\beta$ -caroteno (mg/100 mL)	Licopeno (mg/100 mL)	AA (mg/100 mL)	$\beta$ -caroteno (mg/100 mL)	Licopeno (mg/100 mL)	AA (mg/100 mL)
Tetrapak	ND	2,01 $\pm$ 1,61 <sup>a</sup>	10,3 $\pm$ 7,9b <sup>c</sup>	ND	ND	ND
Plástico	0,97 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	0,02 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	1,77 $\pm$ 0,4 <sup>c</sup>	ND	0,02 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	ND
Marca B	$\beta$ -caroteno (mg/100 mL)	Licopeno (mg/100 mL)	AA (mg/100 mL)	$\beta$ -caroteno (mg/100 mL)	Licopeno (mg/100 mL)	AA (mg/100 mL)
Tetrapak	4,90 $\pm$ 0,54 <sup>a</sup>	0,44 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	22,1 $\pm$ 2,0 <sup>a</sup>	0,12 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	0,02 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	8,1 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>
Lata	4,25 $\pm$ 1,26 <sup>a</sup>	0,59 $\pm$ 0,28 <sup>b</sup>	17,8 $\pm$ 8,0 <sup>ab</sup>	ND	0,02 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	7,8 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>
Vidro	5,79 $\pm$ 3,00 <sup>a</sup>	0,53 $\pm$ 0,30 <sup>b</sup>	9,2 $\pm$ 0,7 <sup>bc</sup>	ND	ND	10,1 $\pm$ 4,2 <sup>a</sup>

Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

Médias nas colunas com letras diferentes são significativamente diferentes pelo teste de Duncan ( $p < 0,05$ ).

ND: Não detectado.

Limites de detecção para  $\beta$ -caroteno, licopeno e AA: 6,42; 5,31 e 12,32  $\mu$ g/mL, respectivamente.

Limites de quantificação para  $\beta$ -caroteno, licopeno e AA: 64,22; 53,12 e 123,21  $\mu$ g/mL, respectivamente.

conteúdo dos dois carotenoides estudados (licopeno e  $\beta$ -caroteno), os sucos da marca B obtiveram as maiores concentrações. Corroborando com os achados do presente trabalho, Oliveira et al.<sup>25</sup>, em trabalho similar, não observaram diferenças significativas entre o conteúdo de  $\beta$ -caroteno de sucos de manga comercializados em embalagens de vidro e *tetrapak*.

Em relação aos carotenoides presentes no suco de uva, foi detectada pequena quantidade de  $\beta$ -caroteno nos sucos envasados na embalagem *tetrapak* da marca B. O licopeno também foi encontrado em reduzidas concentrações nos sucos envasados nas embalagens plásticas da marca A e nas embalagens *tetrapak* e lata da marca B.

No suco de goiaba foi encontrado AA em todas as embalagens estudadas, sendo que, tanto para a marca A quanto para a B, os sucos envasados nas embalagens *tetrapak* apresentaram as maiores concentrações desse nutriente ( $10,3 \pm 7,9$  e  $22,1 \pm 2,0$  mg/100 mL de suco, respectivamente). Em estudo que comparou três marcas comerciais de sucos de caju industrializados prontos para beber, foram verificadas concentrações de AA iguais a  $43,1 \pm 0,7$  mg/100 mL para a marca 1;  $37,3 \pm 0,7$  mg/100 mL para a marca 2; e  $46,3 \pm 0,7$  mg/100 mL para a marca 3<sup>26</sup>. O mesmo estudo relata que, nas marcas concentradas e diluídas conforme recomendações do fabricante, foram encontrados teores de AA variando entre  $75,7 \pm 0,68$  e  $152,0 \pm 0,68$  mg/100 mL<sup>26</sup>.

AA não foi encontrado nos sucos de uva da marca A, em nenhuma das embalagens avaliadas. Na marca B, esse nutriente esteve presente, mas o conteúdo encontrado pode ser também resultante da adição de AA pelo fabricante, conforme declarado no rótulo do produto. Em estudo no qual o conteúdo de vitamina C foi avaliado em três marcas de sucos de uva industrializados, foram verificados valores mais elevados de vitamina C, em relação aos observados no presente estudo, com concentrações de 16,79; 21,33 e 24,29 mg/mL de AA nas marcas A, B e C, respectivamente, indicando que existe grande variação desse nutriente, de acordo com as marcas analisadas<sup>27</sup>. Essa variabilidade pode ocorrer devido às diferentes condições de processamento adotadas por cada fabricante, ao grau de maturação das frutas utilizadas e fatores como temperatura e exposição à luz no transporte e armazenamento dos sucos<sup>5</sup>.

A comparação do teor de nutrientes entre diferentes embalagens utilizadas no armazenamento de sucos é importante, uma vez que, dependendo do tipo de envase utilizado e das condições utilizadas no

processamento, o conteúdo nutricional do suco pode suprir as recomendações nutricionais do indivíduo em uma única porção do produto. É o que se verifica no suco de goiaba da marca B, envasado em embalagem de vidro, em que o consumo de apenas uma porção de 150 mL do mesmo ultrapassa as recomendações de vitamina A para todas as faixas etárias, atingindo 361,8%; 187,9%; 160,8% e 206,7% das recomendações diárias para crianças, gestantes, homens e mulheres adultos, respectivamente. A deficiência de vitamina A e seus precursores, muito prevalente em países em desenvolvimento<sup>28</sup> devido à baixa ingestão de frutas e vegetais que contenham esses nutrientes<sup>29</sup>, poderia ser amenizada com o consumo diário de 1 copo de suco de goiaba, garantindo inclusive aporte nutricional acima do preconizado para uma dieta balanceada.

O valor de vitamina A foi calculado segundo as recomendações do Institute of Medicine<sup>30</sup>, em que 1 Equivalente de Atividade de Retinol (RAE) equivale a 1  $\mu$ g de retinol; 6  $\mu$ g de  $\beta$ -caroteno; 12  $\mu$ g de outros carotenoides pró-vitâmicos.

Para o AA, a maior contribuição para as necessidades desse nutriente foi observada nas embalagens *tetrapak* de ambas as marcas, sendo que uma porção de 150 mL do suco de goiaba da marca B pode contribuir com 132,6%; 39,0%; 36,8% e 44,2% das recomendações nutricionais para crianças, gestantes, homens e mulheres adultos, respectivamente. Verifica-se que o mesmo tipo de embalagem (*tetrapak*) e sabor da marca A contribuiu com apenas 61,80% das recomendações para crianças, 18,18% para gestantes, 17,16% para homens e 20,59% para mulheres. Sendo assim, os sucos de mesmo sabor e envasados nos mesmos tipos de embalagem, mas de diferentes marcas, podem apresentar grandes variações em relação à adequação nutricional de determinado nutriente. Apenas o suco de uva da marca B continha AA, uma vez que os fabricantes adicionaram esse nutriente ao seu produto, tendo maior contribuição para a adequação nutricional o suco envasado na embalagem de vidro, o qual contribuiu com 60,6%; 17,8%; 16,83% e 20,2% das recomendações nutricionais para crianças, gestantes, homens e mulheres adultos, respectivamente. Apesar da elevada variabilidade desse nutriente nos sucos de uva e goiaba nas embalagens analisadas, a deficiência de vitamina C não é considerada um problema de saúde pública, uma vez que esse nutriente é bem distribuído entre os alimentos<sup>13</sup> e a necessidade nutricional diária é pequena<sup>16</sup>. Entretanto, sua ingestão em níveis

adequados protege o DNA, o LDL e as proteínas do dano oxidativo<sup>25</sup>. Os dados referentes ao conteúdo de fenólicos totais e avaliação da atividade antioxidante dos sucos analisados no presente estudo podem ser observados na Tabela 2.

O teor de fenólicos totais do suco de goiaba foi semelhante entre as amostras das diferentes marcas e embalagens. No entanto, os teores encontrados foram inferiores aos relatados por Kuskoski et al.<sup>31</sup>, em estudo que avaliou o conteúdo de fenólicos totais em polpa de goiaba congelada, a qual apresentou  $83,0 \pm 1,3$  mg de ácido gálico/100 g. Outros trabalhos que também avaliaram o teor de fenólicos totais na goiaba fresca relataram conteúdos de 72,2 mg de ácido gálico/100 g<sup>32</sup>, 148 mg/100 g<sup>33</sup>, 138 mg/100 g<sup>34</sup> e 159,8 mg/100 g<sup>5</sup>, valores também superiores aos do presente trabalho. Esses valores superiores são justificados pela avaliação da polpa pura ou fruta fresca, diferente do que acontece com os sucos industrializados, que passam pelo processamento térmico e diluição.

Não foram encontrados estudos que avaliaram o teor de fenólicos totais em suco de goiaba industrializado. Entretanto, outros trabalhos que avaliaram o teor de fenólicos totais em sucos processados de outros sabores revelaram valores semelhantes aos encontrados no presente estudo. Por exemplo, Kelebek et al.<sup>35</sup> reportaram teores de fenólicos totais iguais a 31,73 mg/100 mL em suco de laranja processado.

Verifica-se que o suco de uva envasado em embalagem de vidro da marca B foi o que apresentou as maiores concentrações de fenólicos totais ( $29,2 \pm 1,7$  mg/100 mL). Em um experimento realizado com polpas de frutas *in natura* foram identificados valores de fenólicos totais superiores aos encontrados no presente estudo, demonstrando o impacto do processamento industrial e diluição com água sobre os teores destes compostos nos sucos<sup>36</sup>.

Para a atividade antioxidante no suco de goiaba (Tabela 2), os sucos da marca B apresentaram maior percentual de inibição (27,9 a 30,0%) da oxidação quando comparados aos da marca A (5,9 a 17,6%). A atividade antioxidante dos sucos de goiaba não foi comparada a outros estudos que analisaram sucos industrializados devido às diferenças de métodos utilizados, inviabilizando a comparação. Um estudo recente, que analisou a goiaba fresca em condições similares às do presente estudo<sup>5</sup>, verificou a retirada de radicais livres de 49,1%, valores duas vezes maiores aos encontrados nos sucos de goiaba industrializados.

**Tabela 2.** Conteúdo de fenólicos totais e atividade antioxidante em sucos de goiaba e uva de duas marcas, envasados em diferentes embalagens.

Marca A	Suco de Goiaba		Suco de Uva	
	DPPH <sup>1</sup>	Fenólicos totais <sup>2</sup>	DPPH <sup>1</sup>	Fenólicos totais <sup>2</sup>
Tetrapak	17,6 ± 2,7 <sup>b</sup>	21,8 ± 1,3 <sup>b</sup>	24,8 ± 4,7 <sup>a</sup>	22,1 ± 3,3 <sup>c</sup>
Plástico	5,9 ± 2,7 <sup>c</sup>	23,5 ± 1,4 <sup>ab</sup>	7,7 ± 4,5 <sup>b</sup>	16,2 ± 3,3 <sup>d</sup>
Marca B	DPPH <sup>1</sup>	Fenólicos totais <sup>2</sup>	DPPH <sup>1</sup>	Fenólicos totais <sup>2</sup>
Tetrapak	27,9 ± 0,6 <sup>a</sup>	25,0 ± 1,7 <sup>ab</sup>	27,3 ± 1,1 <sup>a</sup>	27,7 ± 0,6 <sup>ab</sup>
Lata	28,8 ± 2,6 <sup>a</sup>	24,0 ± 1,0 <sup>ab</sup>	26,7 ± 2,1 <sup>a</sup>	24,0 ± 1,7 <sup>bc</sup>
Vidro	30,0 ± 3,9 <sup>a</sup>	26,3 ± 3,2 <sup>a</sup>	37,2 ± 1,7 <sup>a</sup>	29,2 ± 1,7 <sup>a</sup>

Valores expressos em média ± desvio padrão.

Médias nas colunas com letras diferentes são significativamente diferentes pelo teste de Duncan ( $p < 0,05$ ).

ND: Não detectado.

<sup>1</sup> Atividade antioxidante determinada através do método de DPPH, expresso em %; <sup>2</sup> Fenólicos totais expresso, em mg de ácido gálico/100 mL.

Em relação ao suco de uva, os valores da atividade antioxidante foram, em média, semelhantes (24,8 a 37,2%), exceto para os sucos envasados na embalagem de plástico da marca A, que apresentaram valores bem inferiores aos demais (7,7%) (Tabela 2). Mesmo assim, todos os percentuais de atividade antioxidante foram considerados baixos. Esses resultados para o suco de uva não eram esperados, visto que as uvas e seus produtos são considerados ricos em compostos fenólicos e estudos têm demonstrado que essas substâncias possuem uma considerável atividade antioxidante<sup>37</sup>. Assim, pode ser que durante o processamento tenham ocorrido grandes perdas, sugerindo que as características originais da fruta não são preservadas. De forma similar, em suco de uva diluído a 5% foi verificada a retirada de 6,3% dos radicais livres, indicando pequena atividade antioxidante<sup>38</sup>.

De acordo com Kuskoski et al.<sup>36</sup>, amostras ricas em fenólicos apresentam elevada atividade antioxidante, porém essa atividade depende da concentração, da qualidade e da interação desses compostos, além do método utilizado para determinar a atividade antioxidante.

Deve-se considerar também que o teor de AA e carotenoides nos sucos contribuem para a atividade antioxidante. Para o suco de goiaba da marca A, a embalagem *tetrapak* apresentou maior concentração de AA e licopeno e também uma alta atividade antioxidante, quando comparada à embalagem de plástico. Para o suco de uva da marca A, a mesma relação não foi encontrada, apesar de maior atividade antioxidante ter sido encontrada na embalagem *tetrapak*. A atividade antioxidante não foi

diferente nos sucos da marca B e o teor dos carotenoides e AA também foram semelhantes entre as embalagens.

Os cuidados a nível industrial são cruciais para a manutenção do valor nutricional dos sucos, por isso recomenda-se que o processamento das frutas seja o mais breve possível, bem como maiores estudos para verificar qual tipo de embalagem e processamentos industriais são mais adequados para preservar as características nutricionais dos sucos.

## CONCLUSÃO

Verificou-se que diferentes marcas comerciais de suco podem ter valor nutricional diferenciado. Foi observado que o tipo de embalagem pode interferir na qualidade de sucos industrializados, de maneira que o consumidor pode atingir maiores níveis de ingestão de micronutrientes, dependendo da escolha da embalagem que armazena o produto. A embalagem *tetrapak* mostrou ser mais efetiva na preservação do conteúdo nutricional dos sucos analisados. Apesar de atrativa, a embalagem de vidro pode ter levado a perdas dos componentes analisados, especialmente pela incidência de luz através da embalagem transparente. A embalagem de lata também não se mostrou capaz de preservar os componentes analisados, principalmente para o suco de uva. Portanto, a escolha do melhor tipo de embalagem deveria ser alvo das indústrias de alimentos, visando a preservação da qualidade nutricional de seus produtos.

## REFERÊNCIAS

1. Campos DCP, Santos AS, Wolkoff DB, Matta VM, Cabral LMC, Couri S. Cashew apple juice stabilization by microfiltration. *Desalinat*. 2002;148(1-3):61-5.
2. Kabasakalis V, Siopidou D, Moshatou E. Ascorbic acid content of commercial fruit juices and its rate of loss upon storage. *Food Chem*. 2000;70(3):325-8.
3. Matsuura FCAU, Rolim RB. Avaliação da adição de suco de acerola em suco de abacaxi visando à produção de um "blend" com alto teor de vitamina C. *Rev Bras Fruticult*. 2002;24(1):138-41.
4. Silva DS, Maia GA, Sousa PHM, Figueiredo RW, Costa JMC, Fonseca AVV. Estabilidade de componentes bioativos do suco tropical de goiaba não adoçado obtido pelos processos de enchimento a quente e asséptico. *Ciênc Tecnol Alim*. 2010;30(1):237-43.
5. Oliveira SO, Aquino PP, Ribeiro SMR, Proença RPC, Pinheiro-Sant'ana HM. Vitamina C, carotenoides, fenólicos totais e atividade antioxidante de goiaba, manga e mamão procedentes da Ceasa do Estado de Minas Gerais. *Acta S Health Sci*. 2011;33(1):89-98.
6. Oliveira DS, Lobato AL, Ribeiro SMR, Santana AMC, Chaves JBP, Pinheiro-Sant'ana HM. Carotenoids and vitamin C during handling and distribution of Guava (*Psidium guajava* L.), Mango (*Mangifera indica* L.), and Papaya (*Carica papaya* L.) at commercial restaurants. *J Agric Food Chem*. 2010;58:6166-72.
7. EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Atuação do Brasil no mercado vitivinícola mundial [Internet]. 2010. Disponível em: <http://www.cnpqv.embrapa.br/publica/artigos8 ADA>. American Dietetic Association. Position of the American Dietetic Association: Functional Foods. *J Am Diet Assoc*. 2004;104(1):814-26.
8. Nijveldt RJ, Nood E, Hoorn DE, Boelens PG, Norren K, Leeuwen PAM. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am Soc Clin Nutr*. 2001;74:418-25.
9. Alonso MG, Teresa SP, Buelga CS, Gonzalo JCR. Evaluation of the antioxidant properties of fruits. *Food Chem*. 2004;84:13-8.
10. Sellappan S, Akoh CC, Krewer G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. *J Agric Food Chem*. 2002;50(8):24328.
11. Matioli G, Rodriguez-Amaya DB. Microencapsulação do licopeno com ciclodextrinas. *Ciênc Tecnol Alim*. 2003;23:102-5.
12. Vannuchi H, Jordão JAA. Vitaminas hidrossolúveis. In: Oliveira JED, Marchini JS, organizadores. *Ciências Nutricionais*. São Paulo: Sarvier; 1998.
13. Freitas CAS, Maia GA, Costa JMC, Figueiredo RW, Rodrigues MCP, Sousa PHM. Estabilidade do suco tropical de acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) adoçado envasado pelos processos hot-fill e asséptico. *Ciênc Tecnol Alim*. 2006;26(3):544-9.
14. Beserra FJ, Guimarães ACL. Embalagens para Sucos e Polpas. In: Beserra F, Guimarães ACL. *Curso de Tecnologia em Processamento de Sucos e Polpas Tropicais – Curso de especialização por tutoria à distância*. Brasília (DF): ABEAS/UFC; 1998.
15. Baruffaldi R, Oliveira MN. Conservação de Alimentos por Tratamento Térmico/Operações e Processos Unitários. In: Baruffaldi R, Oliveira MN. *Fundamentos de Tecnologia de Alimentos*. São Paulo: Atheneu; 1998.
16. Alves RMV, Garcia EEC. Embalagem para sucos de frutas. In: *Colet. ITAL*. 1993;23(2):105-22.
17. Johnson PD. Acerola (*Malpighia glabra* L., *M. puniceifolia* L., *M. emarginata* D. C.): agriculture, production and nutrition. *W Rev Nutr Diet*. 2003;91:67-75.
18. Rodriguez DB, Raymundo LC, Lee T, Simpson KL, Chichester CO. Carotenoid pigment changes in ripening *Momordica charantia* fruits. *Annual Botanic*. 1976;40:615-24.
19. Campos FM, Della Lucia CM, Pinheiro-Sant'ana HM. Optimization of methodology to analyze ascorbic and dehydroascorbic acid in vegetables. *Quim Nova*. 2009;32:87-91.
20. Pinheiro-Sant'ana HM, Stringheta PC, Brandão SCC, Azeredo RMC. Carotenoid retention and vitamin A value in carrot (*Daucus carota* L.) prepared by food service. *Food Chem*. 1998;61:145-51.
21. Catharino RR, Godoy HT, Lima-Pallone JÁ. Metodologia analítica para determinação de folatos e ácido fólico em alimentos. *Quím Nova*. 2006;29:972-6.
22. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 1958;181:1199-200.
23. Singleton VL, Orthofer R, Lamvela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrats and antioxidants

- by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Meth Enzymol*. 1999;299:152-77.
24. Oliveira DS, Mata GMSC, Della Lucia CM, Campos FM, Ribeiro SMR, Pinheiro-Sant'ana HM. Influência da embalagem e estocagem no conteúdo de betacaroteno e ácido ascórbico em suco de manga "Ubá" industrializado. *Acta S Health Sci*. 2010;32(2):191-8.
  25. Pereira CQ, Lavinhas FC, Lopes MLM, Valente-Mesquita VL. Sucos de caju industrializados: variação no teor de ácido ascórbico e em outros parâmetros físico-químicos. *Ciênc Tecnol Alim*. 2008;28:266-70.
  26. Santana MTA, Siqueira HH, Reis KC, Lima LCO, Silva RJL. Caracterização de diferentes marcas de sucos de uva comercializados em duas regiões do Brasil. *Ciênc Agrotec*. 2008;32(3):882-6.
  27. Bermudez OI, Tucker KL. Trends in dietary patterns of Latin American populations. *Cad Saúde Pública*. 2003;19:S87-S99.
  28. Popkin BM, Adair LS, Ng SW. Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries. *Nutr Rev*. 2012;70(1):3-21.
  29. Institute of Medicine. Food and Nutrition Board [Internet]. 2011. Disponível em: <http://www.iom.edu/Activities/Nutrition/SummaryDRIs/~media/Files/Activity%20Files/Nutrition/DRIs/New%20Material/5DRI%20Values%20SummaryTables%2014.pdf>31 Kuskoski EM, Asuero AG, Troncoso AM, Mancini-Filho J, Fett R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciênc Tecnol Alim*. 2005;25:726-32.
  30. Luximon-Ramma A, Bahorun T, Crozier A. Antioxidant actions and phenolic and vitamin C contents of common Mauritian exotic fruits. *J Sci Food Agric*. 2003;83(5):496-502.
  31. Patthamakanokporn O, Pwrasien P, Nitithamyong A, Sirichakwal PP. Changes of antioxidant activity and total phenolic compounds during storage of selected fruits. *J Food Comp Anal*. 2008;21(3):241-8.
  32. Lim YY, Lim TT, Tee JJ. Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. *Food Chem*. 2007;103(3):1003-8.
  33. Kelebek H, Selli S, Canbas A, Cabaroglu T. HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan. *Microch J*. 2009;91:187-92.
  34. Kuskoski EM, Asuero AG, Morales MT, Fett R. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. *Ciênc Rural*. 2006;4(36):1283-7.
  35. Gollucke APB, Souza JC, Tavares DQ. Sensory stability of concord and Isabel concentrated grape juices during storage. *J Sens Stud*. 2008;23(1):340-53.
  36. Bramorski A, Cherem AR, Marmentini CP, Torresani J, Mezdari T, Costa AAS. Total polyphenol content and antioxidant activity of commercial Noni (*Morinda citrifolia* L.) juice and its components. *Braz J Pharm Sci*. 2010;46(4):652-6.

## Diversidade e resistência a antibióticos de bactérias psicrotróficas isoladas de tanques coletivos de resfriamento de leite

Diversity of psychotrophic bacteria isolated from the milk cooling collective tanks and antibiotics resistance profile of the microorganisms isolates

RIALA6/1520

Simone Cristina MARQUES<sup>1\*</sup>, Suzana Reis EVANGELISTA<sup>1</sup>, Roberta Hilsdorf PICCOLI<sup>2</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras/UFLA, Campus da UFLA, s/n, CP 3037, Lavras, MG, Brasil, CEP: 37200-000. E-mail: scmarques85@gmail.com

<sup>2</sup>Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras  
Recebido: 08.03.2012 – Aceito para publicação: 01.11.2012

### RESUMO

Bactérias psicrotróficas isoladas da parede, do fundo e da pá de homogeneização de tanques coletivos de resfriamento de leite, após o processo de higienização, foram identificadas e caracterizadas quanto à capacidade de produzir lipase, lecitinase e protease, bem como determinada a sensibilidade dos isolados a antibióticos. Foram coletadas amostras de 32 tanques coletivos, localizados em diferentes cidades no sul do estado de Minas Gerais, por meio de *swab* de amostra da superfície, e analisadas pelas técnicas de diluições seriadas com plaqueamento em ágar tripton de soja e incubação das placas a 7 °C por 10 dias. As bactérias isoladas foram identificadas bioquimicamente pelos *kits* API 20NE (Biomérieux-Brasil) e Bactray I e II (Laborclin-Brasil). Foram identificados 197 isolados, os quais foram caracterizados quanto à produção de lipase, lecitinase e protease. Para efetuar o teste de resistência a antibióticos, 21 isolados foram selecionados. Contagens entre  $< 1$  e  $10^8$  UFC/cm<sup>2</sup> foram observadas, com prevalência de *Serratia* sp., *Klebsiella* sp. e espécies do gênero *Pseudomonas* sp. Os isolados identificados apresentaram elevada atividade proteolítica e lipolítica, e a atividade de lecitinase foi menos pronunciada. A multidroga resistência foi detectada em 54% dos isolados analisados.

**Palavras-chave.** bactérias psicrotróficas, resistência a antibióticos, protease, lipase.

### ABSTRACT

Psychotrophic bacteria were isolated from the wall, bottom and homogenization spade of cooling milk collective tank, after performing the hygienic procedure. These isolates were identified and characterized on the ability in producing protease, lipase and lecithinases, and also to determine the isolates susceptibility to antimicrobial agents. From 32 collective tanks, located in different cities in the South of Minas Gerais, the samples from their surface were collected by swab technique, which were analyzed by serial dilutions plated on trypticase soy agar and incubated at 7 °C for 10 days. Then, the isolates were selected for performing biochemical identification using kits API 20NE (Biomérieux-Brazil) and Bactray I and II (Laborclin-Brazil). One hundred ninety-seven isolates were identified and characterized in relation to protease, lipase and lecithinase production. From these isolates, 21 were selected for testing the resistance to antibiotics. Bacterial countings from  $< 1$  to  $10^8$  CFU/cm<sup>2</sup> were detected, with the prevalence of *Serratia* sp., *Klebsiella* sp., besides some species of *Pseudomonas* genus. The identified isolates showed high proteolytic and lipolytic activity, although the lecithinase activity was less evident. The multidrug resistance was observed in 54% of isolates analyzed.

**Keywords.** psychotrophic bacteria, antibiotic resistance, protease, lipase.

## INTRODUÇÃO

A higienização de equipamentos, superfícies e utensílios utilizados no armazenamento ou processamento de alimentos tem por objetivo a remoção de micro-organismos e sujidades, uma vez que falhas nesse processo favorecem a adesão microbiana e formação de biofilme<sup>1,2</sup>.

A formação do biofilme envolve a produção e liberação de substâncias poliméricas extracelulares (SPE) ou exopolissacarídeo, levando à formação de uma matriz que favorece a fixação dos micro-organismos<sup>3,4</sup>. Nesse ambiente, as células aderidas tornam-se mais resistentes a agentes químicos, em função da barreira física formada por essa matriz. A resistência é relatada em quinhentas<sup>1</sup> ou mil vezes<sup>5</sup> quando comparada a células livres ou planctônicas<sup>6,7</sup>.

A adesão bacteriana está associada também ao aumento significativo da resistência a muitos agentes antibióticos<sup>8-11</sup>. Além disso, o biofilme serve como proteção para diversas mudanças ambientais como exposição à radiação ultravioleta<sup>12</sup> ou a ácidos<sup>13</sup>, além de dissecação.

A problemática do biofilme em tanques de resfriamento de leite está na contínua liberação de células aderidas para o alimento, fato observado nos trabalhos realizados por Caixeta et al.<sup>14</sup> e Boari et al.<sup>15</sup>. O destacamento de células, como é chamada essa liberação, é importante para minimizar a escassez de nutrientes devido ao aumento de células na superfície e permite a colonização de novos ambientes. Esse fenômeno acontece como uma resposta genética ou como um estímulo físico no contato líquido-superfície<sup>16,17</sup>.

Esse destacamento torna-se importante foco de contaminação do leite e muitas vezes de contaminação por bactérias resistentes a antibióticos, uma vez que a formação de um biofilme pode favorecer a aquisição de elementos genéticos móveis (plasmídeos, transposons e integrons) contendo genes de resistência a antimicrobianos ou genes que codificam estruturas e/ou mecanismos que impeçam a ação do antibiótico<sup>18,19</sup>. Termos como corresistência, *cross*-resistência e resistência pleitrópica têm sido usados na literatura científica como referência aos fenótipos de resistência a multidroga na tentativa de diferenciar a forma de aquisição da resistência pela bactéria a uma ou diferentes classes de antibióticos<sup>20</sup>.

Para classificar a resistência bacteriana, diferentes denominações têm sido discutidas<sup>20</sup>. Um dos métodos usados por alguns autores e autoridades (*Center for Disease Control and Prevention* – CDC e *European*

*Center for Disease Prevention and Control* – ECDC) para caracterizar organismos como *multi-drug resistant* ou multidroga resistente é a resistência a três ou mais classes de antimicrobianos<sup>21,22</sup>.

Em 2010, após diversas discussões, o ECDC apresentou a proposta final de criação das definições *multi-drug resistant* (MDR), *extreme drug resistant* (XDR) e *pandrug resistant* (PDR) como forma de padronizar a terminologia internacional para definir bactérias que são resistentes a um número significativo de antibióticos<sup>23</sup>. Foram criadas categorias de antimicrobianos baseadas na tabela de antibióticos citados no *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI)<sup>24</sup>, antibióticos foram incluídos ou excluídos baseados em recomendações das diretrizes do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST)<sup>25</sup>, além da utilização de outros critérios de exclusão e inclusão.

Para essas definições serem válidas, dentre outras questões, devem ser testados todos ou quase todos os agentes dentro das categorias listadas nas diretrizes do CLSI<sup>24</sup> ou do EUCAST<sup>25</sup>.

Bactérias psicrotróficas apresentam capacidade de crescimento em temperaturas em torno de 7 °C, independente de sua temperatura ótima de crescimento. Podem ser bactérias gram-positivas, como *Staphylococcus aureus*, ou gram-negativas, com predominância de *Pseudomonas*, *Serratia*, *Aeromonas*, dentre outras, e, além da resistência a antibióticos, apresentam a capacidade de produzir diversas exoenzimas termorresistentes, lipases e proteases, responsáveis por grandes perdas econômicas do leite<sup>26</sup>. Tais enzimas são secretadas no final da fase log de crescimento em densidades populacionais iguais ou superiores a 10<sup>6</sup> UFC/mL<sup>26</sup>.

A termorresistência dessas enzimas dá-se pela capacidade de reorganização da estrutura terciária, danificada durante a pasteurização, tornando-as ativas, sendo assim capazes de deteriorar os alimentos<sup>27</sup>. Lipases hidrolisam a gordura do leite promovendo a liberação de ácidos graxos de cadeia curta, com produção de sabor e odores desagradáveis no leite, e proteases degradam caseína causando cor cinzenta, sabor amargo, além de geleificação de produtos submetidos à esterilização por ultra-alta temperatura (UAT)<sup>26,28</sup>.

Pelo exposto, esta pesquisa foi conduzida com os objetivos de isolar, identificar e caracterizar, quanto à capacidade de produzir lipases, lecitinas e proteases, bactérias psicrotróficas isoladas da parede, fundo e pá de homogeneização de tanques coletivos de resfriamento

de leite, após etapa de higienização, e determinar a sensibilidade a antibióticos dos isolados identificados.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta das amostras e enumeração bacteriana

Foram amostrados 32 tanques coletivos de resfriamento de leite localizados no sul do estado de Minas Gerais.

Empregando-se a técnica de esfregaço em superfície com suabe, foram amostrados 100 cm<sup>2</sup> das áreas de parede, fundo e pá de homogeneização de tanques coletivos de resfriamento de leite, após higienização manual. O processo de higienização envolveu as etapas de limpeza, com remoção de resíduos orgânicos e minerais com auxílio de soluções detergentes, e a etapa de sanitização, com aplicação de sanitizante à base de cloro.

Seguinte ao esfregaço, os suabes foram imersos em tubos contendo água peptonada 0,1% e transportados para o laboratório em caixas isotérmicas. Procedeu-se a homogeneização das amostras por vigorosa agitação por 10 minutos, sendo realizadas diluições seriadas e plaqueamento na superfície do meio ágar tripton de soja. Foram realizadas triplicatas de cada diluição. Após incubação a 7 °C por 10 dias, realizou-se a contagem de colônias, seleção dos morfotipos e armazenamento dos isolados.

### Identificação fenotípica dos isolados

A pureza dos isolados foi monitorada por coloração de Gram; aqueles caracterizados como gram-negativos foram submetidos aos testes de oxidase e prova de oxidação-fermentação (OF), segundo metodologia descrita por Garrity e Holt<sup>29</sup>. Bactérias gram-negativas e oxidase-negativas foram identificadas utilizando-se os kits de identificação Bactray I e II (Laborclin<sup>®</sup>), e bactérias gram-negativas e oxidase-positivas identificadas utilizando o API 20 NE (Biomérieux<sup>®</sup>).

### Teste qualitativo para protease, lipase e lecitinase

Para determinação da produção de enzimas, os isolados foram cultivados em caldo tripton de soja a 28 °C por 24 h, e a determinação da protease, lipase e lecitinase seguiu metodologia descrita por Frank et al.<sup>30</sup>.

A protease foi determinada em ágar leite, suplementado com 5% de leite em pó desnatado, sendo as placas incubadas a 28 °C por até 72 h.

A atividade lipolítica foi determinada em ágar tributirina suplementado com 2% de tributirina mais solução de azul de o-toluidina a 1%, sendo as placas incubadas a 28 °C por até 72 h.

A produção de lecitinase foi determinada em meio ágar triptose de soja suplementado com 10% de emulsão de gema de ovo. As placas foram incubadas a 28 °C por 48 h.

Nos três testes, a presença de uma zona opaca ao redor das colônias foi indicativa da produção da enzima pela bactéria.

### Resistência bacteriana a antibióticos

Baseado em recomendações prévias do CLSI<sup>24</sup>, os seguintes antibióticos foram utilizados: tetraciclina 30 µg/disco, norfloxacin 10 µg/disco, cefuroxima 30 µg/disco, ampicilina 10 µg/disco, estreptomycin 10 µg/disco, cloranfenicol 30 µg/disco, pelo método de difusão em ágar Mueller Hinton, segundo Bauer et al.<sup>31</sup>. Foram selecionados 21 isolados dentre os 197 identificados cujo percentual nas amostras foi intermediário ou elevado.

Após incubação das placas a 28 °C por 24 h, temperatura sugerida como ótima para o crescimento de bactérias psicrotróficas, os halos foram mensurados e os valores expressos em milímetros. O isolado foi identificado como resistente ou sensível ao antibiótico testado, segundo o CLSI<sup>24</sup>.

## RESULTADOS

Os resultados das contagens de micro-organismos psicrotróficos em tanques coletivos de resfriamento de leite são apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Contagem de bactérias psicrotróficas isoladas da parede, fundo e pá de homogeneização de leite, de 32 tanques coletivos de resfriamento de leite localizados no sul de Minas Gerais

Contagem (UFC/cm <sup>2</sup> )	Parede (n/N)	Fundo (n/N)	Pá (n/N)
<1	19/32	18/32	11/32
8,5x10 <sup>3</sup> a 9,3x10 <sup>4</sup>	6/32	9/32	4/32
5x10 <sup>5</sup> a 4,3x10 <sup>8</sup>	7/32	5/32	17/32

n: número de amostras detectadas; N: número total de amostras analisadas.

Foram detectadas bactérias psicrotróficas nos locais amostrados nos tanques coletivos, com contagens entre < 1 UFC/cm<sup>2</sup> e 4,3 x 10<sup>8</sup> UFC/cm<sup>2</sup>, sendo que

contagens mais elevadas, ordem de  $10^8$  UFC/cm<sup>2</sup>, foram detectadas na pá de homogeneização do leite em dezessete dos trinta e dois tanques analisados.

A diversidade dos isolados identificados pode ser verificada na Tabela 2.

Nesta pesquisa foram caracterizados 197 isolados como bactérias gram-negativas, sendo 56 identificados pelo kit de identificação bioquímica API 20NE, e os demais 141 isolados identificados pelo Bactray I e II. Foi detectada ampla diversidade bacteriana entre os isolados, com detecção de bactérias com potencial patogênico, como *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, bem como de micro-organismos deteriorantes, como *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia liquefaciens*, dentre outros.

Quanto à atividade enzimática, a Figura 1 mostra os percentuais detectados da atividade proteolítica, lipolítica e da lecitinase entre os isolados.

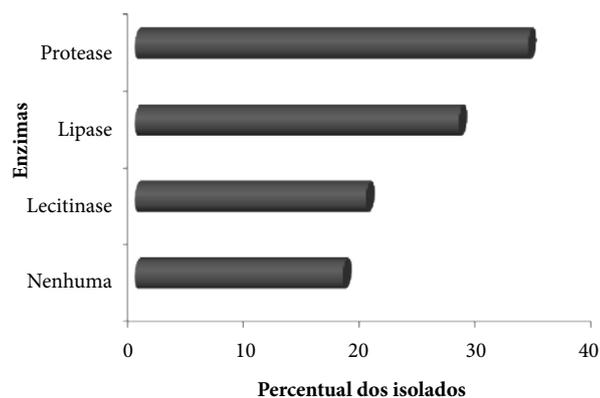
**Tabela 2.** Frequência e percentual de bactérias isoladas e identificadas a partir dos 3 pontos de amostragem (parede, fundo e pá de homogeneização) de tanques de resfriamento de leite coletivos

Bactéria	Nº de isolados	% de ocorrência
<i>Aeromonas hydrophila</i>	13	6,59
Complexo <i>Burkholderia cepacia</i>	37	18,78
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	0,51
<i>Enterobacter cloacae</i>	3	1,53
<i>Enterobacter sakasaki</i>	1	0,51
<i>Hafnia alvei</i>	27	13,69
<i>Klebsiella oxytoca</i>	5	2,55
<i>Klebsiella ozaenae</i>	35	17,76
<i>Moraxella</i> sp.	1	0,51
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	1,53
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	11	5,58
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2	1,02
<i>Serratia liquefaciens</i>	33	16,74
<i>Serratia odorifera</i>	3	1,53
<i>Shigella flexneri</i>	17	8,62
<i>Yersinia enterocolitica</i>	5	2,55
<b>Total</b>	<b>197</b>	<b>100%</b>

**Tabela 3.** Diâmetro do halo da sensibilidade ou resistência a antibióticos de bactérias psicrotróficas, identificadas a partir de tanques de resfriamento de leite coletivos, após higienização, localizados no sul de Minas Gerais

Bactéria	Antibiótico e Categoria					
	Diâmetro do halo (mm)					
	Tetraciclina <sup>1</sup>	Norfloxacina <sup>2</sup>	Cefuroxima <sup>3</sup>	Ampicilina <sup>4</sup>	Estreptomicina <sup>5</sup>	Cloranfenicol <sup>6</sup>
<i>Serratia liquefaciens</i>	S (22 mm)	S (17 mm)	R (2 mm)	R (11mm)	S (22 mm)	S (24 mm)
<i>S. liquefaciens</i>	R (10 mm)	I (16 mm)	R (2 mm)	R (11mm)	R (2 mm)	R (2 mm)
<i>S. liquefaciens</i>	S (21 mm)	S (18 mm)	R (12 mm)	R (2 mm)	S (17 mm)	R (8 mm)
<i>S. liquefaciens</i>	S (23 mm)	S (17 mm)	R (8 mm)	R (11 mm)	S (16 mm)	R (8 mm)
<i>S. liquefaciens</i>	S (23 mm)	S (17 mm)	R (2 mm)	R (10 mm)	R (2 mm)	R (2 mm)
<i>S. liquefaciens</i>	S (15 mm)	S (17 mm)	S (18 mm)	R (11 mm)	R (6 mm)	R (8 mm)
<i>S. liquefaciens</i>	S (15 mm)	S (17 mm)	S (18 mm)	S (19 mm)	S (15 mm)	R (2 mm)
<i>S. liquefaciens</i>	R (11 mm)	S (23 mm)	S (18 mm)	R (9 mm)	S (15 mm)	S (21 mm)
<i>Serratia plymuthica</i>	S (24 mm)	I (16 mm)	R (9 mm)	R (2 mm)	S (19 mm)	S (21 mm)
<i>Shigella flexneri</i>	S (24 mm)	S (17 mm)	R (9 mm)	R (2 mm)	S (15 mm)	R (8 mm)
<i>S. flexneri</i>	S (23 mm)	S (14 mm)	R (10 mm)	R (9 mm)	S (17 mm)	R (11 mm)
<i>S. flexneri</i>	R (11 mm)	R (10 mm)	R (10 mm)	R (2 mm)	R (10 mm)	S (19 mm)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	S (19 mm)	S (14 mm)	R (13 mm)	R (2 mm)	S (15 mm)	R (11 mm)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	S (23 mm)	S (19 mm)	S (18 mm)	S (19 mm)	S (18 mm)	S (18 mm)
<i>Enterobacter cloacae</i>	S (17 mm)	S (17 mm)	S (23 mm)	S (20 mm)	S (16 mm)	S (18 mm)
<i>E. cloacae</i>	S (23 mm)	S (30 mm)	S (20 mm)	S (17 mm)	S (18 mm)	S (19 mm)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	S (21 mm)	S (21 mm)	R (2 mm)	R (2 mm)	S (17 mm)	S (18 mm)
<i>Hafnia alvei</i>	S (18 mm)	S (17 mm)	R (10 mm)	R (13 mm)	R (6 mm)	S (20 mm)
<i>H. alvei</i>	S (17 mm)	S (18 mm)	R (12 mm)	R (9 mm)	S (17 mm)	R (11 mm)
<i>H. alvei</i>	R (10 mm)	R (12 mm)	R (11 mm)	S (18 mm)	R (5 mm)	R (9 mm)
<i>H. alvei</i>	S (21 mm)	S (19 mm)	S (23 mm)	R (13 mm)	S (17 mm)	S (25 mm)

Legenda: 1 = categoria: tetraciclina; 2 = categoria: fluoroquinolonas; 3 = categoria: cefens; 4 = categoria: penicilinas; 5 = categoria: aminoglicosídeos; 6 = categoria: fenicol. S = Sensível; I = Intermediário; R = Resistente.



**Figura 1.** Distribuição do percentual de isolados com atividade proteolítica, lipolítica, lecitinase e que não apresentaram atividade enzimática, identificados a partir da parede, fundo e pá de homogeneização de tanques coletivos de resfriamento de leite

Variação no percentual de atividade das enzimas proteolíticas foi observada nesta pesquisa, visto que 34% dos 197 isolados apresentaram atividade proteolítica, 28% atividade lipolítica e 20% apresentaram atividade de lecitinase, sendo que em 18% não foi detectada a atividade das enzimas analisadas.

O percentual de resistência aos antibióticos testados dos 21 isolados de bactérias psicrotróficas submetidos ao antibiograma estão demonstrados na Tabela 3.

A resistência a três ou mais classes de antibióticos foi observada em 54% dos isolados analisados, podendo ser caracterizados como multidroga resistentes.

## DISCUSSÃO

A *American Public Health Association* (APHA)<sup>32</sup> recomenda, para equipamentos e utensílios de indústrias de processamento de alimentos, contagem máxima de 2 UFC/cm<sup>2</sup> para aeróbios mesófilos, enquanto as Organizações Pan-americanas de Saúde (OPAS) e Mundial de Saúde (OMS)<sup>2</sup>, preconizam contagens de até 50 UFC/cm<sup>2</sup>. Considerando esse padrão para outros grupos de micro-organismos, como os psicrotróficos analisados neste trabalho, falhas na higienização da parede de 13 tanques foram detectadas, sendo que na amostragem do fundo 14 tanques apresentaram valores acima dos padrões.

Vale ressaltar que as contagens obtidas na pá de homogeneização de 66% (21) dos tanques analisados estavam acima do valor estabelecido pela APHA e OMS, e em 17 desses tanques contagem na ordem de 10<sup>5</sup> a 10<sup>8</sup> UFC/cm<sup>2</sup> foram detectadas, indicando provável formação de biofilme nessa área.

Dessa maneira, equipamentos de processamento e armazenamento de alimentos devem possuir um *design* higiênico, como presença de superfícies lisas, ausência de cantos ou bordas de difícil acesso, e ser de fácil desmontagem, principalmente se tratando de limpeza manual como a realizada nos tanques analisados. Um plano eficaz de higienização deve ser montado, dando-se atenção especial aos locais de difícil limpeza, como a pá de homogeneização de tanques de resfriamento de leite, uma vez que a presença de matéria orgânica e a formação de incrustações favorecerão a formação de biofilme.

Valores inferiores aos desta pesquisa foram observados por Carvalho et al.<sup>33</sup>, observando a adesão de *Pseudomonas* sp. em tanques de estocagem de leite, com contagens de 8,4 x 10<sup>1</sup> UFC/cm<sup>2</sup>.

A presença de *Pseudomonas* sp. tem sido observada por diversos autores como Adams et al.<sup>34</sup>, constatando que de 70% a 90% dos psicrotróficos isolados de leite cru estocados a 4°C, por uma semana, eram *Pseudomonas*. Já Eneroth et al.<sup>35</sup> observaram maior frequência de isolamento de espécies de *Pseudomonas* (72% a 77%) em amostras de leite cru, de leite pasteurizado e de amostras ambientais de indústrias de laticínios. A presença desse gênero pode ser explicada pelo fato de algumas espécies apresentarem um tempo de geração curto em temperaturas entre 0 °C e 7 °C<sup>28</sup>, limiar de temperatura ao qual o leite fica submetido quando armazenado em tanques de resfriamento.

Além de *Pseudomonas* sp., elevada foi a incidência de *Shigella* sp., *Klebsiella* sp., *Escherichia coli*, além de outras enterobacteriaceae, o que pode ser justificada pela proximidade dos tanques de resfriamento do estábulo, uma vez que tais bactérias foram identificadas em mosca de estábulo (*Stomoxys calcitrans* Linnaeus, 1758) por Moraes et al.<sup>36</sup>.

Bactérias psicrotróficas, como as do complexo *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia liquefaciens*, detectadas neste trabalho, podem ser provenientes de água, solo, vegetação e úbere<sup>37</sup>. Santana et al.<sup>38</sup> demonstraram que as principais fontes de bactérias psicrotróficas são tetos, equipamentos e tubulações mal higienizados, além da presença de água residual nos equipamentos, sendo que esses autores detectaram em água residual de tanques de resfriamento contagens na ordem de 10<sup>7</sup> UFC/mL.

Diversas espécies pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, que se multiplicam em temperaturas de refrigeração, produzem enzimas hidrolíticas como

proteases, que terão como alvo a caseína e lipases que hidrolisam a gordura<sup>26</sup>, afetando dessa maneira a qualidade do leite e promovendo redução da vida útil de derivados lácteos. O percentual de isolados que apresentaram atividade proteolítica foi de 34%, sendo que a lipolítica de 28%, ao passo 20% apresentaram atividade da enzima lecitinase e 18% não demonstraram atividade enzimática. Percentual superior foi obtido por Dogan e Boor<sup>39</sup> ao evidenciarem que 69% dos 338 isolados identificados de *P. fluorescens* isoladas de leite cru apresentaram atividade proteolítica e de lecitinase, enquanto apenas 14,5% dos isolados de *P. putida* produziram essas enzimas hidrolíticas.

Outro problema ocasionado pela adesão de psicrotróficos em tanques de resfriamento está na capacidade de biotransferência das células bacterianas para o leite, fato observado por alguns autores<sup>16</sup>. Essas células, podendo conter genes de resistência a antibióticos, serão liberadas e contaminarão o leite.

A classificação dos isolados como multidrogas resistente pôde ser feita com base no número de classes a qual determinado isolado foi resistente, não sendo possível indicá-los como XDR ou PDR. Para essas definições serem válidas, devem-se testar todos ou quase todos antibióticos dentro das categorias listadas nas diretrizes do EUCAST<sup>25</sup> ou do CLSI<sup>24</sup>, o que não foi realizado neste trabalho. O que se pode inferir é que a resistência tende a ser elevada em ambientes nos quais o uso de drogas é intenso e constante<sup>23</sup>.

O armazenamento do leite em tanques deficientemente higienizados poderá gerar redução de sua vida útil ou de derivados produzidos a partir de leite contaminado por bactérias psicrotróficas, uma vez que são produtoras de enzimas termoestáveis. Além disso, o leite poderá agir como veiculador de bactérias resistentes a antibióticos.

## CONCLUSÃO

Observou-se neste trabalho que falhas no processo de higienização acarretaram adesão bacteriana na parede, fundo e pá de homogeneização de tanques de resfriamento de leite, pela detecção de elevadas contagens. O isolamento e a identificação de bactérias psicrotróficas, a partir da técnica do suabe, demonstrou uma diversidade entre os isolados e, com a determinação da atividade enzimática, a qualidade do leite poderá ser reduzida quando tais bactérias entrarem em contato com

o leite. Aliado à redução da vida útil está o fato de que o leite poderá veicular bactérias resistentes a antibióticos, resistência observada em 54% dos isolados analisados.

---

## AGRADECIMENTOS

A autora é beneficiária de auxílio financeiro da CAPES-Brasil.

---

## REFERÊNCIAS

1. Costerton W, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korke DR, Lappin Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*. 1995;49(1):711-45.
2. De Andrade NJ. Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos. São Paulo (SP): Varela; 2008.
3. Kumar CG, Anand SK. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int J Food Microbiol*. 1998;42(1-2):9-27.
4. Sutehrland IW. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiol*. 2001;147(1):3-9.
5. Drenkard E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Review. Microbes Infect*. 2003;5(13):1213-9.
6. Burmølle M, Webb JS, Rao D, Hansen LH, Sørensen SJ, Kjelleberg S. Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72 (6):3916-23.
7. Marques SC, Rezende JGOS, Alves LAF, Silva BC, Alves E, Abreu LR, et al. Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. *Braz. J. Microbiol*. 2007;38(3):538-43.
8. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(2):167-93.
9. Prince AS. Biofilms, antimicrobial resistance, and airway infection. *New Engl. J. Med*. 2002;347(14):1110-1.
10. Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol*. 2003;11(1):30-6.
11. Stewart PS, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Biofilm antimicrobial resistance. In: Ghannoum MA, O'Toole GA, editors. *Microbial Biofilms*. Washington (DC): American Society for Microbiology; 2004.
12. Bernbom N, Vogel BF, Gram L. *Listeria monocytogenes* survival of UV-C radiation is enhanced by presence of sodium chloride, organic food material and by bacterial biofilm formation. *Int J Food Microbiol*. 2011;147(1):69-73.
13. McNeill K, Hamilton IR. Acid tolerance response of biofilm cells of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Lett*. 2003;221(1):25-30.
14. Caixeta DS, Scarpa TH, Brugnera DF, Freire DO, Alves E, Abreu LR, et al. Chemical sanitizers to control biofilms formed by two *Pseudomonas* species on stainless steel surface. *Ciênc Tecnol Alim*. 2012(1):142-50.
15. Boari CA, Alves MP, Tebaldi VMR, Savian TV, Piccoli RH. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas*

- hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. *Ciênc Tecnol Alim*: 2009;29(4):886-95.
16. Herrera JJR, Cabo ML, González A, Pazos I, Pastoriza L. Adhesion and detachment kinetics of several strains of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* under three different experimental conditions. *Food Microbiol*. 2007;24(6):585-91.
  17. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*. 2004;(2):95-108.
  18. Teale CJ. Antibiotic resistance and the food chain. *J Appl Microbiol. Symposium Suppl*. 2002;92(1):85-9.
  19. Salisbury JG, Nicholls TJ, Lammerding AM, Turnidge J, Nunn M. A risk analysis framework for the long-term management of antibiotic resistance in food-producing animals. *Int J Antimicrob Agents*. 2002;20(3):153-64.
  20. Cantón R, Garbajosa-Ruiz P. Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes. *Curr Opin Pharmacol*. 2011;(5):477-85.
  21. Gould IM. The epidemiology of antibiotic resistance. *Int J Antimicrob Agents*. 2008;32 Supp 1:2-9.
  22. Kallen AJ, Hidron AI, Patel J, Srinivasan A. Multidrug resistance among gram-negative pathogens that caused healthcare-associated infections reported to the national healthcare safety network, 2006-2008. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2010;31(5):528-31.
  23. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(3):268-81.
  24. Clinical and Laboratory Standards Institute (Pensilvânia – EUA) – CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty first informational suppl. M100-S21. 2011;30(1):1-142.
  25. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 2.0. 1º jan 2012.
  26. Sorhaug T, Stepaniak L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. *Trends Food Sci Technol*. 1997;8(2):35-41.
  27. Braun P, Sutherland JP. Predictive modelling of growth and measurement of enzymatic synthesis and activity by a cocktail of selected Enterobacteriaceae and *Aeromonas hydrophila*. *Int J Food Microbiol*. 2005;105(2):257-66.
  28. Law BA, Andrews AT, Sharpe ME. Gelation of UHT sterilized milk by proteases from a strain of *Pseudomonas fluorescens*, isolated from raw milk. *J Dairy Res*. 1977;44:145-8.
  29. Garrity GM, Holt JG. The road map to the Manual. In: Boone DR, Castenholz RW. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. New York, Berlin: Springer-Verlag; 2001. p. 119-66.
  30. Frank JF, Christen GL, Bullerman LB. Tests for groups of microorganisms. In: Marshall RT. *Standard methods for the examination of dairy products*. Washington: American Public Health Association; 2005. p. 271-86.
  31. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*. 1996;45(4):493-6.
  32. Sveum WH, Moberg LJ, Rude RA, Frank JF. Microbiological monitoring of the food processing environment. In: Vanderzant C, Splittstoesser DF. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Washington (DC): APHA; 1992. p. 51-74.
  33. Carvalho AF, Silva ID, Careli RT, Morell NA, Andrade NJ. Adesão de *Pseudomonas* spp em tanques de estocagem de leite cru refrigerado granelizado na microrregião de Viçosa/MG. In: Congresso Brasileiro de qualidade do leite. Goiânia, 2006.
  34. Adams DM, Barach IT, Spec ML. Heat resistant proteases produced in milk by psychrotrophic bacteria of dairy origin. *J Dairy Sci*. 1975;58 (6):828-35.
  35. Eneroth A, Christiansson A, Brendehaug J, Molin G. Critical contamination sites in the production line of pasteurised milk, with reference to the psychrotrophic spoilage flora. *Int Dairy J*. 1998;8(9):829-34.
  36. Moraes APR, Badini PV, Souza MMS, Bittencour AJ. Avaliação da capacidade de *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) em carrear bactérias envolvidas nas etiologias das mastites de municípios do Rio de Janeiro. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2004;13(4):143-9.
  37. El-Sukhon SN. Identification and characterization of *Klebsiella* isolated from milk and milk products. *Food Microbiol*. 2003;20(2):225-30.
  38. Santana EHW, Beloti V, Barros MAF, Moraes LB, Gusmão VVT, Pereira MS. Contaminação do leite em diferentes pontos do processo de produção: I Microrganismos aeróbios mesófilos e psicrotóxicos. *Semina: Ciências Agrárias*. 2001;22(2):145-54.
  39. Dogan B, Boor KJ. Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69(1):130-8.

# Pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) desembarcada: características microbiológicas e qualidade do gelo utilizado na sua conservação

Microbiological characteristics and quality of the ice used for preserving landed yellow hake (*Cynoscion acoupa*)

RIALA6/1521

Ilderlane da Silva LOPES<sup>1</sup>, Elka Machado FERREIRA<sup>1</sup>, Débora de Matos PEREIRA<sup>1</sup>, Lidiane Soares PEREIRA<sup>1</sup>, Maria Cecília de Sousa CUNHA<sup>1</sup>, Francisca Neide COSTA<sup>2\*</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>2</sup>Departamento de Patologia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), Cidade Universitária Paulo VI, S/N, Bairro Tirirical, São Luis, MA, Brasil, CEP: 65055-970. Tel.: (98) 3244-0419.

E-mail: franeidec@yahoo.com.br.

<sup>1</sup>Universidade Estadual do Maranhão (UEMA).

Recebido: 18.06.2012 – Aceito para publicação: 28.12.2012

## RESUMO

No presente estudo foram identificadas as características microbiológicas da pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) desembarcada em Cedral/MA e avaliada a qualidade do gelo utilizado na sua conservação. Foram coletadas 42 amostras de pescada e analisadas quanto à pesquisa de *Salmonella* spp, *V. parahaemolyticus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* coagulase positivo, *Aeromonas* spp, contagem de bactérias aeróbias mesófilas e Número Mais Provável de coliformes a 35 °C e coliformes a 45 °C. Onze amostras de gelo foram analisadas quanto à contagem de coliformes a 35 °C e a 45 °C e de bactérias psicrófilas. A pescada amarela mostrou contaminação por bactérias mesófilas, coliformes e *A. hydrophila*, e ausência de *Salmonella*, *Staphylococcus* coagulase positivo e *V. parahaemolyticus*. As amostras de gelo foram consideradas impróprias para uso na conservação do pescado.

**Palavras-chave.** pescada amarela, *Cynoscion acoupa*, gelo, microbiologia

## ABSTRACT

This study aimed at identifying the microbiological characteristics of yellow hake (*Cynoscion acoupa*) landed in Cedral/MA and to assess the quality of ice used in their preservation. Forty-two samples of hake were collected and analyzed on *Salmonella* spp, *V. parahaemolyticus*, *Escherichia coli*, coagulase-positive *Staphylococcus*, *Aeromonas* spp, mesophilic aerobic bacteria count and Most Probable Number of coliforms at 35 °C and at 45 °C. Eleven ice samples were analyzed for coliform counting at 35 °C and at 45 °C and for psychrotrophic bacteria. Yellow hake samples were contaminated with mesophilic bacteria, coliforms and *A. hydrophila*. No *Salmonella*, coagulase-positive *Staphylococcus* and *V. parahaemolyticus* were detected. The analyzed ice samples were considered unsuitable to be used for fish preservation.

**Keywords.** yellow hake, *Cynoscion acoupa*, ice, microbiology

## INTRODUÇÃO

O peixe possui grande importância na alimentação humana, pois é considerado um produto altamente proteico e com características peculiares, como, por exemplo, a presença dos ácidos graxos ômega-3. Entretanto, a sua qualidade deve ser mantida em virtude desse alimento ser perecível e proporcionar condições favoráveis ao desenvolvimento de micro-organismos patogênicos nocivos à saúde dos consumidores.

Essa perecibilidade ocorre devido ao seu rápido processo autolítico em relação à carne de outros animais, exigindo cuidados importantes durante a captura, estocagem e processamento até o momento de sua comercialização.

Segundo Franco e Landgraf<sup>1</sup>, a suscetibilidade do pescado à deterioração está relacionada à sua atividade de água elevada, composição química, teor de gorduras insaturadas facilmente oxidáveis e, principalmente, ao pH próximo da neutralidade. Conforme Alves et al.<sup>2</sup>, a velocidade dessa deterioração é influenciada por fatores como: espécie do pescado, grau de exaustão sofrida na captura, natureza e extensão da contaminação microbiana e temperatura.

A ausência de boas práticas de manipulação pelos pescadores e empresários na cadeia produtiva do pescado é determinante para a baixa qualidade do produto brasileiro, que chega ao consumidor com uma carga microbiana elevada<sup>3</sup>. Os micro-organismos, quando presentes no pescado, são determinantes na deterioração desse alimento, provocando assim uma possível rejeição pelo consumidor. Portanto, a adoção de medidas corretas na cadeia produtiva do pescado, como a conservação adequada através do tratamento pelo frio e a manutenção de práticas higiênicas, podem diminuir o risco de veiculação de agentes causadores de doenças, bem como possibilitar a obtenção de um produto de boa qualidade no final da sua cadeia produtiva.

Na região nordeste, o Maranhão destaca-se como um dos maiores produtores de pescado. Em 2010, a pesca extrativa marinha no estado produziu 43.780,1 toneladas de pescado, sendo considerado o segundo maior produtor dessa região<sup>4</sup>. Os recursos pesqueiros de maior importância econômica no estado são a pescada amarela (*Cynoscion acoupa*), pescada branca (*Cynoscion leiarchus*) e a gurijuba (*Hexanematichthys parkeri*), que possuem valores comerciais diferenciados entre os municípios<sup>5</sup>.

Dentre as espécies citadas, a pescada amarela contribui com maior volume de produção. Somente em 2010, a produção extrativa marinha foi de 20.879 toneladas, destacando-se como a terceira espécie mais capturada no país<sup>4</sup>. O município de Cedral é um importante produtor de pescada amarela, sendo que a produção dessa espécie compreende um sistema de grande abrangência.

Diante dessas considerações e baseando-se no fato de que não existem relatos na literatura sobre a qualidade dessa espécie de peixe desembarcado nos municípios maranhenses e em face do grande consumo pela população, esta pesquisa foi realizada com o objetivo de caracterizar os aspectos microbiológicos da pescada amarela desembarcada e avaliar a qualidade microbiológica do gelo utilizado na sua conservação.

## MATERIAL E MÉTODOS

No período de março a dezembro de 2011, foram colhidos e analisados 14 lotes de pescada amarela, cada um composto por três unidades amostrais, em que um lote representava uma embarcação, totalizando assim, 42 amostras. Paralelamente, foram colhidas 11 amostras de gelo utilizado no resfriamento dos peixes pelos pescadores, todas provenientes das fábricas locais do município de Cedral. As amostras foram colocadas em sacos plásticos estéreis, acondicionadas em caixas isotérmicas e transportadas para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, onde foram analisadas.

A contagem de coliformes a 35 °C e a 45 °C pelo método do Número Mais Provável (NMP), pela técnica de fermentação em tubos múltiplos, a quantificação de *Staphylococcus* spp e a pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positivo foram realizadas conforme Brasil<sup>6</sup>. A pesquisa de *Escherichia coli* foi realizada conforme técnica descrita por Vanderzant e Splittstoesser<sup>7</sup>.

Para a quantificação de bactérias mesófilas, utilizou-se o método do plaqueamento em profundidade, conforme APHA<sup>8</sup>, e para a contagem de psicotróficos utilizou-se método de plaqueamento em profundidade, conforme Silva et al.<sup>9</sup>. A pesquisa de *Salmonella* spp foi realizada segundo a metodologia preconizada pela ICMSF<sup>10</sup>.

Para o isolamento de *V. parahaemolyticus*, seguiu-se metodologia descrita por Chen<sup>11</sup>, sendo realizadas etapas de enriquecimento em Água Peptonada Alcalina

(APA), plaqueamento seletivo em Agar Tiosulfato Bile Sacarose (TCBS), purificação das colônias suspeitas em ágar TSA e provas bioquímicas de motilidade no ágar SIM (Sulfide, Indole and Motility); TSI (Triple Sugar Iron); oxidase; hidrólise da arginina; descarboxilação da lisina e ornitina; prova do halofilismo; oxidação e fermentação (O/F) da glicose; crescimento a 42 °C; Voges-Proskauer e fermentação de carboidratos (manose, lactose, manitol, trealose, arabinose e celobiose).

Para isolamento de *Aeromonas*, realizou-se as etapas de enriquecimento seletivo em Caldo Trypticase Soja (TSB) – com ampicilina a 30 mg/L –, plaqueamento seletivo em Ágar Vermelho de Fenol amido<sup>12</sup> e Ágar dextrina<sup>13</sup> adicionados de ampicilina (10 mg/L) com a seleção de colônias sugestivas, as quais foram cultivadas em Ágar TSI<sup>14</sup> e submetidas às provas de motilidade; oxidase; catalase e resistência ao agente vibriostático O/129 (fosfato de 2,4-diamino-6,7-diisopropylpteridine), para caracterização do gênero e identificação das espécies de *Aeromonas*, conforme a chave de Aerokey II<sup>15</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme a Portaria nº 2.914/2011<sup>16</sup>, a água para consumo humano deve ser isenta de coliformes em 100 mL da amostra. Verificou-se que as amostras de gelo apresentaram contaminação por coliformes a 35 °C, com variações de < 3,0 a 460 NMP/mL e de < 3,0 a 93 NMP/mL para o grupo de coliformes a 45 °C.

Observou-se que na fábrica A, duas amostras (50%) estavam em desacordo com a legislação vigente para coliformes a 35 °C e uma (25%) para coliformes a 45 °C. Na fábrica B, três amostras (75%) estavam fora dos padrões para coliformes a 35 °C, e na fábrica C todas as amostras estavam em desacordo com a legislação vigente para coliformes a 35 °C e uma (66,66%) para coliformes a 45 °C (Tabela 1).

O gelo para utilização em alimentos deve ser fabricado a partir da água potável e ser mantido em condição higiênico-sanitária que evite sua contaminação. Os resultados obtidos demonstraram contaminação do gelo e indicaram que o mesmo estava inadequado para utilização na conservação de pescado.

No que se refere à contagem dos psicrotrofos, verificou-se para as amostras da fábrica A que a contaminação variou entre  $2,4 \times 10^2$  a  $8,8 \times 10^4$  UFC/mL. Na fábrica B, as contagens apresentaram-se entre  $5 \times 10^2$  a

$7,3 \times 10^4$  UFC/mL, e na fábrica C, entre  $6,1 \times 10^3$  a  $1,8 \times 10^4$  UFC/mL (Tabela 1).

**Tabela 1.** Qualidade microbiológica das amostras de gelo provenientes das fábricas localizadas em Cedral/MA, 2011

Fábricas de Gelo	Nº da amostra	Coliformes a 35 °C (NMP/mL)	Coliformes a 45 °C (NMP/mL)	<i>E. coli</i>	Psicrotrofos (UFC/mL)
A	01	< 3,0	–	–	$2,4 \times 10^2$
	02	< 3,0	–	–	$3,7 \times 10^4$
	03	9,2	< 3,0	–	$3,2 \times 10^3$
	04	210	23	ausência	$8,8 \times 10^4$
	05	23	< 3,0	–	$5 \times 10^2$
	06	< 3,0	–	–	$7,3 \times 10^4$
B	07	7,4	< 3,0	–	$2,6 \times 10^3$
	08	9,2	< 3,0	–	$3,2 \times 10^3$
	09	460	93	ausência	$1,8 \times 10^4$
C	10	23	< 3,0	–	$6,1 \times 10^3$
	11	150	3,6	ausência	$2,1 \times 10^3$

A presença de micro-organismos deteriorantes no gelo utilizado para resfriamento do pescado pode ter impacto sobre sua durabilidade<sup>17</sup>, em decorrência dessas bactérias serem dotadas de características proteolíticas e lipolíticas<sup>18</sup>.

A origem da água utilizada para a fabricação do gelo é um fator predisponente à contaminação verificada, pois duas das fábricas utilizavam água oriunda de poço artesiano (A e B), que possivelmente apresenta falhas de manutenção. Dorta et al.<sup>19</sup> verificaram a qualidade do gelo produzido em três fábricas, a partir de água provenientes de poço artesiano, verificando contaminação por coliformes a 35 °C e presença de *E. coli* nas amostras analisadas.

Durante a coleta das amostras, foi verificado na fábrica B que a caixa de armazenamento da água estava aberta, o que pode ter favorecido a contaminação. Siqueira et al.<sup>20</sup> relataram que a maior contaminação da água de abastecimento público ocorre devido a caixas de armazenamento de água que permanecem abertas ou mal fechadas.

A contaminação do gelo observada neste estudo ocorreu provavelmente pelas condições de infraestrutura das fábricas e pelo manuseio inadequado do produto, devido ao contato direto do gelo com as mãos dos funcionários que o manipulavam sem uniformes e sem luvas. Além disso, o transporte do gelo da fábrica até o comprador era realizado por meio de baldes e sacos do tipo nylon, que muitas vezes apresentavam sujidades, sendo rotineiramente utilizados para o armazenamento de produtos agropecuários.

Pesquisa realizada por Vargas e Quintaes<sup>17</sup>, com caixas plásticas tipo monoblocos utilizadas no armazenamento e transporte de pescado em São Paulo, verificou 100% de contaminação dessas caixas por um ou mais patógenos, sendo que 50% continham o grupo dos coliformes, o que indica uma provável contaminação cruzada. Falcão et al.<sup>21</sup> ressaltaram a importância da manutenção do gelo sob rigorosas condições de higiene, uma vez que o gelo pode ser usado diretamente ou indiretamente para refrigerar alimentos, como bebidas e/ou produtos oriundos da pesca.

A condição higiênica inadequada observada nas amostras de gelo das fábricas corresponde a um ponto crítico na cadeia de produção da pescada amarela, uma vez que pode interferir na qualidade final desse produto. O levantamento dos pontos críticos de controle constitui um aspecto importante para a produção de alimentos seguros e de boa qualidade.

O uso de água clorada na fabricação do gelo pode ser uma alternativa a ser adotada pelos pescadores e empresários do ramo no município, já que Scherer et al.<sup>22</sup> observaram que o uso de gelo com água clorada é efetivo na redução da contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos na carne de carpa capim, armazenada inteira sob refrigeração, prolongando-se em aproximadamente 3 dias a vida de prateleira dessa espécie.

Quanto à determinação do NMP de coliformes nas 42 amostras de pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) analisadas, observou-se que 20 amostras (47,61%) apresentaram contagens entre 3,0 a 93 NMP/g, e 7 amostras (16,67%) apresentaram intervalos de 3,0 a 23 NMP/g para coliformes a 35 °C e a 45 °C, respectivamente, não ocorrendo isolamento de *E. coli* (Tabela 2).

**Tabela 2.** Determinação de coliformes (a 35 °C e a 45 °C) e percentual de contaminação da pescada-amarela em Cedral/MA, 2011

NMP/g	Coliformes a 35 °C		Coliformes a 45 °C	
	N	%	N	%
< 3,0	22	52,38	35	83,33
3,0 a 7,4	12	28,57	4	9,52
11 a 21	4	9,52	2	4,76
23 a 29	3	7,14	1	2,39
93	1	2,39	–	–
Total	42	100%	42	100%

As baixas contagens de coliformes a 45 °C observadas refletem, possivelmente, um habitat de

captura da pescada amarela pouco contaminado por dejetos e a elevada concentração de NaCl no ambiente aquático. Os coliformes têm pouca tolerância à salinidade das águas do mar, portanto, sendo o sal tóxico para esses micro-organismos, ocorre a eliminação de 90% da população de *E. coli* em poucas horas ou em minutos, quando esta entra em contato com águas marinhas<sup>23</sup>.

O baixo isolamento de coliformes também pode ser explicado pela provável presença da *Pseudomonas aeruginosa* nas amostras, pois, segundo Coelho et al.<sup>24</sup>, a *P. aeruginosa* produz uma substância denominada pseudocina, que tem efeito bacteriostático sobre o crescimento de *E. coli*, *Aerobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii* e *Klebsiella* sp., podendo dificultar o isolamento destes, alterando assim os resultados laboratoriais.

A presença de coliformes, embora em baixas concentrações nas amostras de pescada, podem ser decorrentes da contaminação do gelo utilizado durante a conservação do produto, pois foram observadas contagens destes micro-organismos nas amostras avaliadas. Sabe-se que o gelo pode transferir micro-organismos para o pescado, pois está em contato direto com este, sendo importante a utilização de gelo de ótima qualidade.

Outra forma de contaminação por coliformes pode ter ocorrido durante a lavagem da pescada amarela com água de origem e qualidade sanitária desconhecidas, ou durante o processo de evisceração, que é realizado em piso de madeira do próprio porto após o desembarque, material este de difícil limpeza e desinfecção, favorecendo assim a contaminação do produto.

Silveira et al.<sup>25</sup>, ao avaliarem as condições higiênico-sanitárias da cadeia produtiva do pescado marinho da Baixada Santista – SP, observaram contaminação por coliformes a 45 °C nos peixes analisados antes mesmo do desembarque, o que indica deficiência das práticas higiênicas por parte dos pescadores. Nesse contexto, não se descarta a possibilidade de que esse episódio também esteja relacionado às contagens de coliformes verificadas nas amostras da pescada amarela deste estudo, uma vez que as embarcações utilizadas para a captura da pescada amarela são pequenas e constituídas de madeiras.

Vale ressaltar que a manipulação adequada durante toda a cadeia produtiva proporciona um alimento final de boa qualidade, já que no início da cadeia (desembarque) os níveis de contaminação foram baixos. Contudo, por ser considerado um pescado fresco, a baixa contagem observada na matéria-prima representa um

dado preocupante se considerarmos que essas amostras de peixes contaminadas ainda passarão por um extenso caminho até chegar ao consumidor final, e, dependendo das condições de manipulação e armazenamento, poderá ocorrer a multiplicação desses micro-organismos em concentrações que poderão se tornar patogênicas ao ser humano.

Dias et al.<sup>26</sup> constataram essa situação, pois, ao verificarem a qualidade de peixe comercializado em feiras e mercados de Imperatriz, MA, identificaram alta contaminação por coliformes a 45 °C nas amostras analisadas.

Para as bactérias aeróbias mesófilas, observou-se que 32 amostras (76,19%) apresentaram contagens entre  $4 \times 10^4$  a  $6,4 \times 10^5$  UFC/g (Tabela 3).

**Tabela 3.** Contagem de bactérias aeróbias mesófilas em amostras de pescada amarela desembarcadas em Cedral/MA, 2011

Unidades Formadoras de Colônias (UFC/g)	Mesófilos	
	N	%
Ausência	10	23,81
$4 \times 10^4$ a $6,9 \times 10^5$	21	50
$1,9 \times 10^4$ a $6,4 \times 10^5$	11	26,19
Total	42	100%

A Resolução nº 12/2001<sup>27</sup> não estabelece padrões microbiológicos para contagem de mesófilos em alimentos. No entanto, a International Commission on Microbiological Specifications for Foods<sup>28</sup> recomenda que os limites para mesófilos aeróbios não devem exceder valores maiores que  $10^7$  UFC/g, em amostras de peixes destinadas ao consumo humano. Considerando esse limite, as amostras estavam dentro dos padrões, entretanto a presença desses micro-organismos em alimentos representa risco, pois a maioria dos patogênicos pertence a esse grupo<sup>1</sup>.

Segundo Coelho et al.<sup>24</sup>, as bactérias mesófilas aeróbias, quando presentes em grande número, indicam insalubridade. A elevada contagem desse micro-organismo em alimentos representa condições insatisfatórias de armazenagem e conservação do produto. Sendo assim, a manipulação e o armazenamento adequados da pescada amarela tornam-se fundamentais, pois as bactérias mesófilas poderão continuar seu processo de multiplicação, o que pode estar relacionado ao inadequado armazenamento e temperaturas favoráveis. Ao elevar-se a concentração dessas bactérias, conseqüentemente, acelera-se o processo de deterioração da carne do pescado.

Resultado semelhante foi detectado por Fernandez e Barbosa<sup>29</sup>, que verificaram contagens entre  $2,0 \times 10^4$  a  $1,0 \times 10^5$  UFC/g para bactérias mesófilas em sardinhas descabeçadas e evisceradas oriundas de peixarias da Pavuna/RJ. Muratori et al.<sup>30</sup> encontraram contagens entre  $10^5$  e  $10^6$  UFC/g em 55,9% das amostras de branquinhas (*Curimatus ciliatus*) *in natura* em Teresina/PI.

Constata-se que os mesófilos são relevantes para caracterizar as condições de manipulação dos alimentos, portanto, é de grande importância que a legislação vigente estabeleça limites para esses micro-organismos em peixes *in natura*, a fim de que se garanta uma maior qualidade do pescado fresco.

No que se refere à presença de *Salmonella* spp, verificou-se que todas as amostras avaliadas estão de acordo com a legislação vigente<sup>27</sup>, que estabelece ausência desse micro-organismo. Sabe-se que essa bactéria não faz parte da microbiota natural do pescado, sendo encontrada normalmente no trato intestinal do ser humano e de animais. Assim, sua presença decorre da alta contaminação do local onde os pescados são capturados ou na pós-captura, quando manipulado de forma inadequada.

Quanto à pesquisa de *Vibrio parahaemolyticus*, não foi constatada a presença desse patógeno nas amostras analisadas. Pressupõe-se que a ausência desse micro-organismo deve-se ao fato do mesmo possuir exigências próprias dos vibrios patogênicos, pois a sua presença independe da poluição antropogênica, sendo dependente da temperatura, salinidade e matéria orgânica<sup>31</sup>. Herrera et al.<sup>32</sup>, em estudo com peixes marinhos frescos comercializados na Espanha, também não isolaram essa bactéria das amostras analisadas.

Quanto às bactérias do gênero *Aeromonas* spp., 19 amostras (45,24%) estavam contaminadas por esse micro-organismo, sendo todas confirmadas como pertencentes à espécie *A. hydrophila*. Muito embora o habitat dessa bactéria seja o ambiente aquático, a detecção de *A. hydrophila* pode ter ocorrido pela possível contaminação cruzada, uma vez que as amostras tiveram contato com algumas superfícies, tais como as das próprias embarcações e canoas utilizadas para o transporte dos exemplares até o porto.

Outra hipótese possível refere-se à presença de pescadores portadores desse agente, tendo em vista que espécies de *Aeromonas* podem estar associadas a uma diversidade de infecções da pele, variando de leves lesões tóxicas, tais como lesões pustulosas, a infecções mais graves<sup>33</sup>.

*A. hydrophila* tem a capacidade de causar septicemia e lesões na pele em pessoas que estão com defesas comprometidas<sup>34</sup>.

Há de se considerar ainda que a atividade de pesca permite um contato constante dos pescadores com água de diversas origens, que podem estar contaminadas por esse agente. A contagem de psicotróficos verificada nas amostras de gelo pode indicar presença de *Aeromonas*, ao considerarmos que *A. hydrophila* é uma bactéria psicotrófica e que é bastante sensível às concentrações de NaCl<sup>35</sup>.

Rodrigues et al.<sup>36</sup>, ao verificarem a ocorrência de *Aeromonas* spp em tilápias cultivadas em pisciculturas no estado do Rio de Janeiro, detectaram a presença de *Aeromonas* em 68,1% das 70 amostras analisadas. Suh et al.<sup>37</sup> isolaram *Aeromonas* de Tilápias do Nilo (*Oreochromis Niloticus*) em criação intensiva, verificando que *A. hydrophila* foi a espécie dominante, variando de 32 a 35% nas amostras da água (lagoa e dos tanques-rede) e de superfície dos peixes, respectivamente. Esses autores também constaram que 74% das amostras de água e 56% das amostras de superfície dos peixes apresentaram atividade hemolítica.

Illanchezian et al.<sup>38</sup> isolaram 73 cepas de *A. hydrophila* em amostras de peixes e camarão, produzidas em cinco diferentes mercados de peixe em Chennai, Índia, onde 86,3% apresentaram atividade hemolítica. Isto ressalta a importância desse patógeno como agente causador de doenças em seres humanos e torna-se imperativa a importância da realização de novas pesquisas que caracterizem a patogenicidade de cepas de *Aeromonas* isoladas a partir de pescados, além de que se estabeleçam limites para essa bactéria em pescados.

Para a contagem de *Staphylococcus* spp, foram verificadas 13 amostras (30,95%) com contagens entre  $2 \times 10^3$  a  $3,1 \times 10^5$  UFC/g (Tabela 4). Nenhuma amostra apresentou contaminação por *Staphylococcus* coagulase positivo.

No entanto, o grupo de bactérias *Staphylococcus* coagulase negativo, quando isolado de alimentos, não deve ser ignorado, pois a sua capacidade toxigênica foi verificada por PCR<sup>39</sup>. Considerando-se que os seres humanos são portadores de *Staphylococcus* spp. na pele e em mucosas, deve-se adotar hábitos higiênicos durante a manipulação do pescado.

Acredita-se que as contagens de micro-organismos obtidas nesta pesquisa foram favorecidas

pela precária estrutura do porto de desembarque, aliado à presença de lixo e de animais (bovinos, cães e urubus) e práticas inadequadas de manipulação do pescado após chegada ao porto de desembarque. A qualidade da pescada amarela deve ser priorizada, pois, além do fato de ser um alimento perecível, é necessário considerar o alto valor de mercado da espécie.

**Tabela 4.** Contagens de *Staphylococcus* sp e pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positivo em amostras de pescada amarela, 2011

Amostras N= 13	<i>Staphylococcus</i> spp (UFC/g)	Prova de coagulase
01	$9,7 \times 10^3$	negativa
02	$1,3 \times 10^4$	negativa
04	$2,3 \times 10^4$	negativa
05	$1,3 \times 10^4$	negativa
06	$8,2 \times 10^3$	negativa
13	$2,0 \times 10^5$	negativa
14	$1,8 \times 10^5$	negativa
17	$3,1 \times 10^5$	negativa
23	$8,2 \times 10^4$	negativa
24	$9,8 \times 10^4$	negativa
27	$3,1 \times 10^5$	negativa
29	$2,8 \times 10^4$	negativa
39	$2,0 \times 10^3$	negativa

A contaminação após o desembarque poderá contribuir para a baixa qualidade e conseqüente diminuição da vida de prateleira do produto. Além disso, o consumo do peixe contaminado pode ser um perigo para a saúde humana, especialmente para populações suscetíveis, como crianças, idosos e imunodeprimidos.

## CONCLUSÃO

As amostras de gelo analisadas são impróprias para utilização na conservação da pescada amarela. A pescada amarela não apresentou contaminação por *Salmonella*, *Staphylococcus* coagulase positivo e *V. parahaemolyticus*, entretanto, apresentou contagens expressivas de bactérias mesófilas e coliformes, representando ainda risco de veicular a infecção por *A. hydrophila* para o consumidor. Faz-se necessário que a legislação brasileira passe por modificações no intuito de que se estabeleçam limites para bactérias em pescados com importância para a saúde pública.

## AGRADECIMENTOS

À FAPEMA, pela concessão da bolsa, e ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

## REFERÊNCIAS

1. Franco BDGM, Landgraf M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Atheneu; 2005.
2. Alves CL, Carvalho FLN, Guerra CG, Araújo WMC. Comercialização de pescado no Distrito Federal: avaliação das condições. *Hig Aliment*. 2002;16 (102/103):41-9.
3. Almeida Filho ES, Sigarini CO, Ribeiro JN, Delmondes EC, Stelatto E, Araújo Júnior A. Características microbiológicas de “pintado” (*Pseudoplatystoma fasciatum*) comercializado em supermercados e feira livre, no município de Cuibá-MT. *Hig Aliment*. 2002;16(99):84-8.
4. Brasil. Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura. 2010. [acesso 2012 abr. 12]. Disponível em: [http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes\_e\_Estatisticas/Boletim%20Estat%20C3%ADstico%20MPA%202010.pdf].
5. Almeida ZS, Coelho GK, Morais GC, Nahum VJI. Inventário e Diagnóstico das espécies ícticas comerciais marinhas e estuarinas maranhense. In: Silva AC, Fortes JLO, organizadores. Diversidade biológica, uso e conservação de recursos naturais no Maranhão. Projetos e ações em Biologia e Química. São Luís: UEMA; 2007. v. 2. p. 13-66.
6. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 18 de setembro de 2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. *Diário Oficial [da] União, Brasília (DF)*; 18 set 2003; Seção 1:14.
7. Vanderzant C, Splittstoesser DF. Compendium for the microbiological examination of foods. 3. ed. Washington: American Public Health Association; 1992.
8. APHA. American Public Health Association. Committee on microbiological methods for foods. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4. ed. Washington: APHA; 2001.
9. Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA, Taniwaki MH, Rosana FSS, Gomes RAR. Manual de métodos de análises microbiológica de alimentos. 3. ed. São Paulo: Varela; 2007.
10. ICMSE. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microorganisms in food. I-Their significance and methods of enumeration. 2. ed. Toronto: University Press; 1988.
11. Chen J. Pesquisa de *Vibrio parahaemolyticus* em atum (*Thunnus* spp) comercializado na zona sul do município de São Paulo-SP [dissertação de mestrado]. São Paulo (SP): Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia; 2004.
12. Palumbo SA, Williams AC, Buchanan RL, Phillips JG. Model for anaerobic growth of *Aeromonas hydrophila* K144. *J Food Protect*. 1991;55(4):260-5.
13. Havellar AH, Vonk M. The preparation of ampicilin dextrin agar for the enumeration of *Aeromonas* in water. *Lett Appl Microbiol*. 1988;7:169-71.
14. Saad SMI, Iaria ST, Furlanetto SMP. Motile *Aeromonas* spp in retail vegetables from São Paulo, Brazil. *Rev Microbiol*. 1995;26(1):22-7.
15. Carnahan AM, Behram S, Joseph SW. Aerokey II: a flexible key for identifying clinical *Aeromonas* species. *J Clin Microbiol*. 1991;29:2843-9.
16. Brasil. Ministério do Estado da Saúde. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. *Diário Oficial [da] União, Brasília (DF)*; 14 dez 2011; Seção 1:39.
17. Vargas DST, Quintaes KD. Potencial perigo microbiológico resultante do uso de caixas plásticas tipo monobloco, no armazenamento e transporte de pescados em São Paulo. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2003;23(3):517-22.
18. Lanzarin M, Almeida Filho ES, Ritter DO, Mello CA, Corrêa GSS, Ignácio CMS. Ocorrência de *Aeromonas* sp. e micro-organismos psicrotóxicos e estimativa do prazo de validade comercial de filé de pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*) mantidos sob refrigeração. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2011;63(6):1541-6.
19. Dorta VF, Matorini MCS, Almeida CKS, Silva RM, Cardoso Filho FC. Condições higiênico-sanitárias do gelo utilizado para conservação do pescado nos mercados de Teresina – PI. *Hig Aliment*. 2011;25(196/197):124-8.
20. Siqueira IB, Sousa PMO, Vieira BR, Okura MH. Análise de água dos bebedouros da Universidade da Cidade de Uberada-MG. *Hig Aliment*. 2011;25(194/195):98-102.
21. Falcão JP, Dias AMG, Correa EF, Falcão DP. Microbiological quality of ice used to refrigerate foods. *Food Microbiol*. 2002;19(4):269-76.
22. Scherer R, Daniel AP, August PR, Lazzari R, Lima RL, Fries LLM, et al. Efeito do gelo clorado sobre parâmetros químicos e microbiológicos da carne de carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*). *Ciênc Tecnol Aliment*. 2004;24(4):680-4.
23. Hagler NA, Hagler LCS. Indicadores microbiológicos de qualidade sanitária. In: Roitman I, Travassos LR, Azevedo JL, organizadores. Tratado de Microbiologia. São Paulo: Manole; 1988. p. 88-96.
24. Coelho MIS, Mendes ES, Cruz MCS, Bezerra SS, Silva RPP. Avaliação da qualidade microbiológica de águas minerais consumidas na região metropolitana de Recife, Estado de Pernambuco. *Acta Sci Health Sci*. 2010;32(1):1-8.
25. Silveira NFA, Neiva CRP, Lemos Neto MJ, Perez ACA, Mantovani DMB, Morgano M, et al. Caracterização higiênico-sanitária da cadeia produtiva do pescado marinho da Baixada Santista-SP. *Hig Aliment*. 2011;25(2):169-71.
26. Dias VLN, Ferreira EF, Corêia GA, Silva ECR, Oliveira IN, Mouchrek Filho VE, et al. Avaliação da qualidade de peixe comercializado em Imperatriz – MA. *Hig Aliment*. 2010;24(186/187):109-12.
27. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília (DF)*; 10 jan 2001; Seção 1(7-E):45-53.
28. ICMSE. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microorganisms in Foods. Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications. 2. ed. Londres: Blackwell Scientific Publications; 1986.
29. Fernandez AT, Barbosa FACV. Avaliação microbiológica de sardinhas descabeçadas e evisceradas oriundas de feiras-livres e peixarias do bairro da Pavuna-RJ. *Hig Aliment*. 2010;24(186/187):121-5.

30. Muratori MCS, Costa APR, Viana CM, Podesta Júnior RL. Qualidade sanitária do pescado "in natura". *Hig Aliment*. 2004;18(116/117):50-4.
31. Hervio-Heath D, Colwell RR, Derrien A, Robert-Pillot A, Fournier JM, Pommepuy M. Occurrence of pathogenic vibrios in coastal areas of France. *J Appl Microbiol*. 2002;92(26):1123-35.
32. Herrera FC, Santos JA, Otero A, Garcia-Lopez ML. Occurrence of foodborne pathogenic bacteria in retail prepackaged portions of marine fish in Spain. *J Appl Microbiol*. 2006;100(3):527-36.
33. Janda JM, Abbott SL. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity and infection. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23(1):35.
34. Park SY, Nam HM, Park K, Park SD. *Aeromonas hydrophila* Sepsis Mimicking *Vibrio vulnificus* Infection. *Ann Dermatol*. 2011;23 Suppl 1:S25-S29.
35. Daskalov H. The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety. *Food Control*. 2006;17:474-83.
36. Rodrigues E, Fonseca AB, Fernandes ML, Castagna AA, Feijó MB, Santos MAV. Diversidade na ocorrência de *Aeromonas* spp. em tilápias cultivadas em três diferentes pisciculturas do Estado do Rio de Janeiro. *Hig Aliment*. 2010;24(186/187):116-20.
37. Suhel MI, Schocken-Iturrino RP, Amaral LA. Atividade hemolítica e resistência a antimicrobianos por espécies de *Aeromonas* isoladas de criação intensiva de Tilápias do Nilo (*Oreochromis Niloticus*). *ARS Vet*. 2011;27(1):36-44.
38. Illanchezian S, Jayaraman S, Manoharan MS, Valsalam S. Virulence and Cytotoxicity of Seafood Borne *Aeromonas hydrophila*. *Braz J Microbiol*. 2010;41:978-83.
39. Cunha MLRS, Peresi E, Calsolari RAO, Araújo Júnior JP. Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative *Staphylococci* isolated from foods. *Braz J Microbiol*. 2006; 37(1):70-4.

# Magnésio urinário, plasmático e eritrocitário: validação do método de análise por espectrofotometria de absorção atômica com chama

## Magnesium contents in urine, plasma and erythrocyte samples: validation of analytical methodology using flame atomic absorption spectrophotometry

RIALA6/1522

Cristiane Hermes SALES, Vivianne de Sousa ROCHA, Luciana SETARO, Célia COLLI\*

\*Endereço para correspondência: Laboratório de Nutrição, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 14, Butantã, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 05508-000. Tel.: (11) 3091-3651, Fax: (11) 3091-4410. E-mail: cecolli@usp.br

Recebido: 14.10.2011 – Aceito para publicação: 04.10.2012

### RESUMO

Neste estudo foi validada a metodologia de análise de magnésio urinário, plasmático e eritrocitário por espectrofotometria de absorção atômica com chama. As análises foram realizadas em *pools* de amostras de urina, de plasma e de eritrócitos de humanos. Para a validação, foram considerados os parâmetros de linearidade da curva-padrão, faixa de trabalho, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão da medição. Os LD e LQ da curva foram, respectivamente, de 0,006 e 0,021 µg/mL de Mg para urina e plasma, e de 0,003 e 0,010 µg/mL de Mg para eritrócitos. A faixa linear de trabalho para determinação de Mg foi entre 0,05 e 0,5 µg/mL de Mg, e as curvas-padrão apresentaram coeficientes de correlação maiores do que 0,99, que demonstram a linearidade da metodologia. As precisões intra e interensaio superiores a 90% foram consideradas adequadas. As recuperações obtidas, usando-se materiais de referência certificados, foram de 101% e de 97%, respectivamente, em urina e plasma. As médias de recuperação por adição de padrão foram de 87% para urina e eritrócitos e de 91% para plasma. A metodologia avaliada foi linear, sensível, seletiva, precisa e exata; portanto, são confiáveis os resultados obtidos.

**Palavras-chave.** espectrofotometria de absorção atômica, magnésio, eritrócitos, plasma, urina, validação.

### ABSTRACT

This study aimed at validating the methodology for analyzing magnesium contents in urine, plasma, and erythrocytes samples by atomic absorption spectrophotometry. Pools of human urine, plasma, and erythrocytes samples were analyzed. The standard curve linearity, linear response range, detection limit (DL), quantitation limit (QL), precision, and accuracy of measurement were determined. DL and QL values were, respectively, 0.006 and 0.021 µg/mL of Mg for urine and plasma, and 0.003 and 0.010 µg/mL of Mg for erythrocytes. The linear response ranged from 0.05 to 0.5 µg/mL of Mg, and the standards curves showed the correlation coefficients higher than 0.99, which demonstrated the linearity of the methodology. Intra- and inter-assay precisions above 90% were considered adequate. The accuracy obtained with certified reference materials for urine and plasma was 101% and 97%, respectively. The average recoveries found by adding the standard were 87% for urine and erythrocytes, and 91% for plasma. Therefore, the evaluated methodology showed to be linear, sensitive, specific, precise and accurate, and the obtained results were reliable.

**Keywords.** atomic absorption spectrophotometry, magnesium, erythrocytes, plasma, urine, validation.

## INTRODUÇÃO

O magnésio (Mg) teve, nos últimos anos, importância reconhecida para diversos processos metabólicos. A alteração de sua homeostase é associada à maior incidência de doenças crônicas não transmissíveis (como diabetes tipo 2, hipertensão, doenças cardiovasculares e câncer), e o monitoramento de sua distribuição compartimental tem implicações fisiológicas importantes no âmbito da saúde<sup>1-3</sup>.

O *status* de Mg no organismo pode ser avaliado em vários compartimentos biológicos, sendo que sua concentração é determinada mais frequentemente em soro/plasma, também em urina, células sanguíneas (eritrócitos, monócitos e linfócitos) e, mais raramente, em músculo e osso, pela maior dificuldade de amostragem<sup>4-5</sup>.

A espectrofotometria de absorção atômica com chama é o método mais empregado para a determinação de minerais em amostras biológicas, por ser considerado acurado e relativamente simples<sup>6</sup>. Todavia, sempre chama a atenção o número pequeno de estudos de validação de métodos publicados, especialmente no Brasil, nas áreas de bioquímica, fisiologia e nutrição, o que mostra que essa é uma prática pouco frequente em muitos laboratórios de pesquisa. No entanto, a etapa de validação é fundamental para a obtenção de resultados confiáveis, uma vez que quando confiáveis são reprodutíveis, permitem conclusões acertadas e o delineamento de novas hipóteses. Portanto, é fundamental que os laboratórios se empenhem nessa importante etapa analítica, para economizar tempo e recursos, lembrando-se sempre que o método deve ser revalidado toda vez que houver alterações das condições analíticas (por exemplo, mudança de equipamento ou na composição dos reagentes usados)<sup>7,8</sup>.

O objetivo deste estudo foi validar o método de análise do Mg em amostras de urina, plasma e eritrócitos por espectrofotometria de absorção atômica (EAA) com chama, para viabilizar sua difusão e comparação em pesquisas em nutrição e na prática clínica.

## MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP (Protocolo CEP nº 339/2006) e seguiu os padrões exigidos pela Declaração de Helsinque. As amostras utilizadas no processo de validação foram provenientes de atletas de

voleibol profissional (n = 12), do sexo masculino, com idade entre 15 e 20 anos (18,1 ± 1,4 anos).

Toda vidraria foi previamente desmineralizada em banho de ácido nítrico 30%, por pelo menos 12 horas, e depois enxaguadas com água desmineralizada. Esse processo é realizado com o objetivo de remover os minerais da vidraria e evitar contaminação das amostras.

### Amostras biológicas

As amostras de urina de 24 horas, colhidas sem conservantes, foram acidificadas até pH 2 com ácido clorídrico 3 M (Synth®, São Paulo, Brasil), sendo posteriormente armazenadas em microtubos de polipropileno.

O sangue, colhido com seringas plásticas e agulhas de inox estéreis e descartáveis, foi transferido para tubos contendo citrato de sódio (Synth®, São Paulo, Brasil) a 30% (10 µg/mL de sangue), como anticoagulante, e centrifugado a 3.500 rpm, durante 15 minutos, a 4 °C. Após centrifugação, o plasma foi distribuído em alíquotas de 1 mL. O concentrado de eritrócitos foi lavado três vezes, por ressuspensão, com NaCl (Synth®, São Paulo, Brasil) a 0,9% (1:2 massa de eritrócitos para solução salina, v/v), e centrifugado a 10.000 rpm, por 10 minutos, a 4 °C, sendo o sobrenadante desprezado a cada etapa.

### Preparo dos pools

As amostras de urina foram homogeneizadas com auxílio de agitador magnético (IKA C-MAG HS 10, Wilmington, Carolina do Norte, EUA), durante 10 minutos, em rotação média. Preparado o *pool*, alíquotas de 1 mL deste foram armazenadas a -20 °C até o momento da análise. O mesmo procedimento foi utilizado no preparo dos *pools* de plasma e de eritrócitos.

### Determinação de Mg

O Mg foi determinado em espectrofotômetro de absorção atômica com chama (*Perkin Elmer AAnalyst 100* – Norwalk, CT, EUA), com lâmpada de cátodo oco, comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 285,2 nm, fenda ( $\phi$ ) de 0,7 nm, tempo de integração de 2 segundos e chama oxidante de ar/acetileno. O método de análise usado baseou-se em estudos prévios desenvolvidos em nosso laboratório<sup>9,10</sup>, em Nicoll et al.<sup>11</sup> e nas recomendações do manual do equipamento<sup>12</sup>.

A curva de calibração foi feita com MgCl<sub>2</sub> × 6H<sub>2</sub>O – 1.000 mg/L de Mg (Titrisol, Merck®, Darmstadt, Alemanha), no intervalo de 0,05 a 0,5 µg/mL de Mg.

Aos pontos da curva-padrão para análise de Mg em eritrócitos, foi adicionado glicerol (Merck®, Darmstadt, Alemanha), até concentração final de 5%. As curvas foram preparadas a cada dia de análise.

As amostras de urina (125 µL) e de plasma (250 µL) foram diluídas com água desmineralizada, em balões volumétricos, na proporção de 1:400 e 1:100, respectivamente. O concentrado de eritrócitos (300 µL) foi lisado com água desmineralizada (1:4, v/v). Desse lisado foram feitas diluições seriadas até que a diluição final do concentrado de eritrócitos fosse de 1:120.

A fim de minimizar interferências espectrais, foi adicionado lantânio, tanto nas amostras como na curva-padrão, em concentração final de 0,1%. Inicialmente, 14,66 g de La<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Merck®, Darmstadt, Alemanha) foram diluídos em 10 mL de água; posteriormente, foram acrescentados 62,5 mL de HCl concentrado (37%) e o volume completado para 250 mL.

### **Análise de hemoglobina**

A concentração de hemoglobina nos eritrócitos lavados foi quantificada pelo método da cianometahemoglobina<sup>13</sup>, utilizando reagentes da Labtest® (Lagoa Santa, MG, Brasil).

### **Validação**

No processo de validação do método, foram avaliados a linearidade, a faixa de trabalho e a faixa linear de trabalho, o limite de detecção (LD), o limite de quantificação (LQ), a precisão e a exatidão do método.

#### *Limites de detecção e de quantificação*

O LD inferior foi obtido pela multiplicação do desvio padrão de 10 leituras do branco por três, considerando a relação sinal/ruído de 3:1, e o produto dividido pelo coeficiente angular da curva de calibração. O LQ inferior foi obtido da mesma forma, mas considerando a relação sinal/ruído de 10:1<sup>8,14</sup>. Para os limites superiores da curva de calibração, considerou-se a informação do fabricante do equipamento, segundo a qual, nas condições usadas ( $\lambda$  285,2 nm,  $\Phi$  0,7 nm), são geradas curvas lineares até 0,5 µg/mL de Mg<sup>12</sup>.

#### *Linearidade*

A linearidade das curvas-padrão, obtida por 10 repetições de cada concentração dos pontos da curva

(cinco pontos para avaliação da urina e do plasma, e sete para eritrócitos), foi avaliada pelo coeficiente de correlação (*r*). Foi considerado adequado valor de *r* superior a 0,998.

#### *Sensibilidade*

A sensibilidade foi obtida pelo cálculo do coeficiente angular (inclinação) das curvas-padrão usadas para definir a linearidade<sup>15</sup>.

#### *Precisão*

A princípio, foram testadas diversas diluições das amostras, de modo a situar a resposta (absorvância) no centro da faixa linear de trabalho. Definidas as diluições (400 vezes para urina, 100 vezes para plasma e 120 vezes para eritrócitos), foi avaliada a precisão de medição, pela repetitividade, e a precisão intermediária, as quais foram obtidas pela relação do desvio padrão com a média aritmética dos resultados obtidos, que fornece a imprecisão do método. A precisão intraensaio foi avaliada pelo resultado de 10 determinações de cada *pool*, e a interensaio pela primeira determinação (primeiro dia) e mais 10 determinações do *pool* realizadas em um segundo e terceiro dias. Todas as análises foram realizadas pelo mesmo operador, no mesmo equipamento e nas mesmas condições experimentais. Considerou-se adequado valores de desvios padrões relativos (coeficiente de variação, que corresponde à imprecisão do método) inferiores a 15 %<sup>8,16,17</sup>.

#### *Exatidão*

A exatidão foi avaliada pela análise de materiais de referência certificados (MRC) e por ensaios de recuperação. A exatidão foi obtida pelo erro relativo – ER, comparando-se o valor médio obtido com o valor certificado, e expressa em porcentagem do viés<sup>8,15</sup>.

Os MRC usados foram: *Trace Elements Serum L-1* [lote JL4409] e *Urine Blank* [lote OK4636] (Seronorm®, Billingstad, Noruega). Por não se dispor de padrão certificado para análise de Mg em eritrócitos, o monitoramento das análises nesse compartimento deu-se apenas pela adição de padrão.

Para os ensaios de recuperação foram utilizadas as amostras diluídas conforme procedimentos descritos anteriormente. Alíquotas de cada amostra diluída foram transferidas para tubos de ensaio, e feita então a adição de padrões com concentrações diferentes de Mg: 0; 0,05; 0,1 e 0,2 µg/mL, para urina e plasma, e 0; 0,125; 0,25; 0,5

µg/mL, para eritrócitos. Para cada adição de padrão foram feitas 10 replicatas por amostra biológica. Considerou-se como adequados valores de recuperação entre 70 e 120%<sup>8,16</sup>.

### Análise estatística

Regressão linear, análise de variância (ANOVA) e teste *t-Student* para amostras não pareadas foram realizadas com *software* SPSS 15.0 for Windows (Chicago, Illinois, EUA), considerando nível de confiança de 95% e alfa de 5%.

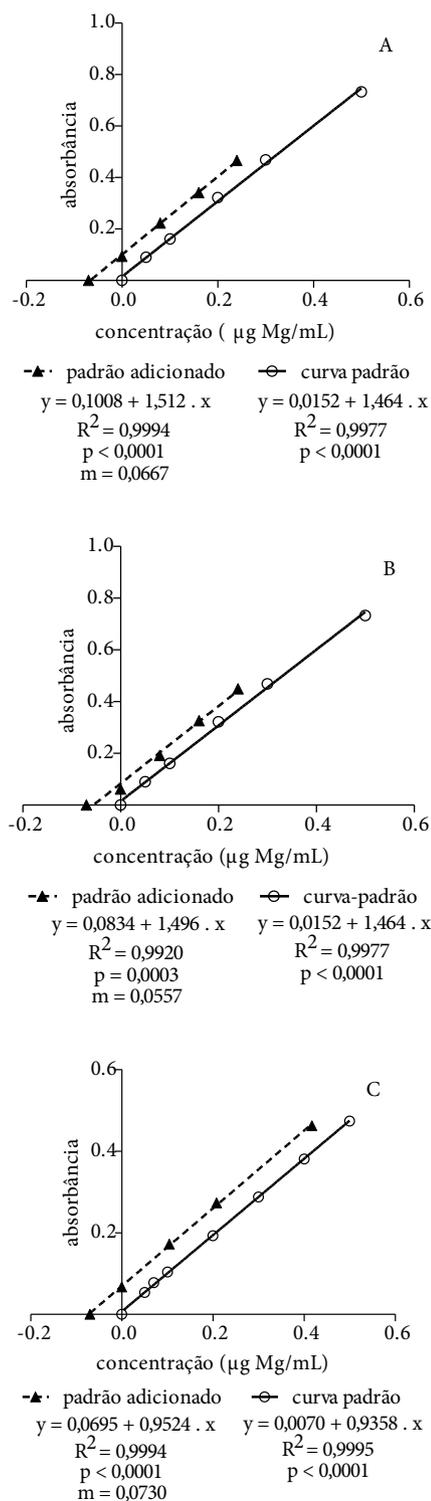
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente determinaram-se os LD e LQ, que foram, respectivamente, de 0,006 µg/mL de Mg e de 0,021 µg/mL de Mg em urina e plasma, e de 0,003 µg/mL de Mg e de 0,010 µg/mL de Mg em eritrócitos. Esses valores são similares a outros descritos na literatura por EAA<sup>18,19</sup>, e sua determinação permite que se estabeleça até que nível de concentração do mensurando o método é confiável<sup>14</sup>.

Determinados esses limites, a faixa linear de trabalho foi estabelecida entre 0,05 e 0,5 µg/mL de Mg. As curvas-padrão, geradas a partir de 10 replicatas de cada concentração, apresentaram coeficiente de correlação (*r*) de 0,9991 (sem glicerol; para plasma e urina) e de 0,9999 (com glicerol; para eritrócitos). A sensibilidade foi de 1,46 mL/µg em plasma e urina, e de 0,94 mL/µg em eritrócitos (Figura 1). Esses valores indicam um bom ajuste entre o sinal gerado pelo aparelho e a concentração obtida do mineral e comprovam a linearidade da curva, no intervalo de concentração estabelecido<sup>8,15</sup>.

As precisões intraensaio foram de 96% em urina, 95% em plasma e 96% em eritrócitos; e as interensaios de 95%, 95% e 96% em urina, plasma e eritrócitos, respectivamente.

Os resultados deste estudo são similares aos obtidos anteriormente em nosso laboratório, em outro EAA (Hitachi Z-5000; 97-98 % em urina, 95-96% em plasma<sup>10</sup> e 95-98% em eritrócitos<sup>9</sup>), e aos de Hulanicki et al.<sup>18</sup> (97% em plasma e soro e 93% em eritrócitos – EAA PU 9100X com atomizador PU 9390X Philips Scientific) e de Stone et al.<sup>19</sup> (precisão intraensaio de 97-99% e interensaio de 95-97% em amostras de soro – Varian AA1275). Gilroy et al.<sup>20</sup>, que avaliaram soro de felinos em analisador de eletrodo íon-seletivo CRT8 Nova, também obtiveram precisões similares: intraensaio de 99-100 % e interensaio de 98-99%.



**Figura 1.** Curvas-padrão de Mg e de adição de padrão em urina (A), plasma (B) e eritrócitos (C), n = 10, em cada ponto. y: resposta medida [absorbância], x: concentração, a: interseção com o eixo y quando x = 0 [erro randômico ou indeterminado] e b: inclinação [sensibilidade]; R<sup>2</sup>: coeficiente de determinação; p: nível de significância; m = tg α = a/b

Os valores obtidos de precisão estão dentro do limite aceitável (> 90%) para micronutrientes<sup>14,21</sup> e dentro do recomendado pela ANVISA<sup>8</sup>, indicando que a variabilidade entre os resultados, que é associada ao erro aleatório, ou seja, ao erro não previsível (que ocorre ao acaso e tende a diminuir após várias repetições), está dentro da variação prevista. Vale destacar que é mais aconselhável que se adote, na avaliação do método, a precisão intermediária (interensaio) ao invés da repetitividade (intraensaio), por ela ser a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório<sup>16</sup>.

É importante que se assegure que os métodos usados para avaliação de minerais apresentem boa precisão, uma vez que as concentrações presentes nas amostras comumente são baixas, e minimizar possíveis erros.

Outro parâmetro fundamental para que se obtenham resultados confiáveis é a exatidão, que representa o grau de concordância entre o valor médio obtido de uma série de resultados, com um valor verdadeiro convencional ou um valor de referência aceito<sup>14</sup>, e, tanto nos ensaios com MRC quanto nos ensaios de recuperação na matriz (Tabela 1), observaram-se resultados dentro de limites aceitáveis: 70-120%.

**Tabela 1.** Exatidão do método de avaliação de Mg em amostras de urina, plasma e eritrócitos, avaliadas pela adição de padrões

Amostras	Quantidade de Mg (µg/mL)		n	% recuperação		
	amostra	padrão adicionado		$\bar{x}(s)$ individual*	$\bar{x}(s)$ total†	CV%
Urina	0,048	0,000	10	-	87,0(6,3)	7,3
	0,048	0,050	10	94,3(6,8)		
	0,048	0,100	10	83,1(2,5)		
	0,048	0,200	10	83,6(2,1)		
Plasma	0,026	0,000	10	-	90,5(4,4)	4,9
	0,026	0,050	10	95,5(1,2)		
	0,026	0,100	10	88,7(0,7)		
	0,026	0,200	10	87,2(0,3)		
Eritrócitos	0,062	0,000	10	-	87,1(0,8)	0,9
	0,062	0,125	10	87,5(3,0)		
	0,062	0,250	10	86,2(1,3)		
	0,062	0,500	10	87,7(1,2)		

$\bar{x}$ : média; s: desvio padrão; CV%: coeficiente de variação em porcentagem.

\* médias e desvios padrões obtidos dos resultados das 10 replicatas de cada ponto avaliado.

† médias e desvios padrões de todos os pontos avaliados.

Neste estudo, com o uso dos MRC foram obtidas exatidões (erros relativos) de 101% e de 97% em ensaios feitos na urina e no plasma, respectivamente, e com os ensaios de recuperação, de 87%, 91% e 87% (Tabela 1) foram obtidas para o método, quando as matrizes foram, respectivamente, urina, plasma e eritrócitos.

Dentre os estudos de validação de magnésio encontrados na literatura, o único que usou MRC foi Hulanicki et al.<sup>18</sup>, que obtiveram exatidões de aproximadamente 92% usando o *Quality Serum KONE*. O uso correto do MRC, além de permitir avaliar o desempenho das análises de um laboratório, é mais recomendado, por minimizar erros sistemáticos<sup>15,21</sup>.

Em ensaios de recuperação, outros estudos utilizando EAA obtiveram resultados de exatidão similares aos do presente estudo<sup>19,22,23</sup>. As pequenas variações de recuperação observadas entre os estudos podem ser explicadas: 1) pelo próprio método em si, ou seja, ser um erro inerente ao método; 2) por diferenças nas marcas dos equipamentos; 3) manejo técnico do operador; 4) pelo diluente utilizado para o preparo das amostras poder gerar alguma interferência; ou ainda, 5) pela matriz utilizada em cada estudo, que, dependendo da quantidade de outras substâncias presentes nesta matriz, pode influenciar no processo de atomização.

Outro parâmetro avaliado foi a seletividade: as curvas de padrão adicionado apresentaram forte correlação ( $r = 0,9999$  em urina,  $0,9999$  em plasma e  $0,9997$  em eritrócitos) e paralelismo com as curvas analíticas padrão (Figura 1), o que comprova a não interferência das matrizes testadas.

Pode-se, portanto, afirmar que o método é adequado para análise de Mg não somente em plasma, como em urina e em eritrócitos (havendo poucos estudos de validação feitos nessas células). O conjunto dessas determinações permite a avaliação mais completa do *status* de Mg em diferentes condições de saúde do ser humano.

## CONCLUSÃO

Com base nos dados obtidos, pode-se concluir que o método testado é preciso e exato, além de sensível e seletivo para a determinação de Mg na urina, plasma e eritrócitos, gerando resultados confiáveis.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo 2006/05601-9), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (Processo 404577) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Processo 142618/2005-5), pelas bolsas de mestrado e doutorado concedidas às alunas envolvidas neste trabalho.

## REFERÊNCIAS

1. Nielsen FH. Magnesium, inflammation, and obesity in chronic disease. *Nutr Rev*. 2010;68(6):333-40.
2. Rosanoff A, Weaver CM, Rude RK. Suboptimal magnesium status in the United States: are the health consequences underestimated? *Nutr Rev*. 2012;70(3):153-64.
3. Sales CH, Pedrosa LFC, Lima JG, Lemos TMAM, Colli C. Influence of magnesium status and magnesium intake on the blood glucose control in patients with type 2 diabetes. *Clin Nutr*. 2011;30:359-64.
4. Izquierdo AS, Boudet GA, Otero MS, Fernández GMD, González RJ, García de Janlón CA, et al. Estimation of precision and inaccuracy for serum magnesium determination on the basis of interlaboratory comparison data Accreditation ISO 15189. *Magnes Res*. 2008;21(1):51-7.
5. Noronha JL, Matuschak GM. Magnesium in critical illness: metabolism, assessment, and treatment. *Intens Care Med*. 2002;28:667-79.
6. Whitehouse RC, Prasad AS, Rabbanu PI, Cossack ZT. Zinc in plasma, neutrophils, lymphocytes, and erythrocytes as determined by flameless atomic spectrophotometry. *Clin Chem*. 1982;28(3):475-80.
7. Keith LH, Crummett W, Deegan JJ, Libby RA, Taylor JK, Wentler G. Principles of environmental analysis. *Anal Chem*. 1983;55(14):2210-8.
8. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução n° 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília (DF); 2 jun 2003. [acesso em: 2007 jan 19]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899\_03re.htm].
9. Sardinha FAA. Avaliação do estado nutricional em magnésio, ferro, zinco e cobre de atletas de polo aquático feminino em períodos de treinamento pré-competitivo, de destreinamento e de treinamento de manutenção [tese de doutorado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2002.
10. Mendes Netto RS. Estado nutricional em magnésio como determinante da eficiência da suplementação de creatina em praticantes de musculação [tese de doutorado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2004.
11. Nicoll GW, Struthers AD, Fraser CG. Biological variation of urinary magnesium. *Clin Chem*. 1991;37(10):1794-5.
12. Perkin-Elmer. Atomic absorption spectroscopy. Analytical methods. Norwalk: The Perkin-Elmer Corporation; 1996.
13. Austin JH, Drabkin DL. Spectrophotometric studies. III. Methemoglobin. *J Biol Chem*. 1935;112:67-88.
14. International conference on harmonization (ICH) of technical requirements for the registration of pharmaceuticals for human use. Validation of analytical procedures: text and methodology. Q2(R1). 2005. Disponível em: [http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf].
15. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (Brasil). DOQ-CGCRE-008. Orientação sobre validação de métodos analíticos. Revisão 03; fev 2010 [acesso em: 2012 maio 21]. Disponível em: [http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8\_03.pdf].
16. Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSE, Melo LFC. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim Nova*. 2004;27:771-80.
17. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (Brasil). Vocabulário Internacional de Metrologia. Conceitos fundamentais e gerais e termos associados (VIM 2008). INMETRO: Rio de Janeiro; 2009. 78p.
18. Hulanicka A, Godlewska B, Brzóska M. Determination of total magnesium in biological samples using electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochim Acta Part B*. 1995;50:1717-24.
19. Stone MJ, Chowdrey PE, Miall P, Price CP. Validation of an enzymatic total magnesium determination based on activation of modified isocitrate dehydrogenase. *Clin Chem*. 1996;42(9):1474-7.
20. Gilroy CV, Burton SA, Horney BS, Mackenzie AL. Validation of the Nova CRT8 for the measurement of ionized magnesium in feline serum. *Vet Clin Pathol*. 2005;34:124-31.
21. Dos Santos HG, Sardinha FAA, Colli C. Zinco eritrocitário (validação de um método de análise) e zinco dietético na avaliação do estado nutricional de mulheres adultas. *Braz J Pharm Sci*. 2005;41(2):205-13.
22. Gimblet EG, Marney AF, Bonsnes RW. Determination of calcium and magnesium in serum, urine, diet, and stool by atomic absorption spectrophotometry. *Clin Chem*. 1967;13(3):204-14.
23. Willis JB. Determination of calcium and magnesium in urine by atomic absorptions spectroscopy. *Anal Chem*. 1961;33(4):556-9.

## Uso do conceito do erro total, dos perfis de exatidão e do índice de exatidão no pré-estudo de validação de ensaio imunoenzimático

### Use of the total error concept, the accuracy profiles and the accuracy index in the pre-study validation of an enzyme-linked immunosorbent assay

RIALA6/1523

Jorge Luiz dos Santos POSSAS, Jarbas Emílio dos SANTOS, Michele Cardoso do NASCIMENTO, Patrícia Alves dos SANTOS, Deivid Wanderson Couto dos ANJOS, Wlamir Corrêa de MOURA\*

\*Endereço para correspondência: Laboratório de Vacinas Virais, Departamento de Imunologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, FIOCRUZ-RJ. Tel.: (21) 3865-5130. E-mail: wlamir.moura@incqs.fiocruz.br  
Recebido: 18.04.2012 – Aceito para publicação: 08.11.2012

#### RESUMO

O uso do conceito do Erro Total em validação de métodos analíticos é abordagem que incorpora a expressão da soma da veracidade e da precisão. Esse método utiliza ainda os Perfis de Exatidão baseados em intervalos de tolerância (ou intervalos de predição) para decidir se um modelo de calibração dará resultados de qualidade e prevê o controle do risco de aceitar uma metodologia imprópria. Com a finalidade de avaliar o uso dessas ferramentas para efetuar a validação de bioensaios, foram aplicados o Conceito do Erro Total, os perfis de Exatidão e os Índices de Exatidão no pré-estudo de validação de ELISA para determinar o teor de ovoalbumina em vacinas, abrangendo-se o intervalo de 33-167% da concentração alvo (5,0µg/mL) e um intervalo controle abaixo dessa faixa (0,33-2,5%). O pré-estudo de validação demonstrou que o ensaio apresenta exatidão, precisão, linearidade e veracidade em conformidade no intervalo de concentrações 1,25-10µg/mL, e mostrou ser ensaio confiável para avaliar o teor de ovalbumina. A abordagem do conceito do Erro Total é ferramenta para efetuar validações que apresentam desempenho superior à abordagem clássica, que avalia os componentes de veracidade e precisão isoladamente, e é capaz de identificar deficiências na Exatidão de um bioensaio.

**Palavras-chave.** vacina, validação, bioensaio, erro total, ELISA.

#### ABSTRACT

The use of the Total Error approach for validating the analytical methods incorporates the expression of the sum of trueness and precision. This analysis also uses the Accuracy Profiles based on tolerance intervals (or prediction intervals) to determine whether a calibration model will provide quality results and to predict the control of risk in accepting an inadequate methodology. In order to evaluate the use of the Total Error, the Accuracy Profiles and the Accuracy Index approaches for validating bioassays, these tools were used in the pre-study of validation of an ELISA for determining the ovalbumin contents in vaccines. And it covered the range of 33-167% of target concentration (5.0 µg/mL) and the control interval below this range (0.33-2.5%). The pre-study validation showed that this assay demonstrates complying accuracy, precision, linearity and accuracy in the concentration range of 1.25-10µg/mL; and it is a reliable methodology to assess the ovalbumin contents. The Total Error approach is a validation tool that shows superior performance, when compared to the classical analysis, which assesses the trueness and precision components separately, and it is qualified to identify the deficiencies in the accuracy of a bioassay.

**Keywords.** vaccine, validation, bioassay, total error, ELISA.

## INTRODUÇÃO

Os bioensaios, normalmente usados para estimar a potência de drogas, distinguem-se de testes químicos por serem realizados em substratos biológicos (e.g. animais, células vivas ou complexos funcionais de receptores-alvo). Devido a múltiplos fatores operacionais e biológicos oriundos da base biológica, eles tipicamente exibem maior variabilidade em relação aos testes baseados em química<sup>1</sup>. Cada unidade experimental tem uma individualidade que confere características que diferem de uma unidade para a outra. Como consequência, uma variabilidade, por vezes importante, é observada. Além dessa variabilidade inerente às unidades experimentais, devem ser consideradas todas as outras fontes de variação: fatores imprevisíveis ou sistemáticos que não estejam sob controle (como efeito de lotes de reagente, efeito da temperatura, variação ao longo do tempo e interferências específicas)<sup>2</sup>.

Sistemas de garantia da qualidade, como as Boas Práticas de Fabricação e a ISO/IEC 17025<sup>3</sup>, requerem o uso de procedimentos analíticos devidamente validados. Embora seja aceito que métodos farmacopeicos não requeiram revalidação<sup>4</sup>, para a liberação de lotes de produtos, certos procedimentos devem ser realizados para garantir que esses métodos sejam aplicáveis na sua utilização e pode ser necessário confirmar a precisão do método ou a sua confiabilidade em atingir os níveis de detecção do método validado.

A conformidade de um dado método com os objetivos de uso é normalmente avaliada em duas fases. Primeiro uma fase de “pré-estudo” é conduzida para provar, com base em um desenho de experimento, que o método é capaz de apresentar resultados de qualidade. Então, no uso de rotina, o laboratório deve verificar se o método analítico de interesse se mantém válido ao longo do tempo e que cada corrida obtenha medidas confiáveis<sup>5</sup>.

Na indústria farmacêutica, validações analíticas são realizadas de acordo com o guia da International Conference on Harmonization (ICH)<sup>6</sup>, no entanto, na introdução desse guia, parte II, é declarado que “devido a sua natureza complexa, procedimentos analíticos para produtos biológicos ou biotecnológicos, em alguns casos, podem ser abordados de forma diferente deste documento”<sup>5</sup>. Manter-se fiel às recomendações do ICH é inviável, especialmente no caso de produtos compostos por matrizes biológicas (vacinas e soros), e/ou de uso de ensaios biológicos ou de ambos<sup>2</sup>.

O ICH<sup>6</sup> recomenda que para estudos de validação de ensaio de natureza quantitativa os parâmetros mais relevantes a serem avaliados são a Linearidade (habilidade, em uma dada faixa, do ensaio obter resultados que são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra), a Exatidão (grau de concordância entre resultados de um teste ou resultado de uma medição e o valor verdadeiro<sup>7</sup>) e a Precisão (grau de concordância entre resultados independentes de testes/medições, obtidos sob condições especificadas<sup>7</sup>).

A Norma ISO 5725<sup>8</sup>, em sua parte 1, provê uma definição adequada para a determinação da Exatidão de métodos quantitativos, definida como a soma da Veracidade (grau de concordância entre a média de um número infinito de valores medidos repetidos e um valor de referência<sup>7</sup>) e da Precisão (grau de concordância entre expectativas de um resultado de teste ou medição e um valor verdadeiro<sup>7</sup>), sendo a Veracidade expressa como a Tendência (do termo inglês *bias*, diferença entre a expectativa de resultado de um teste ou medição e um valor verdadeiro, expressando o total do erro sistemático em contraste ao erro aleatório<sup>7</sup>). Essa abordagem para validação e transferência de métodos analíticos, também chamada de “Conceito do Erro Total”<sup>9</sup>, desde sua publicação inicial pela comissão da “Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques” (SFSTP), tem sido difundida, já sofreu algumas modificações e recebeu propostas visando um processo contínuo de melhorias<sup>10</sup>.

Esse conceito se baseia na utilização de um intervalo de conteúdo- $\beta$  de tolerância, inicialmente proposto por Mee<sup>11</sup> que define um intervalo que contém uma proporção esperada  $\beta$  de futuros resultados, seguindo a notação clássica em estatística,  $\beta$  representa a probabilidade de ocorrência do Erro tipo II – a probabilidade de aceitar-se a hipótese nula quando ela está errada; nesse contexto corresponderá ao erro de concluir que um resultado esteja satisfatório quando ele estiver insatisfatório<sup>12</sup>. Essa abordagem global considera um procedimento conforme se a probabilidade de que a diferença entre cada medida de uma amostra e seu “valor verdadeiro” estiver dentro de limites de aceitação predefinidos pelo analista. O valor dos limites deve ser escolhido de acordo com o objetivo de uso dos resultados. O objetivo é ligado às normas utilizadas para o ensaio (e.g. 15% em amostras clínicas, 30% para ensaios de ligação como Radio Imuno Ensaio e ELISA etc.<sup>5</sup>).

Na fase de pré-estudo, o procedimento de validação consiste em mensurar um conjunto de

amostras para o qual os valores nominais sejam conhecidos e organizados de acordo com um desenho de experimento ideal. O desenho deverá permitir que sejam mensurados a Veracidade e a Precisão nos diferentes valores nominais e, se necessário, prover uma decomposição da precisão global nos seus diversos componentes de variâncias (repetibilidade, entre-ensaios e entre-laboratórios<sup>5</sup>).

É de primordial importância ter definições claras dos parâmetros de validação diferentes para avaliar a validade deste. Também é necessário ter metodologias de acordo com essas definições e, conseqüentemente, utilizar métodos estatísticos que sejam relevantes com essas definições, com o objetivo da validação e com o objetivo do método analítico.

Vários autores têm assinalado as inconsistências entre algumas definições dos parâmetros e os procedimentos experimentais propostos para avaliá-los em documentos dedicados à validação de métodos analíticos na área farmacêutica, juntamente com os riscos e problemas ao tentar lidar com os contraditórios, e às vezes cientificamente irrelevantes, requisitos e definições. Para ensaios bioanalíticos, revisões extensas já avaliaram o problema da diferença da definição de exatidão relativa e veracidade<sup>10,13-16</sup>.

Apenas quando a avaliação da exatidão dos resultados leva em conta o conceito do Erro Total, haverá garantias tanto ao laboratório quanto aos órgãos reguladores da habilidade do método em atingir seu propósito, enquanto a decisão baseada na avaliação em separado do critério de veracidade e precisão não pode atingir isto<sup>17</sup>.

### **O Conceito do Erro Total**

O uso de intervalos de confiança e/ou Erro Total em validação de métodos tem sido discutido ou proposto na literatura<sup>2,10,16-21</sup>. O uso do Erro Total é uma abordagem estatística e cientificamente fundamentada que incorpora tanto os erros sistemáticos quanto os aleatórios. O conceito do Erro Total reflete quão grande o erro de medida pode ser e é facilmente entendido por analistas. Outra vantagem é que essa abordagem permite o controle do risco de aceitar-se um método impróprio enquanto provê garantias de que os resultados das medições, que serão obtidos durante o uso futuro do método validado, estarão incluídos dentre limites de aceitação fixados de acordo com os requisitos. Esse último ponto não é apenas essencial para o analista, assim como suas conclusões e

diagnóstico são feitos em relação aos resultados obtidos. Também é uma crescente exigência das autoridades regulatórias gerenciar o risco associado ao uso desses métodos na análise de rotina<sup>22,23</sup>.

Essa abordagem tem sido utilizada extensivamente para métodos físico químicos, e Findlay et al.<sup>24</sup> recomendaram seu uso para validação de imunoenaios no campo farmacêutico; Gibelin et al.<sup>2</sup> comprovaram sua utilidade em ensaios de avaliação de atividade viral em cultura de células na produção de vacinas aviárias; Dos Santos et al.<sup>25</sup> aplicaram o conceito do Erro Total na validação de um ensaio de potência para vacina viral contra poliomielite oral; e Gaudin e Laurentie<sup>26</sup> aplicaram o conceito na revalidação de um ensaio imunoenzimático anteriormente validado pela abordagem clássica.

### **O Perfil de Exatidão e o Índice de Exatidão**

O Perfil de Exatidão é uma ferramenta para tomada de decisão para acessar a validade de um método analítico, ou seja, sua habilidade para quantificar o mais exatamente quanto possível e é obtido simplesmente através da ligação dos limites inferiores e da ligação dos limites superiores. A inclusão do Perfil de medição de erro, dentro dos limites de aceitação preestabelecidos nos níveis-chave, deve ser examinada antes de declarar que o procedimento é válido sobre um intervalo específico de valores. Derringer e Suich<sup>27</sup> e Derringer<sup>28</sup> elaboraram os índices globais de conveniência (IGC) baseados nos critérios mais importantes de validação, que permitem calcular um Índice denominado Índice de Exatidão. Quando aplicados aos Perfis de Exatidão, esses índices permitem aumentar a objetividade da tomada de decisão.

Estimar os parâmetros Veracidade e Precisão, variância intrasséries e variância interséries em cada nível de concentração, não é o objetivo final, mas uma etapa necessária para calcular a proporção esperada de resultados situados nos limites de aceitação<sup>19</sup>.

### **Cálculo da Incerteza**

A incerteza de Medição é um parâmetro associado a um resultado de medição ou teste que caracteriza a dispersão dos valores que razoavelmente são atribuídos a uma particular quantidade submetida à medição ou característica submetida ao Teste<sup>7</sup> e, segundo a EURACHEM<sup>29</sup>, é a indicação quantitativa da qualidade dos resultados de medição, sem a qual os mesmos não poderiam ser comparados entre si, com os

valores de referência especificados ou com um padrão. No entanto, a norma ISO 17025 reconhece que, em determinados casos, a natureza do método de teste pode impedir um cálculo da incerteza de medição rigoroso, válido metrológica e estatisticamente, mas define que laboratórios de ensaio devem possuir e aplicar procedimentos para estimá-la<sup>3</sup>.

### **A Vacina Contra Febre Amarela**

A vacina contra febre amarela é constituída de vírus “vivo” atenuado e apresentada sob a forma liofilizada. Após a reconstituição com diluente apropriado, tem aspecto de suspensão homogênea, podendo demonstrar coloração devido à presença de indicador de pH. A produção da vacina é baseada no sistema de lote-semente primário da cepa 17D, da qual, por meio de passagens em ovos embrionados de galinha SPF (Specific Pathogen Free – livre de micro-organismos patogênicos) ou em cultura de células suscetíveis, se origina o lote-semente secundário.

Quando a vacina é produzida em ovos, a ovoalbumina é um resíduo da produção e só pode estar presente em uma concentração  $\leq 5 \mu\text{g}/\text{dose}$ <sup>30</sup>. A detecção é feita por um ensaio imunoenzimático (ELISA) desenvolvido em Biomanguinhos (FIOCRUZ – RJ). Ensaios imunoenzimáticos envolvem reagentes derivados de fontes biológicas e podem estar sujeitos a uma inerente variabilidade<sup>31</sup>.

### **A Ovoalbumina**

A ovoalbumina está presente na clara do ovo e corresponde a 54% da proteína da clara<sup>32</sup>. É um dos principais alérgenos da clara do ovo de galinha e é frequentemente a causa de reações de hipersensibilidade a alimentos. As alergias ao ovo ocorrem em cerca de 0,5% da população e em cerca de 5% das crianças com alergias. Quantidades de proteínas do ovo encontrado na vacina contra influenza (ou seja, cerca de 0,02 a 1,0  $\mu\text{g}$  por dose) são suficientes para induzir reações graves de hipersensibilidade, mas raramente fatais em crianças com alergia ao ovo<sup>33</sup>.

A proposta desta pesquisa é avaliar abordagens alternativas para validação de métodos de bioensaios quantitativos do tipo imunoenzimático, aplicando o conceito do Erro total, o Perfil de Exatidão e os Índices Globais de Conveniência com a finalidade de testar a capacidade dessas ferramentas em demonstrar a adequação de um método à finalidade de uso.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Com a finalidade de avaliar a utilização do Conceito do Erro Total como ferramenta em validações de bioensaios, no presente trabalho realizamos o pré-estudo de validação do ensaio imunoenzimático (ELISA) cujo propósito de uso é a determinação do teor de ovoalbumina residual (EDTO) para vacinas contra Febre Amarela, sendo, portanto, classificado como um ensaio de determinação de impurezas.

O trabalho consistiu de diferentes etapas:

a) Pré-estudo de validação – como uma etapa necessária para aplicação do conceito do Erro Total, a construção dos Perfis de Exatidão e o cálculo do Índice de Exatidão foram determinados os seguintes parâmetros:

- Função de Resposta (relação entre a resposta instrumental e a concentração<sup>16</sup>);
- Linearidade (relação entre a quantidade introduzida e a quantidade calculada em retorno através da curva de calibração<sup>16</sup>);
- Intervalo de Quantificação;
- Limite de Quantificação;
- Veracidade;
- Precisão (intraensaios, entre ensaios e precisão intermediária).

b) Avaliação da Exatidão do ensaio utilizando o Conceito do Erro Total para construir Perfis de Exatidão dos resultados, obtidos no modelo de regressão não linear logística de quatro parâmetros (modelo 4PL).

c) Avaliação dos perfis de Exatidão utilizando os Índices Globais de Conveniência, como descrito por Rozet et al.<sup>17</sup>, para o cálculo do Índice de Exatidão.

d) Os perfis de Exatidão foram ainda utilizados para identificar a concentração de padrão de ovoalbumina que, ao ser utilizada na elaboração da curva de calibração, obteria resultados mais exatos, comparando a concentração recomendada na Farmacopeia Brasileira<sup>30</sup> com outras concentrações do padrão utilizadas no estudo.

### **Amostras de Padrões**

O pré-estudo de validação analisou apenas amostras de padrões diluídas ora como padrão de calibração, ora como padrões de validação em diferentes concentrações. Foi utilizado um lote de padrão de ovoalbumina de ovos de galinha (Sigma, A2512), preparado no laboratório, na concentração

de 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , que foi diluído para obter as diferentes concentrações utilizadas.

### **Padrão de Calibração**

O padrão de calibração foi utilizado na concentração 1,00  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , como recomendado na Farmacopeia Brasileira<sup>30</sup>.

### **Padrões de Validação**

Foram utilizados padrões de validação nas concentrações 0,0156; 0,0625; 0,25; 1,25; 1,82; 5,0; 6,86 e 10,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Posteriormente, os valores de densidades óticas (OD) obtidos com as concentrações 1,25; 1,82 e 5,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  foram utilizados na construção da curva padrão para determinação das concentrações dos demais padrões de validação em função destas, com a finalidade de avaliar a concentração de padrão que renderia resultados mais exatos.

### **Método analítico: ELISA para a determinação do teor de ovoalbumina**

Os padrões de ovoalbumina de calibração e de validação foram submetidos ao EDTO. A curva padrão de ovoalbumina foi realizada com oito diluições contendo de 1,0  $\mu\text{g}$  a 0,008  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . A cada ensaio, o padrão de calibração e os padrões de validação foram previamente diluídos em salina tamponada com fosfatos com *tween* 20 e leite em pó desnatado (PBS/T20 0,05%/NFDM), visando obter as concentrações desejadas, e foram aplicados nos primeiros poços sendo diluídos, com fator dois, a partir dos segundos poços da placa até completar um total de oito diluições para cada padrão. Controles positivos e negativos (branco) foram incluídos em cada placa. A placa de 96 orifícios (MaxSorp™, Nunc, NY, USA) foi previamente sensibilizada com anticorpos de coelho antiovoalbumina (Biomanguinhos/FIOCRUZ) em tampão carbonato-bicarbonato de sódio pH 9,6 e bloqueada com albumina sérica bovina a 3% (p/v). A incubação foi realizada por 30 min a 37 °C. As placas foram lavadas com salina tamponada com *tween* 20 (PBS/T20 0,05%) e o anticorpo de coelho antiovoalbumina (Biomanguinhos/FIOCRUZ) conjugado a peroxidase em PBS/T20 0,05%/NFDM foi adicionado. Foi realizada nova incubação por 30 min a 37 °C e nova lavagem. A reação foi revelada com o substrato para a peroxidase em tampão citrato-fosfato pH 5,0 e foi interrompida com ácido sulfúrico 2 M. A leitura das DOs foi realizada em leitor de microplacas a um comprimento de onda

bicromático de 450/630 nm. O teor de ovoalbumina residual foi calculado utilizando o modelo 4PL no software estatístico CombiStats do EDQM<sup>34</sup>.

### **Pré-estudo de validação**

#### *Matriz de Ensaios*

Com a finalidade de avaliar os parâmetros definidos, uma matriz de ensaios foi desenhada visando obter o máximo de informações de cada corrida e foi estabelecido que seriam realizadas no mínimo cinco corridas válidas ( $p = 5$ ) com cinco concentrações do padrão ( $m = 5$ ) em duas replicatas ( $n = 2$ ). Foram estudados dois intervalos de doses: o Intervalo de Estudo e o Intervalo de Controle.

#### *Intervalo de Estudo*

Para o intervalo de estudo, as concentrações foram proporcionalmente espaçadas em escala logarítmica, como recomendado em USP<sup>35</sup>, visando abranger a faixa de 33 a 167% da concentração alvo de 5,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , uma vez que o limite de aceitação do teor de ovoalbumina na vacina de febre amarela são 5,0  $\mu\text{g/dose}$ . As concentrações escolhidas foram 25% (1,25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), 36,4% (1,82  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), 100% (5,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), 137% (6,86  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e 200% (10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

#### *Intervalo de Controle*

Para o intervalo de controle, posteriormente, quatro ensaios adicionais ( $p = 4$ ) com três replicatas ( $n = 3$ ) foram realizados utilizando três concentrações ( $m = 3$ ), abaixo do intervalo recomendado em USP<sup>35</sup>, 0,31% (0,0156  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), 1,25% (0,0625  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e 5% (0,25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), para testar a sensibilidade da abordagem adotada, estendendo o Intervalo de doses até o esgotamento da resposta, avaliando o comportamento do ensaio deliberadamente fora do Intervalo 33-167%.

Um total de nove ensaios válidos foi utilizado no estudo, cinco do Intervalo de Estudo e quatro do Intervalo Controle.

### **Análise Estatística**

Os resultados do teor de ovoalbumina foram calculados para cada replicata de cada concentração do padrão, para cada um dos ensaios, pelo modelo de regressão não linear logística de quatro parâmetros (modelo 4PL), utilizando o software CombiStats<sup>34</sup>.

A homogeneidade dos resultados de ensaios obtidos em cada concentração foi avaliada pelo método de

Grubbs<sup>36</sup> para identificação de valores aberrantes (*outliers*). Apenas uma replicata foi identificada como valor aberrante e foi substituído pelo valor da outra replicata para permitir a realização dos cálculos, uma vez que foi adotado um modelo balanceado que necessita de um número idêntico de corridas e replicatas para cada concentração.

Foi empregada a abordagem do Conceito do Erro Total, seguindo as recomendações da SFSTP<sup>10,19,20,37</sup>, e o perfil de Exatidão dos resultados obtidos no modelo 4PL nas diferentes concentrações estudadas foi construído como descrito por Rozet et al.<sup>17</sup>. Para interpretar a adequação do perfil de exatidão obtido, foram empregados os Índices de Conveniência Globais, em que o Índice de Exatidão foi calculado utilizando o Índice de Intervalo, o Índice de Veracidade e o Índice de Precisão obtidos como descrito em Rozet et al.<sup>17</sup>, para tanto, uma planilha do Microsoft Excel® foi elaborada e validada frente aos dados do referido artigo.

Foram também comparados, através do Índice de Exatidão, os perfis de Exatidão obtidos quando os resultados foram calculados utilizando as concentrações 1,25; 1,82 e 5,0 µg.mL<sup>-1</sup> do padrão na construção da curva de calibração.

### **Intervalo, Limite Inferior de Quantificação e Limite de Detecção**

O Intervalo de um bioensaio é definido como as concentrações ou potências para as quais tenha sido demonstrado que o método analítico tenha níveis satisfatórios de Veracidade e Precisão Intermediária, e o Limite Inferior de Quantificação será a menor concentração ou potência em que essas condições forem atendidas.

O Limite Inferior de Detecção foi considerado como sendo três desvios padrões acima da média do branco (controle de *background*), como recomendado em WHO<sup>38</sup>.

### **Veracidade**

A Veracidade do método, expressa pelo Erro Relativo % (ER%), foi determinada como descrito por Rozet et al.<sup>17</sup>, utilizando-se a equação 1.

$$ER\% = 100 \cdot \left( \frac{\mu - \mu_T}{\mu_T} \right)$$

Onde:

ER% = Erro Relativo percentual

μ = média dos resultados obtidos

μ<sub>T</sub> = concentração nominal

### **Precisão**

A partir das concentrações estimadas, utilizando as fórmulas clássicas dos quadrados mínimos em uma ANOVA, como descrito por Rozet et al.<sup>17</sup>, foram calculadas a variância da Repetibilidade  $\sigma_i^2$ , utilizando os resultados das diferentes replicatas em cada ensaio, da Precisão entre-ensaios  $\sigma_\beta^2$ , utilizando os resultados obtidos nas diferentes corridas de ensaios, e da Precisão Intermediária, pela soma das variâncias intra e entre-ensaios ( $\sigma_{\mu}^2 = \sigma_i^2 + \sigma_\beta^2$ ), que permitiram avaliar a precisão do método pela determinação da Repetibilidade, da Precisão entre-ensaios e da Precisão Intermediária, expressas como Coeficiente de Variação percentual (CV%) obtidos através da divisão dos desvios padrões calculados pela concentração nominal  $\sqrt{\sigma^2/\mu_T}$  nos oito níveis de concentrações, como anteriormente descrito<sup>8,10,17</sup>.

### **Exatidão**

Na abordagem do Conceito do Erro Total, segundo Rozet et al.<sup>17</sup>, foi construído um Intervalo de conteúdo-β (Limite Inferior – LI, Limite Superior – LS) de 95%, com nível de confiança γ de 95%. O intervalo (LI, LS), que é calculado utilizando o ER% e a precisão intermediária e demonstra a exatidão do método, foi comparado com os limites de aceitação adotados de ± 20% (A, B). Quando o intervalo (LI, LS) se apresentou completamente entre os limites de aceitação (A, B), o método foi aceito como exato; quando não, o método não foi aceito. A Exatidão foi então demonstrada pelos Perfis de Exatidão construídos que foram avaliados pelo Índice de Exatidão.

### **Comparação de diferentes concentrações do padrão de calibração**

Foram ainda comparados os perfis de Exatidão obtidos quando diferentes concentrações foram utilizadas para gerar a curva de calibração, visando testar a eficiência da concentração definida na Farmacopeia Brasileira<sup>30</sup> (1,0 µg.mL<sup>-1</sup>) no cálculo de resultados do ensaio, frente a concentrações mais próximas à concentração alvo (5,0 µg.mL<sup>-1</sup>). Estes perfis também foram analisados pelos Índices Globais de Conveniência.

### **Índice de Exatidão**

Derringer e Suich<sup>27</sup> e Derringer<sup>28</sup> elaboraram os índices globais de conveniência (IGC) baseados nos critérios mais importantes de validação, que variam de 0 a 1, para aumentar a objetividade da tomada de decisão, permitindo demonstrar a qualidade geral do

método sendo validado sob o Intervalo estudado. Para tanto, foi necessário atribuir um IGC ao Intervalo de doses ( $I_D$ ), à veracidade ( $I_V$ ) e à precisão ( $I_P$ ), os cálculos foram realizados segundo Rozet et al.<sup>17</sup>. Finalmente, para estimar a qualidade geral do método, foi calculado um Índice denominado Índice de Exatidão ( $I_E$ ), que é definido como a combinação dos critérios anteriores através da obtenção da média geométrica dos três Índices.

### Critérios de aceitação da Exatidão

Para que um método de imunoensaio seja aceito, é recomendado que a precisão intermediária (CV%) e a Veracidade (ER%) sejam ambas  $\leq 20\%$  (25% no LIQ)<sup>39</sup>.

Foram computados para cada concentração estudada os intervalos de tolerância de expectativa  $\beta$  (IT- $\beta$ ) ajustados para 95%, que foram comparados aos limites de aceitação  $\pm 20\%$  ( $\lambda$ ). Os resultados obtidos no modelo 4PL foram plotados em gráficos para construir o Perfil de Exatidão. Assim, o IT- $\beta$  é o intervalo em que é esperado que uma proporção de 95% dos futuros resultados esteja dentro. Portanto, os IT- $\beta$  que estiverem dentro os limites de aceitação apresentam as condições para um método ser considerado válido<sup>16</sup>.

### Cálculo da Incerteza

Foi realizada uma avaliação do Tipo A, utilizando o CV% intraensaios, como descrito em Health Protection Agency<sup>40</sup>. Foram calculadas a Incerteza Padrão Combinada (uc) e a Incerteza Expandida (U)

para o ensaio. A Incerteza Expandida provê um intervalo que, acredita-se, deve incluir o valor do mensurando com um alto nível de confiança sendo obtida através da multiplicação da uc pelo fator de abrangência (k). Foi utilizado  $k = 2$ , provendo aproximadamente 95% de nível de confiança para uma distribuição normal.

## RESULTADOS

Os resultados obtidos no estudo utilizando o modelo 4PL por replicata, por dia e por concentração. Utilizando o padrão na concentração de  $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para construção da curva de calibração, podem ser observados na tabela 1-A, para o intervalo de concentrações de 1,25 a  $10,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (Intervalo de Estudo), e na tabela 1-B, para o intervalo de concentrações de 0,0156 a  $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (Intervalo de Controle). Os resultados de cada grupo foram submetidos ao teste de Grubbs<sup>36</sup> para verificar sua homogeneidade. Houve apenas um valor aberrante que foi substituído pelo valor da replicata para permitir a realização dos cálculos.

Esses resultados foram utilizados no pré-estudo de validação do ensaio para os cálculos dos parâmetros estudados.

### Perfil de Exatidão, Intervalo, Limite Inferior de Quantificação e Limite de Detecção

A Tabela 2 apresenta os resultados dos parâmetros determinados para a construção do Perfil de Exatidão

**Tabela 1.** Resultados calculados utilizando a curva logística de quatro parâmetros para cada concentração, por replicata e por corrida de ensaio no Intervalo de Estudo, abrangendo as concentrações de 1,25 a  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (A) e do Intervalo Controle, abrangendo as concentrações de 0,0156 a  $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (B)

A										
CI ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	1,25		1,82		5,00		6,86		10,00	
Replicatas	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2
Ensaio 1	1,312	1,294	1,692	1,771	4,645	4,792	6,786	6,589	9,840	9,287
Ensaio 2	1,254	1,309	1,854	1,856	5,226	5,017	7,200	6,856	10,070	10,517
Ensaio 3	1,222	1,236	1,676	1,744	4,806	4,686	6,623	6,202	10,316	10,686
Ensaio 4	1,160	1,156	1,559	1,716	4,372	4,491	6,282	5,479*	9,085	8,970
Ensaio 5	1,194	1,182	1,748	1,787	4,854	5,024	6,711	6,108	9,578	10,053

B									
CI ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	0,0156			0,0625			0,25		
Replicatas	n1	n2	n3	n1	n2	n3	n1	n2	n3
Ensaio 1	0,022	0,021	0,020	0,071	0,075	0,071	0,255	0,273	0,277
Ensaio 2	0,022	0,021	0,022	0,072	0,084	0,090	0,346	0,335	0,299
Ensaio 3	0,027	0,026	0,030	0,098	0,088	0,061	0,337	0,303	0,458
Ensaio 4	0,024	0,024	0,024	0,086	0,089	0,088	0,283	0,290	0,284

CI = concentração introduzida; \*: Valor identificado como aberrante

**Tabela 2.** Resultados obtidos para construção do Perfil de Exatidão do ensaio de determinação do teor de Ovoalbumina

Parâmetro	Concentração introduzida ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )							
	0,0156	0,0625	0,25	1,25	1,82	5,00	6,86	10,00
Média calculada	0,0236	0,0812	0,3116	1,2319	1,7403	4,7913	6,5639	9,8402
Tendência*	51,16	29,90	24,65	-1,45	-4,38	-4,17	-4,32	-1,60
LST (%)	97,38	70,30	79,08	9,54	7,29	7,89	7,77	12,48
LIT (%)	4,95	-10,49	-29,79	-12,44	-16,04	-16,24	-16,40	-15,67
LST ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	0,031	0,106	0,45	1,37	1,95	5,39	7,39	11,25
LIT ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	0,015	0,056	0,18	1,09	1,53	4,19	5,73	8,43
CV (%) PI	20,25	17,39	22,42	5,00	4,98	5,41	5,14	6,24
Aceitação	$\pm 20\%$							

LIT = Limite inferior de tolerância; LST = Limite superior de tolerância; \*: Erro Relativo; CV = Coeficiente de variação; PI = Precisão intermediária.

do EDTO quando os resultados foram calculados com o modelo 4PL. Os limites de Tolerância de Expectativa  $\beta$  foram calculados para 95% de conteúdo e os limites de aceitação  $\pm \lambda$  foram definidos como  $\pm 20\%$ , como preconizado por De Silva et al.<sup>39</sup> para ensaios de ligação.

A Figura 1 (a) e (b) apresenta os Perfis de Exatidão construídos com esses dados. Na Figura 1a, foram incluídas as concentrações do Intervalo de Estudo em que a Exatidão foi conforme (1,25; 1,82; 5,0; 6,86 e 10,00  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e, para permitir uma comparação, a primeira concentração do Intervalo de Controle em que não foi mais possível quantificar a Ovoalbumina com Veracidade e Precisão (0,25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Na Figura 1b, foram inseridas as concentrações do Intervalo Controle em que não foi mais possível a detecção com Exatidão (0,0156 a 0,25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Da mesma forma, para permitir uma comparação, foi incluída a primeira concentração do Intervalo de Estudo que apresentou Exatidão conforme (1,25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

O Intervalo de Quantificação foi determinado como sendo [1,25 a 10,00  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ] e o Limite Inferior de Quantificação foi a concentração 1,25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . O Limite de Detecção, determinado como a média do branco mais três vezes seu desvio padrão, indicou a concentração aproximada de 0,002  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

### Função de Resposta

Ao ser avaliada a Função de Resposta, através da curva de calibração, determinada para o padrão de calibração, nos nove ensaios realizados com os resultados obtidos no modelo 4PL das concentrações em função das respostas obtidas (absorbância medida em DOs), foi conforme em todas as curvas obtidas, o que pode ser avaliado pelo coeficiente de determinação  $r^2$  maior que

0,99 em oito das nove curvas (dados não apresentados). As nove curvas foram capazes de adequadamente descrever a relação concentração-resposta, como recomendado em FDA<sup>1</sup>. Com a mesma finalidade, foi calculado o coeficiente de determinação entre a média das densidades óticas (Y) em função da concentração (X) em cada grupo de concentração do Intervalo de Estudo e o resultado obtido para  $r^2 = 0,9892$  ( $p = 0,0005$ ), que também descreve satisfatoriamente a relação concentração-resposta.

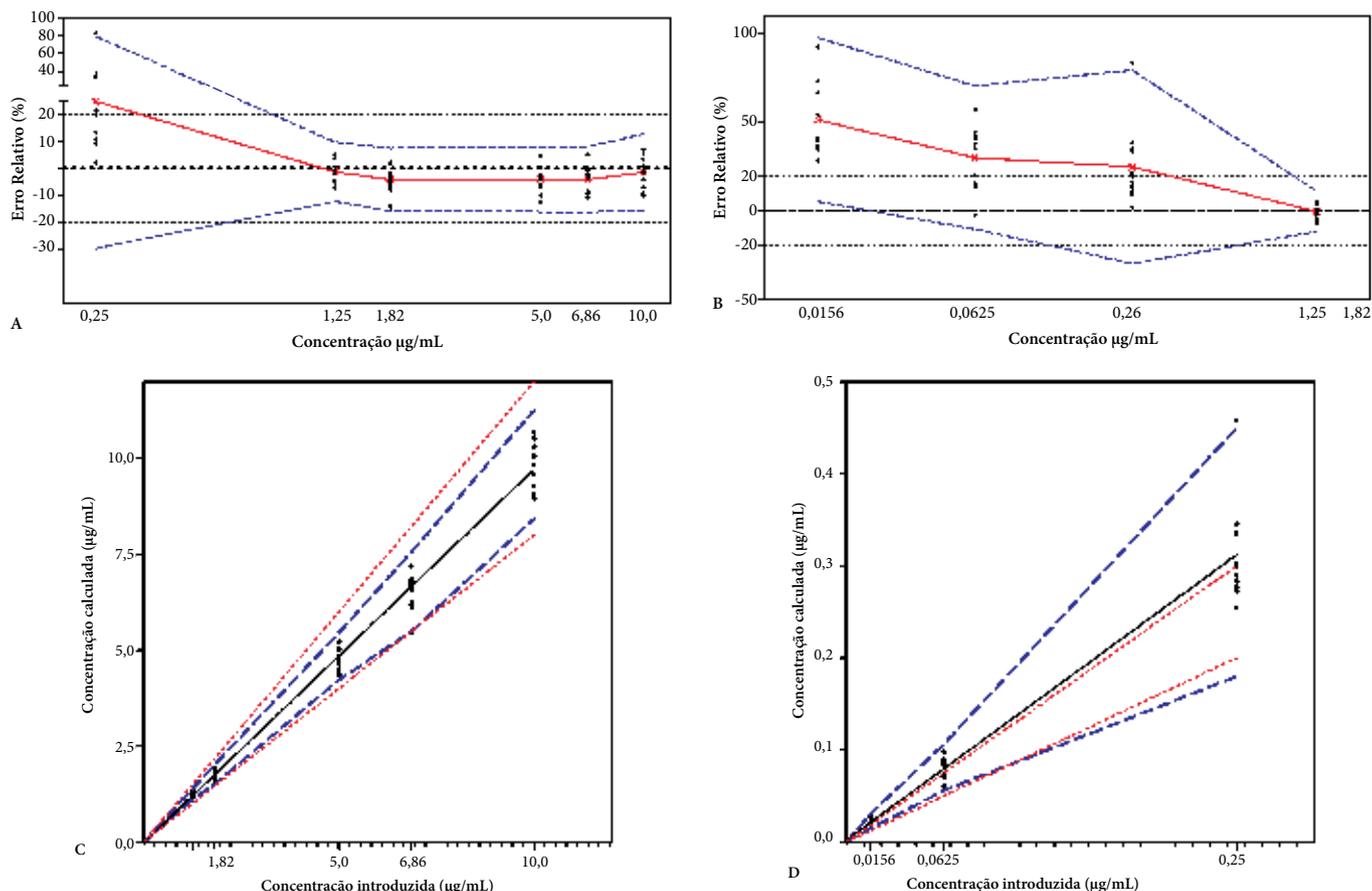
### Linearidade

A Linearidade de um método analítico é sua capacidade, dentro de um intervalo definido, de obter resultados diretamente proporcionais às concentrações de analito na amostra<sup>16</sup>. Para tanto, um modelo linear foi ajustado para todas as concentrações calculadas com o modelo 4PL para os padrões de validação (1,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) de todas as séries como uma função da concentração introduzida no Intervalo de Estudo. A equação da regressão foi  $y = -0,008493.x + 0,9732$  e  $r^2$  foi 0,9916.

Também visando avaliar a Linearidade do método, o intervalo de tolerância de Expectativa- $\beta$  absoluto foi aplicado. A Figura 1 (c) e (d) apresenta os perfis de linearidade obtidos no estudo, separando o Intervalo em que o método apresentou linearidade conforme, que compreende as concentrações do Intervalo de Estudo (1c), de 1,25 a 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , daquelas do Intervalo Controle (1d), de 0,00156 a 0,25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , em que não foi possível demonstrar resposta linear.

### Índices Globais de Conveniência

Os resultados obtidos para os Índices Globais de Conveniência, quando foi incluída a primeira concentração do intervalo controle (0,25 a 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ),



**Figura 1.** Perfil de Exatidão obtido contra o padrão na concentração  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para a determinação do teor residual de ovalbumina, usando a curva logística de 4 parâmetros no intervalo de doses de  $0,25$  a  $10,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (A) e de  $0,0156$  a  $1,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (B). Visando permitir a comparação, foram incluídas a primeira concentração fora da faixa no gráfico A ( $0,25 \mu\text{g}$ ) e a primeira concentração dentro da faixa no gráfico B ( $1,25 \mu\text{g}$ ). A linha contínua apresenta o Erro Relativo %, as linhas pontilhadas os limites de aceitação  $\pm 20\%$  e as linhas tracejadas são os Limites Inferior e Superior relativos de 95% de Expectativa de Tolerância  $\beta$ . Os pontos são os erros relativos % por replicatas dos padrões de validação. Quando os intervalos de tolerância estão incluídos nos limites de aceitação ( $\pm 20\%$ ), o ensaio é capaz de quantificar com Exatidão, de outra forma não. Perfis de Linearidade obtidos nos intervalos de doses de  $1,25$  a  $10,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (C) e de  $0,00156$  a  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (D). A linha contínua representa a linha de identidade ( $x = y$ ), as linhas pontilhadas os limites de aceitação absolutos calculados  $\pm 20\%$  e as linhas tracejadas são os Limites Inferior e Superior de 95% de expectativa de tolerância  $\beta$  em valores absolutos conectados. Os pontos são os resultados individuais por replicatas dos padrões de validação. Quando os intervalos de tolerância estão incluídos nos limites de aceitação ( $\pm 20\%$ ), o ensaio é capaz de quantificar com Linearidade satisfatória, de outra forma não.

foram: Índice de Intervalo = 0,90; Índice de Veracidade = 0,80; Índice de Precisão = 0,37; o Índice de Exatidão, que é um resumo dos três anteriores, foi = 0,62. Quando foi avaliado apenas o intervalo de Estudo ( $1,25$  a  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) foram obtidos: Índice de Intervalo = 1,00; Índice de Veracidade = 0,99; Índice de Precisão = 0,37 e o Índice de Exatidão foi = 0,70.

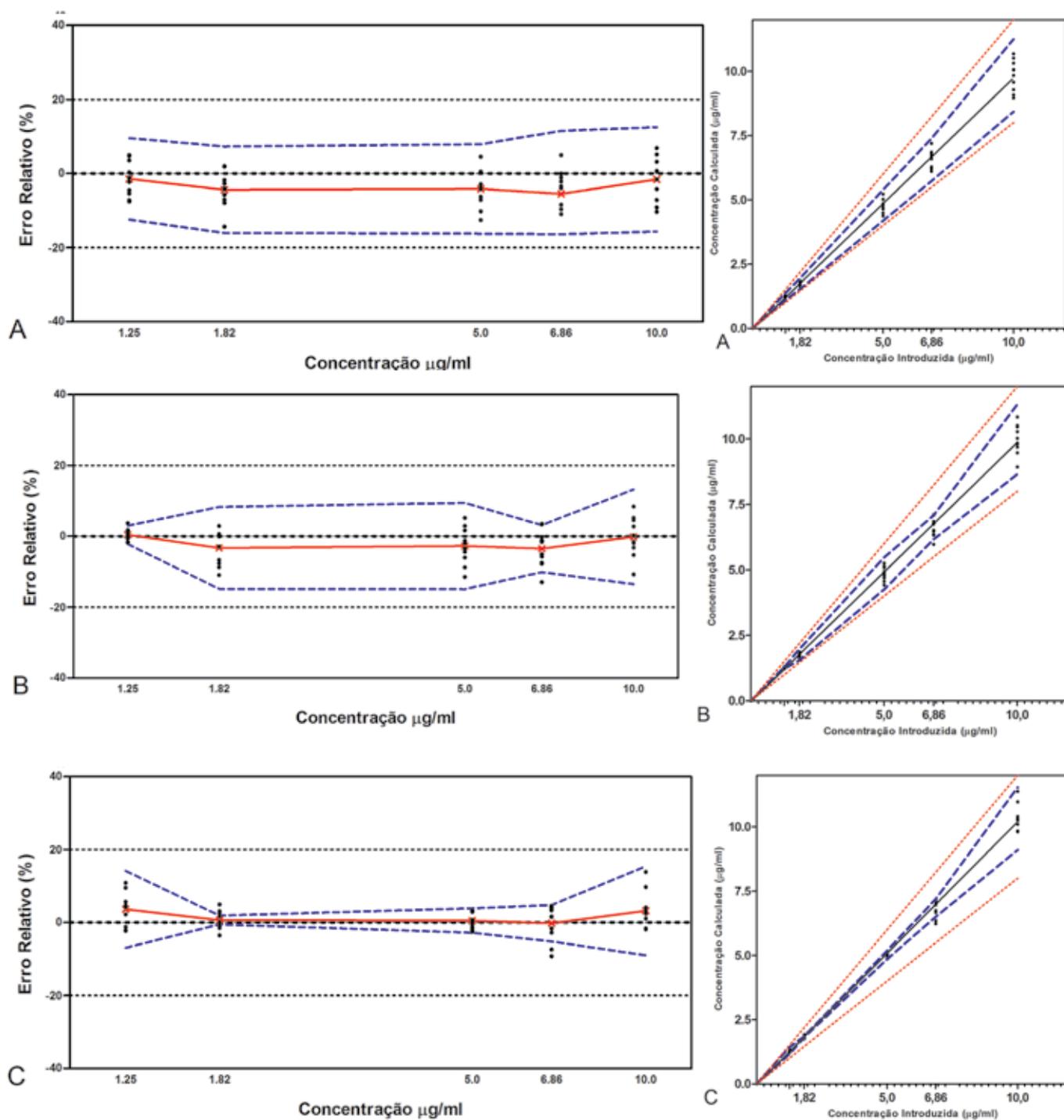
#### Determinação da Incerteza de Teste

Foram calculadas as Incertezas Padrões Combinadas ( $uc$ ) e as Incertezas Expandidas ( $U$ ), para cada diferente nível de concentração do Intervalo de Estudo, como descrito em Health Protection Agency<sup>40</sup>.

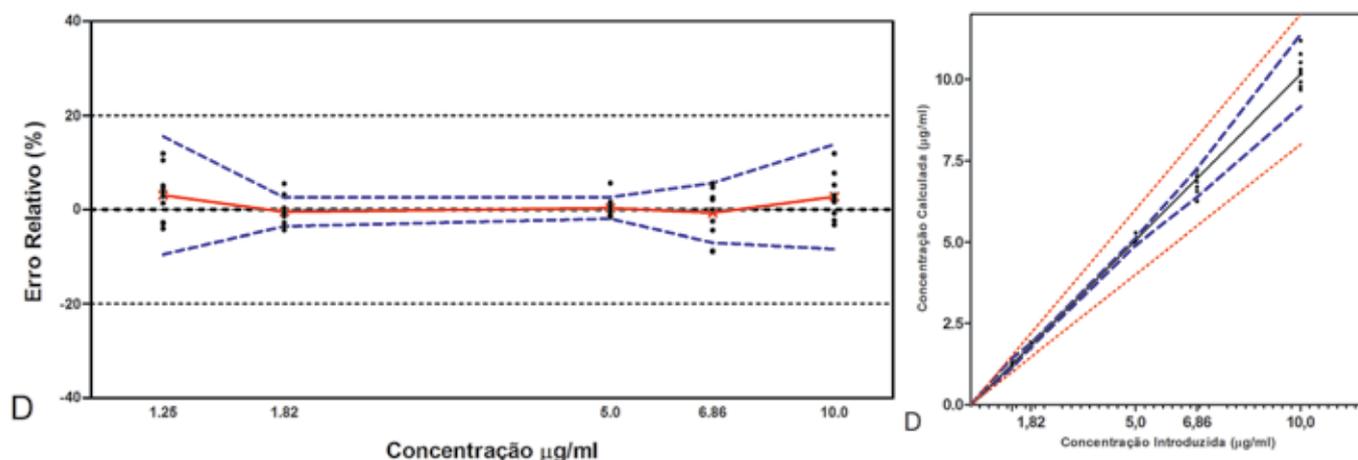
Os valores de incertezas obtidos no Intervalo de Estudo foram os seguintes, por cada concentração:  $1,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $uc = 0,0837$ ;  $U = \pm 16,75$ );  $1,82 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $uc = 0,0659$ ;  $U = \pm 13,17$ );  $5,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $uc = 0,0146$ ;  $U = \pm 2,92$ );  $6,82 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $uc = 0,0298$ ;  $U = \pm 5,97$ ) e  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $uc = 0,0130$ ;  $U = \pm 2,62$ ).

#### Comparação de diferentes concentrações de padrão de calibração

A Figura 2 mostra os perfis de Exatidão obtidos quando diferentes concentrações de padrão foram utilizadas na elaboração da curva de calibração das corridas de ensaio. Os resultados obtidos com a



(continua)



**Figura 2.** Perfis de Exatidão e de Linearidade obtidos para a Determinação do Teor Residual de Ovalbumina usando o modelo de 4 parâmetros no intervalo de doses de 1,25 a 10,0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , utilizando diferentes concentrações do padrão como padrão de calibração. Em (A) = 1,0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; em (B) = 1,25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; em (C) = 1,82  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e em (D) = 5,0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Nos gráficos dos perfis de Exatidão, a linha contínua apresenta o Erro Relativo %, as linhas pontilhadas os limites de aceitação  $\pm 20\%$  e as linhas tracejadas são os Limites Inferior e Superior relativos de 95% de Expectativa de Tolerância  $\beta$ . Os pontos são os erros relativos % por replicatas dos padrões de validação. Nos gráficos dos perfis de Linearidade, a linha contínua representa a linha de identidade ( $x = y$ ), as linhas pontilhadas os limites de aceitação absolutos calculados  $\pm 20\%$  e as linhas tracejadas são os Limites Inferior e Superior de 95% de expectativa de tolerância  $\beta$  em valores absolutos conectados. Os pontos são os resultados individuais por replicatas dos padrões de validação. Quando os intervalos de tolerância estão incluídos nos limites de aceitação ( $\pm 20\%$ ), o ensaio é capaz de quantificar com Exatidão e/ou Linearidade satisfatória, de outra forma não.

concentração recomendada na Farmacopeia Brasileira<sup>28</sup>, 1,0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  em 2(A), foram comparados com os resultados obtidos utilizando as concentrações 1,25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  em 2(B); 1,82  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  em 2(C) e 5,0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  em 2(D). Os perfis obtidos foram então analisados pelos Índices Globais de Conveniência, que podem ser observados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Índices Globais de Conveniência para interpretação do Perfil de Exatidão: O Índice de Exatidão é um resumo dos três primeiros índices, quantificando a qualidade geral do método sendo validado sobre o Intervalo de Estudo

Índice	Concentração do padrão ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )			
	1,00	1,25	1,82	5,00
$I_v$	0,970	0,985	0,988	0,991
$I_i$	1,000	1,000	1,000	1,000
$I_p$	0,384	0,481	0,741	0,725
$I_e$	0,720	0,780	0,901	0,896

$I_v$  = Índice de Veracidade;  $I_i$  = Índice de Intervalo;  $I_p$  = Índice de Precisão;  $I_e$  = Índice de Exatidão.

## DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a utilização do Conceito do Erro Total como ferramenta em validações de bioensaios. Para tanto, foi conduzido um pré-estudo de validação do ELISA para Detecção

do Teor de Ovalbumina residual (EDTO) em vacinas contra febre amarela. Segundo o ICH<sup>6</sup>, o ensaio é classificado como um ensaio do tipo II, ou seja, um teste quantitativo para determinação de impurezas, sendo preconizadas para esse tipo de ensaio as determinações de Especificidade, Linearidade, Intervalo, Precisão, Limite de Quantificação, Exatidão e Robustez (recomendada apenas durante o desenvolvimento de novos ensaios<sup>4</sup>).

No entanto, alguns desses parâmetros geram dúvidas em sua interpretação, devido à forma como são descritos nas publicações oficiais e guias dos principais organismos internacionais (ICH, ISO, FDA, EURACHEM, VIM etc.).

Buscamos revisões apresentadas em artigos recentes que analisam criticamente as definições e fazem sugestões de como abordá-las corretamente em estudos de validações. Sendo assim, adotamos a abordagem de validação do Conceito do Erro Total para construir o perfil de Exatidão do EDTO, como sugerido pela comissão da SFSTP<sup>10,18,19,37</sup>. Para essa finalidade, foram determinados o Intervalo, Limite Inferior de Detecção, a Veracidade, a Linearidade e a Exatidão do método.

Com a experiência adquirida no Laboratório de Vacinas Virais do INCQS na utilização do Conceito do Erro Total em recente validação<sup>25</sup>, aplicamos também

esse conceito na validação do EDTO. A natureza desse ensaio permitiu a construção do Perfil de Exatidão, estudando um intervalo que abrangeu de 33 a 167% da concentração alvo ( $5,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), como recomendado em USP<sup>35</sup>. O perfil foi construído com as Concentrações de Estudo, de 25% ( $1,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) a 200% ( $10,00 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), com doses proporcionalmente espaçadas na escala logarítmica e um Intervalo Controle, deliberadamente fora do Intervalo recomendado em USP<sup>35</sup>, avaliando as concentrações de 0,31% ( $0,00156 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) a 5% ( $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), visando à depleção completa da resposta com a finalidade de avaliar a sensibilidade da abordagem do Perfil de Exatidão.

Os resultados absolutos (concentração) de cada replicata, para cada concentração, de ambos intervalos de concentrações incluídos no pré-estudo de validação ( $0,0156$  a  $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $1,25$  a  $10,00 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), foram considerados homogêneos quando avaliados pelo teste de Grubbs<sup>36</sup>, ocorrendo apenas um valor aberrante, uma vez que foi adotado um modelo de análise balanceado que requer números constantes de replicatas e corridas de ensaios para todas as concentrações, o valor da replicata válida foi repetido para fins de cálculos. Esses resultados puderam então ser utilizados nos cálculos dos parâmetros avaliados.

Diferenciar claramente a Função de Resposta de Linearidade permite aplicar o conceito de Linearidade não apenas aos valores relativos, mas também aos valores absolutos do método, como para titulações em que os resultados não são obtidos por cálculo em retorno dos resultados a partir de uma curva de calibração. Tentativas de prover uma Resposta de Função são, entretanto, sem uso e impraticáveis se não houver um sinal ou resposta; no entanto, a linearidade dos resultados poderá ser avaliada<sup>16</sup>.

Rozet et al.<sup>17</sup>, ao avaliarem a Função de Resposta, consideraram satisfatórios nesse item ensaios imunoenzimáticos que apresentaram coeficientes de determinação muito próximos ao obtido em nosso estudo. O coeficiente de determinação ( $r^2$ ) obtido em nosso estudo, na avaliação da Função de Resposta, descreveu satisfatoriamente a relação concentração-resposta, indicando que aproximadamente 98,9% da variabilidade eram compartilhados por x e y.

Os perfis de Linearidade, elaborados utilizando o conceito do Erro Total, utilizaram os valores absolutos obtidos nos ensaios, inseridos em gráficos com os limites de aceitação absolutos de  $\pm 20\%$  calculados para cada concentração para o Intervalo de Estudo e para o

Intervalo Controle separadamente e os IT $\beta$  absolutos que foram conectados, de modo semelhante ao empregado na avaliação de Exatidão (que utiliza os valores relativos). A linearidade foi considerada conforme apenas quando os intervalos foram incluídos nos limites de aceitação, indicando que o método pôde quantificar com exatidão, o que se restringiu a todas as cinco concentrações do Intervalo de Estudo (25 a 200%), estando de acordo com o intervalo preconizado em USP<sup>32</sup> para quantificação (33 a 167%). No Intervalo Controle, o método não conseguiu detectar as concentrações de forma Linear, como era esperado, isto comprova a sensibilidade da aplicação do conceito do Erro Total na validação de métodos analíticos.

A precisão do método foi conforme no Intervalo de Estudo de  $1,25$  a  $10,00 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (25 a 200%), com um CV% máximo de 6,65%, variando de 5,25 a 6,65% para a precisão Intermediária. No intervalo de Controle, a precisão do método foi sensivelmente menor, atingindo dois dígitos nas três concentrações estudadas, sendo 22,42% a máxima, variando de 17,39 a 22,42%. Da mesma forma, a Veracidade foi conforme apenas no Intervalo de Estudo, sendo a Tendência (ER%) máxima obtida -4,91%, variando de -0,45 a -4,91%. No Intervalo Controle, as Tendências encontradas foram mais elevadas, sendo a máxima 51,16%, variando de 24,65 a 51,16%.

Os métodos clássicos de validação e de controle da qualidade avaliam a magnitude dos componentes tendência e precisão separadamente (Teste-t e Qui-quadrado em validação ou gráficos de controle na rotina), mas essa abordagem é inconveniente, pois valores muito pequenos de um dos componentes não compensam a falha do outro componente<sup>2</sup>. Em nosso estudo, isto pode ser comprovado no Intervalo Controle, pois, se fossem aplicados apenas os limites de aceitação de 25% no LIQ como preconizado para imunoenaios do tipo ELISA<sup>39</sup>, a concentração  $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$  teria sido aceita como conforme, pois apresentou Tendência (ER%) = 24,65% e Precisão Intermediária = 22,42%, no entanto os Perfis de Linearidade e de Exatidão demonstraram que somente a análise conjunta da Tendência (Veracidade) e Precisão foi capaz de identificar a inadequação dessas concentrações em apresentar resultados confiáveis.

O uso de intervalos de confiança e/ou Erro Total em validação de métodos tem sido discutido ou proposto na literatura<sup>10,16-20</sup>. O uso do Erro Total é uma abordagem estatística e cientificamente fundamentada que incorpora tanto os erros sistemáticos quanto aleatórios. O conceito

do Erro Total reflete quão grande o erro de medida pode ser e é facilmente entendido por analistas. Além disso, é uma medida única e abrangente do desempenho do método, ao invés de uma avaliação da Tendência e da variabilidade do método separadamente.

Na maioria das vezes, um procedimento analítico visa quantificar sobre um intervalo de quantidades ou concentrações. Consequentemente, durante a fase de validação, as amostras são preparadas para cobrir de forma adequada esse intervalo, e um intervalo de tolerância de expectativa- $\beta$  (IT $\beta$ ) é calculado em cada nível. Entretanto, quando analisarmos amostras, apenas o Erro Total de sua medição pode ser levado em conta, nessa amostra. É impossível separar os Erros Sistemático e Aleatório. Uma vantagem dessa abordagem é que reflete mais diretamente o comportamento de ensaios individuais e irá resultar em menor rejeição de corridas na rotina do que procedimentos que comparam pontos de estimativa da Tendência e Precisão observadas<sup>16</sup>.

O Limite Inferior de Quantificação foi 1,25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , os IT $\beta$  de 95% garantem com um erro de 5% que quando este método analítico for usado para medir uma amostra que contenha ovoalbumina nessa concentração, 95 vezes em 100 o resultado obtido estará entre 1,10 e 1,39  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de ovoalbumina.

A Exatidão do método pôde ser demonstrada com a utilização dos perfis de Exatidão em todo Intervalo de Estudo, o que foi quantificado usando os índices descritos por Rozet et al.<sup>17</sup>, sendo o principal o Índice de Exatidão ( $I_E$ ) que é um índice global de conveniência do desempenho do método e depende do Índice de Intervalo de Dose, Índice de Veracidade e Índice de Precisão. No presente estudo, para testar a sensibilidade dos Índices, incluímos os resultados da concentração 0,25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  aos cálculos do Intervalo de Estudo, obtendo assim  $I_E = 0,62$ . O  $I_E$  obtido para o Intervalo de Estudo foi 0,70; ligeiramente superior ao relatado por Gaudin e Laurentie<sup>26</sup>, de 0,64, ao empregar esses índices na validação de um kit de ELISA para detecção de Nicarbazina residual em ovos.

Tais índices permitem quantificar o desempenho dos testes e são muito úteis quando comparações, por exemplo, de modelos de curvas de calibrações são realizadas em diferentes Perfis de Exatidão.

A curva de calibração, realizada seguindo as recomendações da Farmacopeia Brasileira<sup>30</sup> na concentração de 1,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , não foi incluída no Perfil de Exatidão por não ter sido possível, por limitações de espaço das microplacas, correr essa concentração em

duplicatas, o que impediu sua comparação com as demais concentrações devido ao modelo estatístico empregado, que necessita calcular a variância intraensaios. Embora não tenham sido possíveis tais comparações, essa concentração situa-se em uma zona de risco, entre a última concentração que apresentou resultados válidos (1,25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e a primeira fora do intervalo de quantificação (0,25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

Com a finalidade de comparar o desempenho do método utilizando diferentes concentrações do padrão na elaboração da curva de calibração, os resultados foram recalculados utilizando as concentrações 1,25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 1,82  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  como padrão de calibração. Os resultados obtidos foram utilizados para elaborar os perfis de Exatidão, que foram comparados com o obtido com a concentração de 1,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Os perfis foram avaliados ainda com os Índices Globais de Conveniência. Foi observado que a concentração que rendeu resultados mais exatos foi 1,82  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , como notado nos perfis e confirmado pelo Índice de Exatidão de 0,901 obtido com essa concentração, superior aos obtidos pelas demais concentrações. O menor índice foi o obtido pela concentração recomendada de 1,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Dessa forma, nossos resultados indicam que se a concentração 1,82  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  for utilizada em lugar de 1,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  haverá melhoria na Exatidão do método, o que deve ser confirmado na fase de validação em uso do ensaio.

## CONCLUSÃO

A proposta desta pesquisa foi avaliar a utilização de abordagens alternativas para validação de um método de bioensaio quantitativo do tipo imunoenzimático, aplicando o conceito do Erro Total, o Perfil de Exatidão e os Índices de Exatidão, como descrito pela SFSTP, com a finalidade de avaliar a capacidade de essas abordagens demonstrarem a adequação do método à sua finalidade de uso. Essa abordagem permite o controle do risco de aceitar-se um método impróprio enquanto prevê garantias de que os resultados das medições que serão obtidos durante o uso futuro do método validado estarão incluídos dentro limites de aceitação fixados de acordo com os requisitos.

Para tanto foi desenvolvido o pré-estudo de validação do EDTO que demonstrou que o ensaio apresenta Exatidão, Função de Resposta, Linearidade, Repetibilidade, Precisão Intermediária e Veracidade conformes e é um método confiável para avaliar o teor

de ovoalbumina no Intervalo de concentrações de 1,25 a 10,0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . O que nos permitiu concluir que a abordagem de validação do Conceito do Erro Total descrita pela SFSTP é uma ferramenta eficiente para validação de bioensaios, sendo capaz de discriminar o Intervalo de concentrações em que o ensaio validado quantificou a ovoalbumina com Exatidão (Intervalo de Estudo) do Intervalo fora do limite de quantificação, em que o ensaio apresentou Exatidão e Linearidades não conformes (Intervalo Controle).

Concluimos também que os critérios de aceitação da SFSTP para o conceito do Erro Total e dos Perfis de Exatidão para validação de métodos apresentam vantagens sobre critérios baseados na estimação de pontos para avaliar a exatidão e precisão, o que foi evidenciado ao se avaliar os resultados obtidos na concentração 0,25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  do Intervalo Controle, que teria sido aceita como conforme na avaliação isolada da Veracidade e da Precisão, mas não o foi na abordagem alternativa.

Os resultados obtidos indicam ainda que a utilização da concentração 1,82  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para elaborar a curva de calibração do ensaio garantirá uma melhor Exatidão na detecção de resíduos de ovoalbumina no EDTO, o que, no entanto, deve ser confirmado na fase de validação em uso do ensaio.

#### AGRADECIMENTOS

À Direção e à Coordenação de Pós-Graduação do INCQS/FIOCRUZ pelo apoio na realização deste trabalho que foi produzido como monografia de conclusão do Curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária; aos colegas do Departamento de Imunologia que contribuíram na realização deste trabalho; à Biomanguinhos/FIOCRUZ pelo fornecimento dos insumos para realização dos ensaios.

#### REFERÊNCIAS

1. US Department of Health and Human Services. US Food and Drug Administration – FDA. Center for Biologics Evaluation and Research – CBER. Guidance for industry: bioanalytical method validation. Rockville; 2001.
2. Gibelin N, Dupont D, Imbert S, Rozet E. Use of Total Error concept in the validation of viral activity in cell cultures. *J Chromatogr B*. 2009;877:2407-11.
3. ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR ISO/IEC 17025:2005: Requisitos gerais para competência técnica de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro; 2005.
4. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília (DF); 2 jun 2003.
5. Boulanger B, Dewé W, Gilbert A, Govaerts B, Maumy M. Risk management for analytical methods based on the total error concept: Conciliating the objectives of the pre-study and in-study validation phases. *Chem Intell Lab Sys*. 2007;86:198-207.
6. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use, Topic Q2 (R1): Validation of analytical procedures: text and methodology. Geneva; 2005.
7. ISO. International Organization for Standardization. ISO 3534-2. Statistics – Vocabulary and symbols – Part 2: Applied statistics. 2. ed. Geneva: International Organization for Standardization; 2006.
8. ISO. International Organization for Standardization. ISO 5725. Application of the Statistics – Accuracy (Trueness and Precision) of the Results and Methods of Measurement – Part 1: General principles and definitions. Geneva: International Organization for Standardization; 1994.
9. Chapuzet E, Mercier N, Bervoas-Martin S, Boulanger B, Chevalier P, Chiap P, et al. Méthodes chromatographiques de dosage dans les milieux biologiques: Stratégie de validation Rapport d'une commission SFSTP. *STP Pharma Pratiques*. 1997;7:169-94.
10. Hubert Ph, Nguyen-huu JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal – Part I. *J Pharm Biomed Anal*. 2004;36:579-86.
11. Mee RW.  $\beta$ -Expectation and  $\beta$ -Content Tolerance Limits for Balanced One-Way ANOVA Random Model. *Technometrics*. 1984;26(3):251-4.
12. Feinberg M, Boulanger B, Dewé W, Hubert Ph. New advances in method validation and measurement uncertainty aimed at improving the quality of chemical data. *Anal Bioanal Chem*. 2004;380:502-14.
13. Hubert Ph, Nguyen-Huu JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, et al. Validation des procédures analytiques quantitatives. Harmonisation des démarches. *STP Pharm Prat*. 2003;13(3):101.
14. Hartmann C, Massart DL, McDowall RD. An analysis of the Washington Conference Report on bioanalytical method validation. *Pharm Biomed Anal*. 1994;12:1337.
15. Hartmann C, Smeyers-Verbeke J, Massart DL, McDowall RD. Validation of bioanalytical chromatographic methods. *J Pharm Biomed Anal*. 1998;17:193.
16. Rozet E, Ceccato A, Hubert C, Ziemons E, Oprean R, Rudaz S, et al. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. *J Chromatogr A*. 2007;1158:111-25.
17. Rozet E, Wascotte V, Lecouturier N, Prétat V, Dewé W, Boulanger B, et al. Improvement of the decision efficiency of the accuracy profile by means of a desirability function for analytical methods validation. Application to a diacetyl-monoxime colorimetric assay used for the determination of urea in transdermal iontophoretic extracts. *Anal Chim Acta*. 2007;591:239-47.
18. Hoffman D, Kringle R. A Total Error Approach for the Validation of Quantitative Analytical Methods. *Pharm Res*. 2007;24(6):1157-63.
19. Hubert Ph, Nguyen-Huu JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, et al. Harmonization of strategies for the validation of

- quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal – Part II. *J Pharm Biomed Anal*. 2007;45:70-8.
20. Hubert Ph, Nguyen-Huu JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal – Part III. *J Pharm Biomed Anal*. 2007;45:82-96.
  21. Rozet E, Ceccato A, Hubert C, Ziemons E, Oprean E, Rudaz S, et al. Using tolerance intervals in pre-study validation of analytical methods to predict in-study results: The fit-for-future-purpose concept. *J Chromatogr A*. 2007;1158:126-37.
  22. USA – US Department of Health and Human Services. US Food and Drug Administration (FDA). Process Analytical Technology (PAT) Initiative. Rockville; 2004.
  23. USA – US Department of Health and Human Services. US Food and Drug Administration (FDA). International Conference on Harmonization (ICH): Quality Risk Management (Q9). Fed. Regist. 2006;71:32105-6.
  24. Findlay JWA, Smith WC, Lee JW, Nordblom GD, Das I, DeSilva BS, et al. Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective. *J Pharm Biom Anal*. 2000;21:1249-73.
  25. Dos Santos JE, Nascimento MC, Dos Santos PA, Nogueira ACA, Moura WC. Aplicação do Conceito do Erro Total na validação do ensaio de potência da Vacina Oral contra a Poliomielite. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2011;70(4):613-21.
  26. Gaudin V, Laurentie M. Application of total error approach to assess the performance of a biological method (ELISA) to detect nicarbazin residues in eggs. *J Chromatogr B*. 2009;877:2358-62.
  27. Derringer GC, Suich R. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. *J Qual Tech*. 1980;12(4):214-9.
  28. Derringer GC. A balancing act: optimizing a product's properties. *Qual Progr*. 1994;51-8.
  29. EURACHEM. Citac Guide CG4: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. English edition. 3. ed. Praga; 2012.
  30. Brasil. Farmacopeia Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília (DF): Anvisa; 2010. v. 2. p. 1363-4.
  31. Miller KJ, Bowsher RR, Celniker A, Gibbons J, Gupta S, Lee JL, et al. Workshop on Bioanalytical Methods Validation for Macromolecules: Summary Report. *Pharm Res*. 2001;18(9):1373-83.
  32. Li-Chan ECY, Powrie WD, Nakai S. The chemistry of eggs and egg products. *In: Stadelman, WJ, Cotterill OJ, editors. Egg Science and Technology*. 4. ed. Haworth Press: New York; 1995. p.105-75.
  33. Alpha Diagnostic International. Mouse Anti-Ovalbumin Ig. ELISA Kit Cat. N° 600-100-OGG. For Semi-Quantitative Determination of Anti-Ovalbumin Total Ig (IgG+IgA+IgM) in Biological Fluids. Instruction Manual N° M-600-100-OGG.
  34. EDQM – Council of Europe. CombiStats v.4.0.
  35. USA – United States Pharmacopoeia. 1033: Biological Assay Validation. *In: USP 35 NF30*. Rockville (EUA); 2012;1 Suppl:5174-85.
  36. Grubbs F. Sample Criteria for Testing Outlying Observations. *Ann Math Stat*. 1969;27-58.
  37. Hubert Ph, Nguyen-Huu JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal – Part IV. Examples of application. *J Pharm Biomed Anal*. 2008;48:760-1.
  38. WHO. World Health Organization. WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements. Part 2: Validation. Chp. 15, Validation of analytical assays. Geneva: WHO; 1997. p. 65-73.
  39. De Silva B, Smith W, Weiner R, Kelley M, Smolec J, Lee B, et al. Recommendations for the Bioanalytical Method Validation of Ligand-binding Assays to Support Pharmacokinetic Assessments of Macromolecules. *Pharm Res*. 2003;20(11):1885-900.
  40. Health Protection Agency. Uncertainty of Measure in testing. National Standard Method QSOP 4 issue 5. País de Gales (UK); 2005.

# Associação multivariada entre alterações citológicas do colo uterino e comportamento de risco em mulheres profissionais do sexo

## Multivariate association between the cervix cytological abnormalities and the risk behavior female sex workers

RIALA6/1524

Daniela ETLINGER<sup>\*1</sup>, Neuza Kasumi SHIRATA<sup>1</sup>, Luciana Silva AGUIAR<sup>1</sup>, Luzia Setuko Umeda YAMAMOTO<sup>1</sup>, Sonia Maria Miranda PEREIRA<sup>1</sup>, Yuriko Ito SAKAI<sup>1</sup>, Camilo de Lelis FERES<sup>1</sup>, Rosemeire de Oliveira Lima RODRIGUES<sup>1</sup>, Patrícia Ramos VARANDA<sup>2</sup>, Tania Mara CARDOSO<sup>2</sup>, Sílvia D'Andretta IGLEZIAS<sup>1</sup>, Daniel GRANATO<sup>3</sup>, Camila Cardoso OLIVEIRA<sup>3</sup>, Celso di LORETO<sup>1</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Laboratório de Citologia Oncótica, Núcleo de Anatomia Patológica, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira César, São Paulo, SP, CEP: 01246-000. E-mail: dani\_etlinger@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Centro de Referência em Saúde Sexual e Reprodutiva (CRESSER), Sumaré, SP

<sup>3</sup>Núcleo de Análise e Tratamento de Dados, Centro de Materiais de Referência, Instituto Adolfo Lutz

Recebido: 24.01.2012 – Aceito para publicação: 27.11.2012

### RESUMO

Neste trabalho foram identificadas as associações multivariadas entre as alterações citológicas (AC) do colo uterino e o comportamento de risco das profissionais do sexo (PS) atendidas no Centro de Referência em Saúde Sexual e Reprodutiva (CRESSER) – Sumaré, SP. Das 90 PS participantes, foram coletados dados sociocomportamentais por meio de questionário e amostras cérvico-vaginais para realização do exame de Papanicolaou. Para o teste estatístico foi utilizada a Análise Hierárquica de Agrupamentos (AHA). AC foram detectadas em 33 PS (36,7%), sendo 18 (20,0%) atípicas de significado indeterminado possivelmente não neoplásica (ASC-US), quatro (4,4%) atípicas de significado indeterminado sem excluir lesão de alto grau (ASC-H), sete (7,8%) lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL) e quatro (4,4%) lesão intraepitelial de alto grau (HSIL). Comparando os dados das PS com citologia normal e alterada, houve diferenças estatisticamente significativas quanto ao tabagismo, início da atividade sexual, relações com pessoas do mesmo sexo e detecção de *Gardnerella vaginalis*. AHA classificou as PS em quatro grupos distintos, em que as PS com idade média superior apresentaram maior proporção de DST, HIV, AC e pouco uso do preservativo. As PS com menor idade média mostraram menor frequência de AC, DST, atividade sexual precoce e HIV negativo.

**Palavras-chave.** atípicas celulares, citologia oncótica, profissionais do sexo, DST, análise multivariada.

### ABSTRACT

This study aimed at identifying the multivariate associations between the cervical cytological abnormalities and the risk behavior of sex workers (SW) enrolled at CRESSER – Sumaré, São Paulo. The study included 90 PS, and the uterine cervix samples were collected for performing Pap smear, and also the socio-behavioral data through a questionnaire. Hierarchical Cluster Analysis (AHA) was used as statistical test. Atypical cytology were found in 33 PS (36.7%), being 18 (20.0%) ASC-US, four (4.4%) ASC-H, seven (7.8%) LSIL and four (4.4%) HSIL. By comparing the SW with normal and abnormal cytology, significant differences were detected regarding smoking habit, early sexual activity, sexual intercourse with the members of the same sex, and *Gardnerella vaginalis* detection. According to the AHA classification, the group with the highest prevalence of atypical cells showed highest proportion of STD, HIV and low condom use. The group with the lowest average age showed lower prevalence of atypical cells, STD, HIV negative, and no early sexual activity.

**Keywords.** atypical cells, cytomorphologic analysis, sex worker, STD, multivariate analysis.

## INTRODUÇÃO

As alterações citológicas e a progressão para o câncer cervical têm como fator causal a infecção persistente pelo HPV, fato comprovado pelas evidências da literatura dos últimos trinta anos<sup>1</sup>. Possíveis cofatores exógenos ou endógenos interagem em menor ou maior intensidade com as oncoproteínas e outros elementos do HPV, potencializando a ação do vírus na célula hospedeira e facilitando o desenvolvimento dos processos de imortalização e carcinogênese<sup>2</sup>. Elevado número de parceiros, não utilização de preservativos nas relações sexuais, uso de contraceptivo hormonal, tabagismo, idade precoce da primeira relação sexual, multiparidade, baixo nível de escolaridade, renda familiar e resposta imune são fatores de risco associados a progressão das lesões<sup>3-5</sup>.

Mulheres imunodeprimidas apresentam maior risco de desenvolvimento da lesão intraepitelial e invasiva. A relação da infecção por HPV e HIV é frequente, visto que ambas são de transmissão sexual, sendo que as populações de risco apresentam características em comum<sup>1</sup>.

Milhões de infecções virais transmitidas sexualmente ocorrem anualmente atribuídas principalmente ao vírus da Imunodeficiência Humana (*Human Immunodeficiency Virus – HIV*), Herpes simples (*Herpes simplex virus – HSV*), Papilomavírus humano (*Human Papillomavirus – HPV*) e vírus da hepatite B (*Hepatitis B virus – HBV*); porém, apenas os casos de HIV, como gestantes HIV positivas, crianças expostas ao HIV e gestantes com sífilis e crianças com sífilis congênita, são de notificação compulsória<sup>6</sup>.

O Centro de Referência em Saúde Sexual e Reprodutiva (CRESSER) do Município de Sumaré, São Paulo, é responsável pelo atendimento a pessoas portadoras de HIV/AIDS, sífilis, hepatite C e B, entre outras DSTs. Realiza exame pré-natal em gestantes com HIV positivo, acompanha e trata crianças com diagnóstico de sífilis congênita e HIV positivo e atende e orienta as profissionais do sexo (PS) da região.

A expressão profissional do sexo “designa uma pessoa que faz sexo de forma impessoal por uma determinada quantia de dinheiro ou troca por qualquer outro bem”<sup>7</sup>. Esses indivíduos são considerados um grupo de alto risco para diversos danos relacionados à saúde<sup>8</sup>. Atualmente, o termo “grupo de risco” entrou em desuso, sendo utilizada a expressão comportamento de risco, com significado relacionado a práticas sexuais que oferecem maior risco de infecção, independente da orientação sexual<sup>9</sup>.

As PS, seus clientes e parceiros fazem parte de uma população que apresentam comportamento de risco para infecções sexualmente transmissíveis<sup>10</sup>, devido ao elevado número de parceiros, relações sexuais de risco e frequente exposição sem proteção, elevando assim o risco de adquirir e transmitir o HIV e, outras DSTs aos clientes e outros parceiros<sup>11-14</sup>. Com base nessas considerações, o presente estudo teve como objetivo identificar associações multivariadas entre as alterações citológicas do colo uterino e o comportamento de risco das mulheres PS atendidas no CRESSER do município de Sumaré/SP.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Sujeitos da pesquisa

Este estudo teve caráter exploratório-descritivo, no qual foram observadas características sociodemográficas e diagnósticas. Foram convidadas a participar desta pesquisa todas as PS atendidas no CRESSER (n = 90), Sumaré/SP, no ano de 2009. As participantes foram informadas sobre o anonimato da pesquisa através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e tiveram a liberdade de abandonar o projeto a qualquer momento. As pacientes não sofreram qualquer tipo de discriminação e a conduta clínico-cirúrgica, tratamento e seguimento pós-terapêutico foram assegurados. O estudo seguiu as recomendações da Declaração de Helsinque e Resolução nº 196/96, sendo que o protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz.

### Treinamento e orientação

Foi realizado treinamento das profissionais do CRESSER responsáveis pela colheita das amostras colpocitológicas pela técnica de citologia em meio líquido para padronizar o método da coleta de dados. Todas as PS dessa Unidade de Saúde foram convidadas a participar de uma palestra de esclarecimento, orientação e conscientização da importância da prevenção do câncer ginecológico, ministrada pelos profissionais do Laboratório de Citologia Oncótica do Instituto Adolfo Lutz (LCO-IAL) de São Paulo.

### Exame citopatológico

As amostras foram colhidas pelo protocolo da citologia de meio líquido, processadas de acordo com as recomendações do fabricante ThinPrep<sup>®</sup> Pap Test (Cytec Corp, Marlborough, Massachusetts, EUA), coradas pelo método de Papanicolaou e classificadas de acordo com a Nomenclatura Brasileira para laudos

citopatológicos cervicais<sup>15</sup>. Os laudos foram emitidos pelo Sistema de Informação do Câncer de Colo Uterino (SISCOLO) do programa de rastreamento do câncer de colo uterino. Todas as PS preencheram questionário com dados sociocomportamentais.

### Análise estatística

Para verificar associações estatísticas multivariadas entre as variáveis de resposta e caracterizar as PS classificadas de acordo com as respostas sociocomportamentais e citológicas, a análise hierárquica de agrupamentos (AHA) foi aplicada às seguintes variáveis: idade, grau de escolaridade, idade da primeira relação sexual, uso de preservativo nas relações sexuais, relação sexual anal, histórico de DST/HIV, número de gestações, exame preventivo anterior, uso de hormônio contraceptivo, presença de *Gardnerella vaginalis* (Gv), tabagismo e diagnóstico citológico.

A associação foi calculada utilizando valores autoescalados e, baseada na distância Euclidiana e no método de agrupamento hierárquico de Ward, gerando um dendrograma contendo os grupos de PS agrupadas de acordo com seu grau de similaridade em relação às variáveis de estudo<sup>16</sup>. Para caracterizar as PS contidas nos quatro grupos formados, o teste de Hartley foi aplicado para verificar a homogeneidade de variâncias para as respostas quantitativas. A análise de variância unifatorial (*one-way ANOVA*) e o teste de Fisher de mínima diferença significativa (LSD) foram aplicados para identificar contrastes entre os grupos. Para avaliar diferenças entre os grupos em relação às variáveis qualitativas, utilizou-se o teste-z bicaudal de proporções<sup>17</sup>.

Foi utilizado o teste *t*-Student para verificar diferenças entre as PS que apresentaram citologia alterada (n = 33) e citologia normal (n = 57), após a checagem de homogeneidade de variâncias pelo teste *F*. Valores-p < 0,05 foram considerados estatisticamente significativos e valores-p > 0,06 e < 0,10 considerados marginalmente significativos. O programa computacional Statistica v.11 (StatSoft, Tulsa, OK, EUA) foi usado para as análises estatísticas.

## RESULTADOS

### Dados gerais

Participaram do estudo 90 mulheres PS, com idade média de 34,9 anos. Do total de PS, 33 (36,7%) apresentaram exame citopatológico alterado, classificados em: dezoito

(20,0%) células escamosas atípicas de significado indeterminado, possivelmente não neoplásicas (ASC-US), quatro (4,4%) células escamosas atípicas de significado indeterminado, não excluindo lesão de alto grau (ASC-H), sete (7,8%) lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL) e quatro (4,4%) lesão intraepitelial de alto grau (HSIL).

Quando questionadas sobre a idade da primeira relação sexual, sete (7,8%) mulheres alegaram início antes dos 12 anos, 65 (72,2%) entre 12 e 17 anos e 18 (20,0%) após os 18 anos de idade.

### Comparação entre PS em relação ao exame citopatológico alterado

**Tabela 1.** Comparação entre as profissionais do sexo com exame citopatológico alterado e normal, atendidas no CRESSER, Sumaré, em 2009

Variáveis de resposta	Citologia alterada (n = 33)	Citologia normal (n = 57)	p-valor
Idade*	34,98 ± 8,35	34,92 ± 9,77	0,73
Escolaridade*	6,94 ± 3,15	7,31 ± 3,34	0,34
Idade da 1ª relação sexual*	16,3 ± 2,98	15,46 ± 2,31	0,09
Orientação Sexual			
Heterossexual	29 (87,88%)	52 (91,23%)	0,65
Bissexual	2 (6,06%)	1 (1,75%)	0,17
Homossexual	0 (0%)	3 (5,26%)	NA
Uso do Preservativo	24 (72,73%)	36 (63,16%)	0,33
Relação sexual com o mesmo sexo	3 (9,09%)	14 (24,56%)	0,08
Relação anal	10 (30,30%)	26 (45,61%)	0,16
HIV+	22 (66,67%)	28 (49,12%)	0,12
Tabagismo	10 (30,30%)	31 (54,39%)	0,03
Histórico de DST	15 (45,45%)	20 (35,09%)	0,35
Exame de Papanicolaou anterior	29 (87,88%)	51 (89,47%)	0,89
Número de gestações**	2	2	NA
Hormônio contraceptivo oral	6 (18,18%)	17 (29,82%)	0,21
Presença de <i>Gardnerella vaginalis</i>	5 (15,15%)	18 (31,58%)	0,08
Presença de alteração citológica	33 (100%)	0 (0%)	NA
Situação marital			
Solteira	20 (60,61%)	28 (49,12%)	0,27
Casada	7 (21,21%)	16 (28,07%)	0,46
Viúva	1 (3,03%)	4 (7,02%)	0,42
Separada	4 (12,12%)	9 (15,79%)	0,60

\* expresso em anos

\*\* mediana

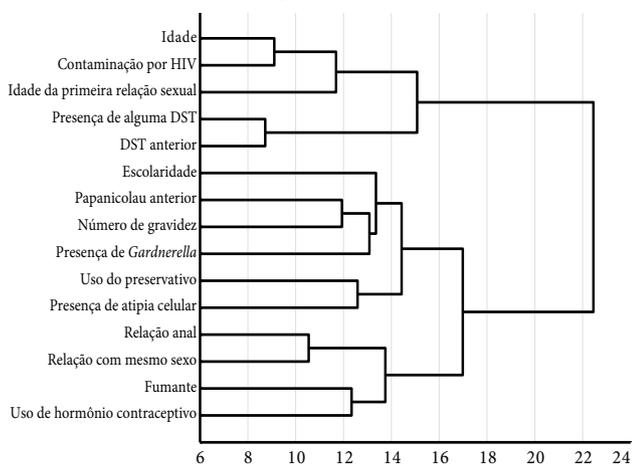
Nota: valores de probabilidade obtidos pelo teste *t*-Student ou teste z-bicaudal.

NA= Não aplicável

A Tabela 1 mostra a comparação entre as PS com exame citopatológico alterado e normal. Observou-se diferença estatística significativa nas proporções entre os grupos em relação ao uso do tabaco ( $p = 0,03$ ) e diferenças marginalmente significativas entre os grupos em relação à presença de Gv ( $p = 0,08$ ), PS que fazem relação sexual com pessoas do mesmo sexo ( $p = 0,08$ ) e idade da primeira relação sexual ( $p = 0,09$ ). Para as demais variáveis de resposta, não houve diferença estatística significativa entre os grupos. Utilizando essa abordagem estatística, não foram observadas diferenças significativas para grande parte das variáveis estudadas, evidenciando, portanto, que o uso de estatísticas multivariadas pode ser empregado para uma melhor visualização e exploração dos resultados citológicos e comportamentais.

### Análise estatística multivariada

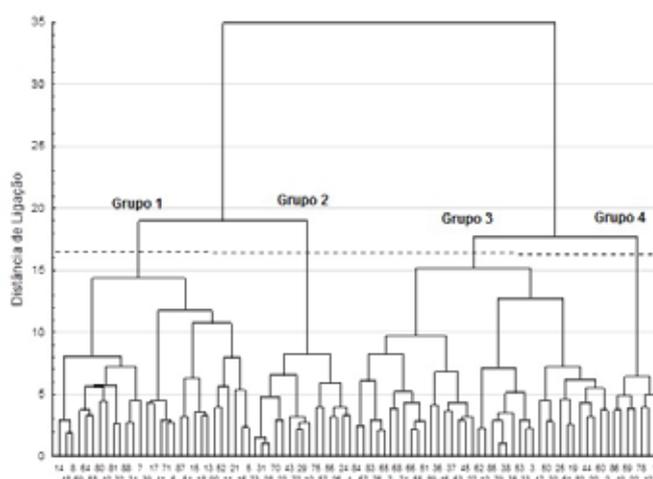
A Figura 1 mostra a associação entre as variáveis de resposta usando AHA. No grupo de PS estudado, verificou-se que a presença do vírus HIV esteve intimamente associada com a idade e a idade da primeira relação sexual. O grau de escolaridade mostrou associação com a realização de exame preventivo, número de gravidez e presença de Gv. O tabagismo associou-se ao uso de contraceptivos, prática de sexo anal e relações com pessoas do mesmo sexo.



**Figura 1.** Dendrograma dos grupos de profissionais do sexo atendidas no CRESSER em 2009, agrupadas de acordo com o grau de similaridade em relação às variáveis

A AHA agrupou em um mesmo *cluster* as PS que apresentaram características semelhantes e, de forma análoga, mostrou dissimilaridades entre as PS incluídas nos outros *clusters*. A classificação das PS foi demonstrada na Figura 2, destacando quatro grupos distintos.

A Tabela 2 mostra os resultados da análise de variância (variáveis quantitativas), seguido de teste de média ou teste-z para comparar as proporções de populações independentes. Verificou-se diferença estatística significativa entre os grupos considerando a idade, idade da primeira relação sexual, uso do preservativo, relações sexuais com pessoas do mesmo sexo, relação anal, histórico de DST, positividade para HIV, tabagismo, uso de hormônio contraceptivo, presença de citologia alterada, Gv e situação marital (solteira). Não houve diferença estatística significativa nas demais variáveis dependentes.



**Figura 2.** Análise Hierárquica de Agrupamentos aplicada às profissionais do sexo

Dos grupos obtidos (Figura 2 e Tabela 2), o grupo 1 ( $n = 29$ ) caracterizou-se pela presença de PS com idade média intermediária (30,57 anos), maior grau de escolaridade (8,17 anos), maior proporção de PS que relataram uso de preservativo (89,65%), prática de relação sexual anal (55,17%), infecção por Gv (44,83%) e menor índice de infecção pelo HIV (24,14%). O grupo 2 ( $n = 15$ ) apresentou menor média de idade (27,68 anos) e do início da atividade sexual (13,93 anos). Mostrou também menor frequência de histórico de infecção por DSTs (13,33%), nenhuma profissional infectada pelo HIV, menor frequência de PS com citologia alterada (6,67%) e predomínio de solteiras (66,67%). O grupo 3 ( $n = 39$ ) caracterizou-se por apresentar maior média de idade (41,75 anos) e início de atividade sexual tardio (16,56 anos). Apresentaram ainda maior proporção de profissionais que relataram positividade para HIV (94,87%), maior número (mediana) de gravidez (3), menor uso do preservativo (5,13%) e menor proporção

**Tabela 2.** Comparação entre os grupos de profissionais do sexo atendidas no CRESSER, Sumaré, em 2009

Variáveis	Grupo 1 (n = 29)	Grupo 2 (n = 15)	Grupo 3 (n = 39)	Grupo 4 (n = 7)	PSD
Idade*	30,57 <sup>b</sup>	27,68 <sup>b</sup>	41,75 <sup>a</sup>	30,76 <sup>b</sup>	9,23
Escolaridade*	8,17 <sup>a</sup>	6,20 <sup>a</sup>	7,10 <sup>a</sup>	5,57 <sup>a</sup>	3,26
Idade da 1ª relação sexual*	15,62 <sup>b</sup>	13,93 <sup>b</sup>	16,56 <sup>a</sup>	15,86 <sup>ab</sup>	2,59
Número de gestações**	2	1	3	2	NA
Orientação sexual					
Heterossexual	25 (86,21%) <sup>a</sup>	14 (93,33%) <sup>a</sup>	36 (92,31%) <sup>a</sup>	6 (85,71%) <sup>a</sup>	NA
Bissexual	1 (3,45%) <sup>a</sup>	0	2 (5,13%) <sup>a</sup>	0 (%)	NA
Homossexual	1 (3,45%) <sup>a</sup>	1 (6,67%) <sup>a</sup>	0	1 (14,29%) <sup>a</sup>	NA
Uso do Preservativo	26 (89,65%) <sup>a</sup>	13 (86,67%) <sup>a</sup>	18 (46,15%) <sup>b</sup>	3 (42,86%) <sup>b</sup>	NA
Relação sexual com pessoas do mesmo sexo	11 (37,93%) <sup>a</sup>	4 (26,67%) <sup>ab</sup>	2 (5,13%) <sup>b</sup>	0	NA
Relação anal	16 (55,17%) <sup>a</sup>	8 (53,33%) <sup>ab</sup>	11 (28,20%) <sup>bc</sup>	1 (14,29%) <sup>c</sup>	NA
HIV+	7 (24,14%) <sup>b</sup>	0	37 (94,87%) <sup>a</sup>	6 (85,71%) <sup>a</sup>	NA
Fumante	12 (41,38%) <sup>b</sup>	12 (80%) <sup>a</sup>	15 (38,46%) <sup>b</sup>	2 (28,57%) <sup>b</sup>	NA
Histórico de DST	9 (31,03%) <sup>ab</sup>	2 (13,33%) <sup>b</sup>	20 (51,28%) <sup>a</sup>	4 (57,14%) <sup>a</sup>	NA
Exame de Papanicolaou anterior	26 (89,65%) <sup>a</sup>	15 (100%) <sup>a</sup>	39 (100%) <sup>a</sup>	0	NA
Hormônio contraceptivo	3 (10,34%) <sup>bc</sup>	15 (100%) <sup>a</sup>	2 (5,13%) <sup>c</sup>	3 (42,86%) <sup>b</sup>	NA
Presença de <i>Gardnerella</i>	13 (44,83%) <sup>a</sup>	4 (26,67%) <sup>ab</sup>	6 (15,38%) <sup>b</sup>	0	NA
Presença de atipia celular	13 (44,83%) <sup>a</sup>	1 (6,67%) <sup>b</sup>	15 (38,46%) <sup>ab</sup>	4 (57,14%) <sup>a</sup>	NA
Situação marital					
Solteira	19 (65,52%) <sup>a</sup>	10 (66,67%) <sup>a</sup>	16 (41,03%) <sup>b</sup>	3 (42,86%) <sup>ab</sup>	NA
Casada	6 (20,69%) <sup>a</sup>	3 (20%) <sup>a</sup>	13 (33,33%) <sup>a</sup>	1 (14,29%) <sup>a</sup>	NA
Viúva	1 (3,45%) <sup>a</sup>	0	3 (7,69%) <sup>a</sup>	1 (14,29%) <sup>a</sup>	NA
Separada	3 (10,34%) <sup>a</sup>	2 (13,33%) <sup>a</sup>	7 (17,95%) <sup>a</sup>	1 (14,29%) <sup>a</sup>	NA

\* expresso em anos; \*\* mediana

**Nota:** Letras diferentes na mesma linha representam valores estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste-z bicaudal para proporções ou teste de Fisher LSD.

de infecção com *Gv* (15,38%). O grupo 4 ( $n = 7$ ) apresentou menor grau de escolaridade (5,57 anos), uso de preservativos (42,86%), prática de sexo anal (14,29%), tabagismo (28,57%), sendo o maior número de PS que relataram DST anterior (57,14%) e presença de citologia alterada (57,14%).

## DISCUSSÃO

Esfregaços cérvico-vaginais com lesão intraepitelial escamosa (SIL) e HPV de alto risco são mais prevalentes em PS do que na população geral. Estudos com PS mostraram prevalência de 4,9% a 15,6% de LSIL e 2,5% a 3,2% de HSIL<sup>18-20</sup>. No presente estudo, houve frequência de 12,2% de lesões intraepiteliais (11/90), sendo 7,8% LSIL e 4,4% HSIL. Essas taxas mostraram-se elevadas em comparação às mulheres não PS atendidas no Sistema Único de Saúde (SUS) e rastreadas na rotina assistencial do LCO-IAL no ano de 2009 (1,68% de LSIL e 0,37% de HSIL)<sup>21,22</sup>.

Há relatos da literatura mundial que demonstraram elevados níveis de DSTs entre as PS. No grupo estudado, 35 (38,9%) PS relataram histórico de DSTs, incluindo infecção pelo HPV, HSV, sífilis e

*Neisseria gonorrhoea*. Com relação à infecção pelo HIV, 50 (55,9%) afirmaram ser portadoras do vírus, sendo o grupo 3 o mais prevalente. Os resultados deste estudo são superiores quando comparados a estudos realizados em São Paulo-BR (1,0%;  $n = 820$ )<sup>23</sup>, Paraná-BR (2,7%;  $n = 393$ )<sup>3</sup> e China (2,3%;  $n = 362$ )<sup>24</sup>. Estudos têm demonstrado que a infecção por HIV e subsequente imunossupressão pode interferir na história natural da infecção por HPV causando persistência e aumento do risco de neoplasia cervical<sup>25,26</sup>.

Resultados de meta-análise sugerem forte associação entre *Gv* e infecção cervical por HPV, mostrando que a infecção por HPV favorece alterações no meio vaginal, o que aumenta o desenvolvimento da *Gv*. Correa et al.<sup>13</sup> e Giraldo et al.<sup>25</sup> demonstraram positividade para *Gv* de 15,4% e 41,5%, respectivamente, nas PS. Em nossa população, foi observada a presença de vaginose bacteriana por *Gv* em 23 PS (25,6%).

Tem sido relatado que o grau de escolaridade e outros indicadores socioeconômicos podem refletir nas diferentes práticas sexuais e características dos parceiros, que podem agir como comportamento de risco para a exposição ao vírus. Moura et al.<sup>26</sup> mostraram a influência da escolaridade na escolha dessa profissão

em 30 mulheres (três analfabetas e 27 com ensino fundamental incompleto) e na falta de consciência e conhecimento do preservativo como barreira eficaz na transmissão de DSTs<sup>27</sup>. Resultado semelhante foi observado no Estado do Paraná, em que 38 PS (50,6%) tinham menos de oito anos de escolaridade, havendo uma associação entre o grau de escolaridade e o rendimento financeiro com a ocorrência das DSTs<sup>13</sup>. Os resultados obtidos no presente estudo não mostraram associação estatística significativa entre os grupos em relação ao grau de escolaridade.

O início precoce da atividade sexual tem sido relatado como comportamento de risco para a exposição ao HPV e desenvolvimento das lesões. Singer<sup>27</sup> relatou que, na adolescência, existe a zona de transformação do colo uterino, área onde vão ocorrer os fenômenos da reepitelização, quando o epitélio colunar evertido é substituído por um epitélio escamoso recém-formado, que se denomina epitélio metaplásico (metaplasia escamosa). Essa área é susceptível aos agentes da carcinogênese, principalmente o HPV e outras DSTs. Mendonça et al.<sup>28</sup> mostraram que a frequência de mulheres com início da atividade sexual antes dos 20 anos foi maior nas que apresentaram diagnóstico de HSIL e carcinoma (86,1%), do que nas mulheres com diagnósticos de alterações benignas/normal (71,0%).

Vários estudos evidenciaram a precocidade do início da atividade sexual, como demonstrado por Qyra et al.<sup>29</sup>, em que 54,4% das mulheres relataram idade da primeira relação sexual abaixo de 14 anos. Das PS integrantes deste estudo, 7,8% iniciaram a atividade sexual antes dos 12 anos, categorizadas como criança, segundo o estatuto da criança e do adolescente<sup>30</sup> e 72,2% das PS afirmaram ter iniciado a atividade sexual entre 13 e 17 anos.

Diversos estudos foram realizados sobre o método de prevenção às DSTs entre as PS. Hernandez e Nguyen<sup>31</sup> mostraram que 100% relataram o uso do preservativo com os seus clientes; Moura et al.<sup>26</sup> relataram que 90% não utilizaram o preservativo em todas as relações sexuais por terem parceiros fixos ou casados que se mostravam fiéis a elas e às esposas ou até porque os clientes não gostavam do método. Estudo na Itália mostrou que clientes italianos aceitavam pagar mais pelo serviço das PS sem o uso do preservativo<sup>10</sup>. Nosso estudo mostrou que o grupo com menor proporção de uso de preservativos foi o que apresentou maior frequência de alterações citológicas.

## CONCLUSÃO

O grupo de PS com maior idade média apresentou maior proporção com histórico de DST e infecção por HIV, menor uso do preservativo, intermediária proporção de profissionais que realizaram sexo anal, predomínio de exame citopatológico alterado e menor proporção de infecção por Gv. Por outro lado, o grupo de PS com menor prevalência de histórico de DSTs não apresentou nenhuma profissional infectada pelo HIV, além de terem menor número de exame citopatológico alterado.

Observou-se que as PS mais jovens relataram maior frequência no uso de preservativo em relação às mais velhas, sendo este último o grupo que mais apresentou infecção por HIV e DSTs anteriores. O conhecimento da realidade dessas mulheres é importante para orientar ações em saúde, visto que o uso do preservativo de forma adequada é imprescindível para essa população.

Ao comparar o grupo de PS com citologia alterada e citologia normal, diferenças estatísticas foram observadas em relação ao tabagismo, presença de Gv e prática de relações sexuais com pessoas do mesmo sexo.

O estudo demonstrou que as mulheres PS, apesar do acompanhamento pelo Programa CRESSER, apresentaram alta prevalência de infecção por HIV e de exames citopatológicos alterados em relação à população de rotina atendida no SUS.

Diante destes resultados, verificou-se a necessidade de implementar na rotina do serviço, educação permanente a essas mulheres, referente à orientação sexual, estratégias socioeducativas e/ou efetivas para redução da incidência de HIV e neoplasias intraepiteliais cervicais.

## REFERÊNCIAS

1. Pinto AP, Tulio S, Cruz OR. Cofatores do HPV na oncogênese cervical. *Rev Assoc Med Bras*. 2002;48(1):73-8.
2. Castellsagué X, Muñoz N. Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis – role of parity, oral contraceptives and tobacco smoking. *J Nat Cancer Inst Monogr*. 2003;31:20-8.
3. Baldwin SB, Wallace DR, Papenfuss MR, Abrahamsen M, Vaught LC, Giuliano AR. Condom use and other factors affecting penile human papillomavirus detection in men attending a sexually transmitted disease clinic. *Sex Transm Dis*. 2004;31(10):601-7.
4. Kjellberg L, Hallmans G, Ahren A-M, Johansson R, Bergman F, Wadell G, et al. Smoking, diet, pregnancy and oral contraceptive use as risk factors for cervical intra-epithelial neoplasia in relation to human papillomavirus infection. *Br J Cancer*. 2000;82(7):1332-8.

5. WHO. Sexually transmitted infections [acesso 2011 Nov 11]. Disponível em: [<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs110/en/index.html>].
6. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. HIV/Aids, hepatites e outras DST. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2006. 196p. il. (Cadernos de Atenção Básica, n.18). (Série A. Normas e Manuais Técnicos). p. 7.
7. Oltramari LC, Camargo BV. Representações sociais de mulheres profissionais do sexo sobre a AIDS. *Est Psicol*. 2004;9(2):317-23.
8. Salmeron NA, Pessoa TAM. Profissionais do sexo: perfil socioepidemiológico e medidas de redução de danos. *Acta Paul Enferm*. 2012;25(4):549-54.
9. Aquino PS, Ximenes LB, Pinheiro AKB. Políticas públicas de saúde voltadas à atenção à prostituta: breve resgate histórico. *Enf Foco*. 2010;1(1):10-22.
10. Fornasa CV, Gai F, Tarantello M, Gallina P. Knowledge of sexually transmitted diseases and condom use among female street sex workers in Padua. *Acta Derm Venereol*. 2005;14(3):107-10.
11. Steen R, Dallabetta G. Sexually transmitted infection control with sex workers: regular screening and presumptive treatment augment efforts to reduce risk and vulnerability. *Reprod Health Matters*. 2003;11:74-90.
12. Passos ADC, Figueiredo JFC. Fatores de risco para doenças sexualmente transmissíveis entre prostitutas e travestis de Ribeirão Preto (SP), Brasil. *Rev Panam Salud Publica*. 2004;16(2):95-101.
13. Correa NAB, Matumoto FH, Lonardonni MVC. Doenças sexualmente transmissíveis em mulheres profissionais do sexo, Umuarama, Estado do Paraná. *RBAC*. 2008;40(3):209-13.
14. Li Yan, Detels R, Lin Peng, Fu Xiaobing, Deng Zhongming, Liu Yongying, et al. Prevalence of Human Immunodeficiency virus and sexually transmitted infections and associated risk factors among female sex workers in Guangdong Province, China. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2010;53(Suppl):S48-S53.
15. Ministério da Saúde/INCA. Nomenclatura brasileira para laudos cervicais e condutas preconizadas: Recomendações para profissionais de saúde. *J Bras Patol Med Lab*. 2006;42(5):351-73.
16. Granato D, Castro IA, Katayama F. Phenolic composition of South-American red wines classified according to their antioxidant activity, retail price, and sensory quality. *Food Chem*. 2011;129:366-73.
17. Altman DG. *Practical Statistics for Medical Research*. 8.ed. Boca Raton: Chapman & Hall/CRC; 2001.
18. McLaughlin-Drubin ME, Münger K. Oncogenic Activities of human papillomaviruses. *Virus Res*. 2009;143(2):195-208.
19. Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 1999;189(1):12-9.
20. Tideman RL, Thompson C, Rose B, Gilmour S, Marks C, Beek IV, et al. Cervical human papillomavirus infections in commercial sex workers- risk factors and behaviours. *Int J STD AIDS*. 2003;14:840-7.
21. Yamamoto LSU, Pereira SMM, Etlinger D, Aguiar LS, Sakai YI, Shirata NK, et al. Frequência de diagnóstico de lesões do colo uterino por faixa etária em mulheres atendidas no Programa de Rastreamento Viva Mulher no período de 2004 a 2008. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2009;68(1):126-32.
22. Etlinger D, Sakai YI, Aguiar LS, Feres CL, Rodrigues ROL, Teixeira MS, et al. Frequência dos diagnósticos citopatológicos cérvico-vaginais detectados no Núcleo de Anatomia Patológica do Instituto Adolfo Lutz no ano de 2009. *Bol Inst Adolfo Lutz*. 2010;20(1):30-2.
23. Luchters SMF, Broeck DV, Chersich MF, Nel A, Delva W, Mandaliya K, et al. Association of HIV infection with distribution and viral load of HPV types in Kenya: a survey with 820 female sex workers. *BMC Infect Dis*. 2010;10(18):1-10.
24. Lu F, Jia Y, Sun X, Wang L, Liu W, Xiao Y, et al. Prevalence of HIV infection and predictors for syphilis infection among female sex workers in southern China. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2009;40(2):263-72.
25. Giraldo PC, Amaral RLG, Gonçalves AK, Vicentini R, Martins CH, Giraldo H, et al. Influência da frequência de coitos vaginais e da prática de duchas higiênicas sobre o equilíbrio da microbiota vaginal. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2005;2795:257-62.
26. Moura ADA, Lima GG, Farias LM, Feitoza AR, Barroso MGT. Prostituição x DST/AIDS: um estudo descritivo com perspectivas de práticas de prevenção. *DST-J Bras Doenças Sex Transm*. 2009;2(3):143-8.
27. Singer A. The uterine cervix from adolescence to the menopause. *Br J Obstet Gynaecol*. 1975;82(2):81-99.
28. Mendonça VG, Guimarães MJB, De Lima Filho JL, Mendonça CG, Martins DBG, Crovella S, et al. Infecção cervical por papillomavirus humano; genotipagem viral e fatores de risco para lesão intraepitelial de alto grau e câncer de colo do útero. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2010;32(10):476-85.
29. Qyra S, Basho M, Bani R, Dervishi M, Ulqinaku D, Bino S, et al. Behavioral risk factors and prevalence of HIV and other STIs among female sex workers in Tirana, Albânia. *New Microbiol*. 2011;34:105-8.
30. Brasil. Lei nº 8.069, de 13 de julho de 1990. Estatuto da Criança e do Adolescente [acesso 2011 Out 21]. Disponível em: [[http://planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/L8090.htm](http://planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L8090.htm)].
31. Hernandez BY, Nguyen TV. Cervical human papillomavirus infection among female sex workers in Southern Vietnam. *Inf Agent Cancer*. 2008;2(7):1-9.

## Presença de *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em surto de toxinfecção alimentar ocorrido na região do Vale do Ribeira

### Isolation of *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in a food-borne disease outbreak in Vale do Ribeira region

RIALA6/1525

Estevão de Camargo PASSOS<sup>1\*</sup>, Ataíde dos Santos de ALMEIDA<sup>2</sup>, Ana Ruth Pereira de MELLO<sup>1</sup>, Cícero Vagner de SOUSA<sup>1</sup>, Ana Luiza Soares de FREITAS<sup>1</sup>, Fernanda Garrido GONÇALVES<sup>1</sup>, Maria Aparecida de OLIVEIRA<sup>3</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas, Centro de Laboratório Regional de Santos, Instituto Adolfo Lutz, Rua Silva Jardim, 90, Vila Nova, Santos, SP, Brasil, CEP: 11015-020. Tel./Fax: (13) 3232-5112. E-mail: estevaopqc@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Departamento Municipal de Saúde, Prefeitura Municipal da Estância Turística de Eldorado

<sup>3</sup>Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas, Centro de Laboratório Regional de Ribeirão Preto, Instituto Adolfo Lutz  
Recebido: 14.08.2012 – Aceito para publicação: 04.12.2012

#### RESUMO

Este trabalho descreve um surto de toxinfecção alimentar em nove pessoas que participaram de um almoço de confraternização realizado no município de Eldorado/SP, em 11 de fevereiro de 2012. Os indivíduos acometidos procuraram os serviços ambulatoriais, apresentando sintomas compatíveis com Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), como colite, dor abdominal, vômitos, sudorese e náuseas. A Vigilância Sanitária de Eldorado encaminhou a amostra do alimento suspeito ao Laboratório de Microbiologia Alimentar, Centro de Laboratório Regional de Santos – Instituto Adolfo Lutz. As amostras de arroz cozido e panqueca de frango, servidos nesse almoço, foram coletadas na residência de um dos pacientes. O preparo da amostra para análises microbiológicas e as determinações analíticas foram realizadas de acordo com o *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Dos alimentos analisados, foram isolados coliformes totais e *Escherichia coli* ( $1,1 \times 10^5$  NMP/g), *Staphylococcus aureus* ( $5,6 \times 10^9$  UFC/g), *Bacillus cereus* ( $2,0 \times 10^7$  UFC/g) e *Clostridium perfringens* ( $5,0 \times 10^4$  UFC/g). *Salmonella* spp não foi isolada. Os resultados laboratoriais associados aos casos de gastroenterites sugerem a ocorrência de surto de toxinfecção alimentar. Este relato evidencia a importância do trabalho do Laboratório de Saúde Pública e das Vigilâncias Sanitárias municipais na elucidação de DTA.

**Palavras-chave.** surto toxinfecção alimentar, Vigilância em Saúde, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*.

#### ABSTRACT

This study describes an outbreak of foodborne disease in nine persons who participated in a community lunch in Eldorado/SP, in February 2012. All of the patients presented the main symptoms of this disease as vomiting, sudoresis, abdominal pain, nausea, and colitis. The municipal health surveillance services of Eldorado sent the cooked rice and the chicken pancake to be analysed at Food Microbiology Laboratory, Centro de Laboratório Regional de Santos, Instituto Adolfo Lutz. Conventional methodologies were used, as recommended by the Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods. Coliforms bacteria and *Escherichia coli* ( $1.1 \times 10^5$  MPN/g), *Staphylococcus aureus* ( $5.6 \times 10^9$  CFU/g), *Bacillus cereus* ( $2.0 \times 10^7$  CFU/g) and *Clostridium perfringens* ( $5.0 \times 10^4$  CFU/g) were isolated. No *Salmonella* spp was found. By correlating the detected laboratory results with the patients with gastroenteritis, it is suggested the occurrence of an outbreak of foodborne disease. This investigation shows the importance of the joint-work conducted by the municipal health surveillance services and the laboratory of public health for elucidating the foodborne diseases outbreaks.

**Keywords.** Outbreak of foodborne diseases, health surveillance, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*.

## INTRODUÇÃO

Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) estão relacionados ao consumo de alimentos contendo toxinas bacterianas e/ou agentes patogênicos como bactérias e vírus, ocorrendo frequentemente, apesar da constante divulgação por diversos autores<sup>1-3</sup>. As principais contaminações microbianas podem ocorrer devido a falhas no processamento ao longo da cadeia de produção, ou seja, matéria-prima contaminada, higienização inadequada dos equipamentos e utensílios utilizados no preparo dos alimentos, armazenamento incorreto e manipuladores com hábitos de higiene pessoal deficiente ou portadores de micro-organismos assintomáticos<sup>4-5</sup>.

Os indivíduos acometidos nos surtos de DTA podem apresentar diferentes sintomas de distúrbios gastrointestinais provocados pela ingestão de alimentos contaminados. Particularmente nesse surto de toxinfecção alimentar ocorrido em comensais em um almoço comunitário no município de Eldorado, região do Vale do Ribeira, os doentes procuram os serviços ambulatoriais apresentando sinais clínicos de colite, dor abdominal, vômitos, sudorese e náuseas. A ocorrência desses sinais e sintomas incluindo febre, diarreia, mal-estar, cefaleia, vômitos e tontura também estão associados a surtos de toxinfecção alimentar, sendo descritos por diversos autores, como os trabalhos de Bergamini et al.<sup>6</sup>, que relataram um surto de origem alimentar ocorrido após a ingestão de bolos e doces oferecidos em uma festa de aniversário, na região nordeste do Estado de São Paulo; Hernando et al.<sup>7</sup>, que observaram surto ocorrido em uma penitenciária da Espanha entre os internos após consumo de salpicão à base de mariscos contaminados; e Passos et al.<sup>8</sup>, que descreveram sobre funcionários de uma empreiteira da construção civil após a ingestão de alimento contaminado no surto ocorrido na cidade de Cubatão em 2007.

No Brasil, a divulgação da ocorrência de surtos de toxinfecção alimentar tem sido realizada devido à obrigatoriedade de notificações dos mesmos e, também, devido à preocupação de diversos pesquisadores com esse sério problema de saúde pública, evidenciado em suas publicações, como os relatos por Van Amson et al.<sup>9</sup>, que descreveram, no Paraná, a ocorrência de 1195 (59,8%) surtos bacterianos dos 2000 surtos de toxinfecção alimentar analisados no período de 1978 a 2000. Os autores classificaram os diferentes agentes bacterianos, sendo os mais frequentes *Staphylococcus aureus*, responsável por 492 (41,2%) dos surtos, *Salmonella* spp,

presente em 404 (33,8%), *Clostridium perfringens* em 122 (10,2%), *Bacillus cereus* em 75 (6,3%), *Escherichia coli* em 66 (5,5%) e outros agentes 3%.

Marchi et al.<sup>10</sup>, em 2011, realizaram um levantamento dos surtos de DTA no município de Chapecó, no período de 1995 a 2007, onde ocorreram 61 casos de surtos. *Salmonella* spp foi a mais frequente em 54,0% (33) dos surtos, seguida por *S. aureus* com 13,1% (8) e *B. cereus* com 9,8% (6). Os alimentos implicados foram maionese 32,7% (20), carnes com 22,9% (14), doces em 19,6% (12) e massas em 11,4% (7).

A ocorrência de surtos de DTA em outros países, também tem sido descrita por diversos autores, como no trabalho de Barrabeig et al.<sup>1</sup>, que estudaram em 2010 um surto de gastroenterite ocorrido em um acampamento de verão na Espanha, em 2005, onde identificaram a presença de norovírus nas fezes de um manipulador de alimento portador assintomático, responsável pela disseminação do vírus. Nos Estados Unidos, Scallan et al.<sup>11</sup> estimaram o número de casos de DTA, no período de 2000-2008, utilizando dados de modelos estatísticos para a população. Observaram que a cada ano, 9,4 milhões de pessoas foram acometidas e as bactérias foram responsáveis por 3,4 milhões dos indivíduos doentes. *Salmonella* spp apresentou a maior frequência (11%), seguida de *C. perfringens* (10%), *S. aureus* (2,6%) e *B. cereus* (0,6%).

No surto ocorrido em uma penitenciária do sistema prisional da Espanha, Hernando et al.<sup>7</sup> isolaram *C. perfringens*, *B. cereus* e *E. coli* em salpicão à base de mariscos, com populações acima do estabelecido pela legislação espanhola. O surto ocorreu provavelmente devido ao armazenamento incorreto dos alimentos após o cozimento, uma vez que esses micro-organismos podem ser facilmente destruídos com aquecimento adequado antes de a refeição ser servida. A presença de *E. coli* e coliformes totais indicaram que não houve boas práticas de higiene na manipulação dos alimentos.

A investigação de surtos de toxinfecção alimentar representa um importante componente de epidemiologia e saúde pública. As medidas de prevenção da contaminação alimentar devem ser realizadas por meio de ações educativas sobre higiene e manipulação de alimentos, implementadas e/ou intensificadas não somente para profissionais da área de alimentos, mas também para a população em geral, incluindo toda a cadeia de produção, preparo dos alimentos até a distribuição ao consumidor<sup>4</sup>.

O objetivo do presente trabalho foi relatar a ocorrência de um surto de toxinfecção alimentar em

comensais em um almoço comunitário no município de Eldorado, região do Vale do Ribeira, São Paulo, em fevereiro de 2012.

## MATERIAL E MÉTODOS

A amostra do prato pronto para consumo foi coletada pela Vigilância Sanitária de Eldorado, região do Vale do Ribeira, São Paulo, na residência de uma paciente e consistia de arroz branco cozido e panqueca de frango servidos durante o almoço de confraternização. A refeição foi encaminhada sob refrigeração para análise no laboratório de Microbiologia Alimentar do Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas do Centro de Laboratório Regional de Santos, Instituto Adolfo Lutz.

O preparo da amostra para análise microbiológica e as determinações analíticas foram realizados de acordo com os métodos recomendados por Downes e Ito<sup>12</sup>, específicos para cada micro-organismo avaliado. Foram pesquisados os bioindicadores de contaminação ambiental e fecal, coliformes totais e *E. coli*, através da técnica do número mais provável (NMP), enumeração de *S. aureus*, clostrídios sulfito-redutores a 46 °C e *B. cereus* através diluição de 25 g de amostra em 225 mL de diluente, seguido de inoculação de 1 mL em tubos de ágar SPS (clostrídios), com plaqueamento de 0,1 ou 1 mL em placas de ágar Baird-Parker (*S. aureus*) e ágar BC (*B. cereus*), portanto, os resultados foram referidos a 1 g de amostra e expressos em UFC/g (Unidade Formadora de Colônia/grama do alimento); e *Salmonella* spp através do método de presença ou ausência em 25 gramas da amostra.

## RESULTADOS

Os resultados das análises microbiológicas realizadas na amostra de prato pronto para consumo (arroz cozido e panqueca de frango) encontram-se descritos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Resultados da análise microbiológica de alimento envolvido em surto de toxinfecção ocorrido após almoço de confraternização no município de Eldorado/SP, em fevereiro de 2012

Amostra	Micro-organismos	
Arroz cozido e panqueca de frango	Coliformes totais (NMP/g) <sup>a</sup>	1,1 × 10 <sup>5</sup>
	<i>Escherichia coli</i> (NMP/g)	1,1 × 10 <sup>5</sup>
	<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g) <sup>b</sup>	5,6 × 10 <sup>9</sup>
	<i>Bacillus cereus</i> (UFC/g)	2,0 × 10 <sup>7</sup>
	<i>Clostridium perfringens</i> (UFC/g)	5,0 × 10 <sup>4</sup>
	<i>Salmonella</i> spp (em 25g) <sup>c</sup>	ausência

<sup>a</sup>Número mais Provável por grama; <sup>b</sup>Unidade formadora de colônias por grama; <sup>c</sup>*Salmonella* em 25g da amostra: ausência/presença.

## DISCUSSÃO

Os surtos de DTA, geralmente, estão associados à presença de micro-organismos nas diferentes matérias-primas; contaminação na linha de produção, quando ocorre processamento inadequado; procedimentos da manipulação dos alimentos de origem animal e não inspecionados pelo Serviço de Inspeção Federal, ou alimentos sem a identificação adequada da sua procedência; formação de biofilmes nos equipamentos com limpeza e desinfecção deficientes; e presença de toxinas bacterianas presente nos alimentos<sup>1-3</sup>. Saliente-se que os surtos podem ocorrer em residências, estabelecimentos comerciais, restaurantes, escolas, festas típicas e outras ocasiões<sup>4,6,8</sup>.

A facilidade de distribuição de alimentos industrializados pelo mundo e a livre importação de produtos são alguns dos exemplos que podem contribuir para o aumento de riscos à saúde, em decorrência de uma maior possibilidade de contaminação desses alimentos. Outros fatores também podem ser responsáveis pela ocorrência de agravos à saúde, tais como: alterações nas práticas de produção, distribuição, armazenagem e preparo dos alimentos, sobrevivência e multiplicação de micro-organismos fastidiosos, falta de controle rigoroso quanto ao uso de antimicrobianos e mudanças nos hábitos alimentares dos consumidores<sup>13</sup>.

A presença de micro-organismos com populações em níveis acima dos padrões estabelecido pela legislação em vigor – Resolução RDC nº 12/2001, da ANVISA/Mistério da Saúde – em alimentos prontos para consumo devem ser considerados potencialmente perigosos na possível transmissão de DTA, como relataram os trabalhos de Chouman et al.<sup>14</sup>, que investigaram a microbiota presente em refeições prontas para o consumo, comercializadas em restaurantes self-service da cidade de Araçatuba/SP. Eles analisaram 20 amostras de refeições contendo carne, hortaliças, cereais e leguminosas, e observaram a presença de coliformes termotolerantes com valores acima de 1,1 x 10<sup>3</sup>/g em 55% das amostras e *Staphylococcus aureus* coagulase positiva com valores iguais a 6 x 10<sup>3</sup>/g em 10%. A *Salmonella* spp e o *Bacillus cereus* não foram identificados. Bergamini et al.<sup>4</sup>, em 2011, analisaram oito amostras de alimentos e constataram a presença de *Bacillus cereus* com valores iguais a 2,5 x 10<sup>5</sup> UFC/g em tapioca doce e coliformes termotolerantes com valores iguais a 1,1 x 10<sup>4</sup>/g em quibe cru/pão sírio, em uma festa típica da Região de Riberão

Preto. Cardoso et al.<sup>15</sup> verificaram na Bahia a baixa qualidade microbiológica constatada nos alimentos servidos pelo Programa Nacional de Alimentação Escolar; em 96 amostras de alimentos provenientes de 83 escolas, observaram em 20,4% das escolas amostras não conformes, sendo 2,4% das amostras positivas para *E. coli*, variaram de < 0,47 a > 3,38 log NMP/g ou mL (valor médio de 0,49 log NMP/g ou mL), e *Staphylococcus aureus* coagulase positiva em 26,5% das escolas.

Ressalta-se ser extremamente difícil a obtenção de alimentos isentos de micro-organismos e a ocorrência de surtos de DTA também pode estar associada ao preparo dos alimentos nas residências, como observado por Bergamini et al.<sup>6</sup> em 2009, que descreveram um surto de origem alimentar ocorrido em uma festa de aniversário, na região nordeste do Estado de São Paulo, após a ingestão de bolos de vários sabores preparados pelos próprios familiares e deixados em temperatura ambiente por 21 horas, quando então foram servidos.

Em razão da presença de tantas variáveis que podem comprometer a segurança do alimento chegando a causar quadros graves de surtos de toxinfecção alimentar, ações educativas sobre higiene e manipulação de alimentos devem ser implementadas e intensificadas não somente para profissionais da área de alimentos, mas também para a população em geral.

Em relação à ocorrência de DTA, a influência dos bioindicadores de contaminação ambiental e fecal, como os coliformes termotolerantes, também é discutida em relatos de DTA, como os artigos publicados por Passos et al.<sup>3,8</sup>, divulgando surtos ocorridos no Guarujá/SP e em Cubatão/SP.

No presente surto relatado foi observada a presença de vários agentes patogênicos oriundos do alimento analisado. Destaca-se que o isolamento de mais de um agente etiológico em um surto de toxinfecção alimentar pode ocorrer quando as condições higiênicas do produto estão insatisfatórias, ou mesmo quando o alimento é manipulado por várias pessoas, como no surto descrito por Bergamini et al.<sup>6</sup> ocorrido na região nordeste do Estado de São Paulo, onde isolaram *B. cereus*, *S. aureus* e coliformes termotolerantes em alimentos servidos em festa de aniversário.

A obrigatoriedade da notificação de surtos de DTA no Brasil é uma importante ferramenta de apoio às Vigilâncias Sanitária e Epidemiológica Municipais, subsidiando ações específicas, desde o acompanhamento dos casos clínicos até o diagnóstico laboratorial. Mesmo

sendo obrigatória a notificação no país, ainda existe subnotificação de surtos de DTA, resultando que muitos surtos passam despercebidos pelas autoridades sanitárias.

A origem do surto em estudo, segundo as informações da Vigilância Sanitária de Eldorado, região do Vale do Ribeira, São Paulo, provavelmente ocorreu durante a manipulação dos alimentos por diversas pessoas da comunidade, e os resultados encontrados no laboratório associados aos casos de gastroenterites dos comensais sugerem surto de toxinfecção alimentar. Este relato evidencia a importância do trabalho do Laboratório de Saúde Pública e da Vigilância Sanitária municipal na elucidação de DTA.

## REFERÊNCIAS

1. Barrabeig I, Rovira A, Buesa J, Bartolomé R, Pintó R, Pallezo H, et al. Foodborne norovirus outbreak: the role of an asymptomatic food handler. *BMC Infect Dis*. 2010;10:269.
2. Gelli DS, Jakabi M, Souza A. Botulism: a laboratory investigation on biological and food samples from cases and outbreaks in Brazil (1982-2001). *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2002;44(6):321-4.
3. Passos EC, Mello ARP, Sousa CV, Silva CR, Alonso ACB, Gonzalez E, et al. Provável surto de toxinfecção alimentar em funcionários de uma empresa no litoral da região sudeste do Brasil. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2010;69(1):136-40.
4. Bergamini AMM, Reche SHR, Aquino CI, Oliveira MA. *Bacillus cereus* em alimento oferecido em festa típica popular no interior do Estado de São Paulo. *Bol Inst Adolfo Lutz*. 2011;21(1):35-6.
5. Rall VLM, Sforcin JM, Augustini VCM, Watanabe MT, Fernandes Jr A, Rall R, et al. Detection of enterotoxin genes of *Staphylococcus* sp isolated from nasal cavities and hands of food handlers. *Braz J Microbiol*. 2010;41:59-65.
6. Bergamini AMM, Ribeiro EGA, Oliveira SAV, Castro LF, Oliveira MA. Surto de toxinfecção alimentar de origem domiciliar, ocorrido na região nordeste do Estado de São Paulo. *Bol Inst Adolfo Lutz*. 2009;19(1):23-4.
7. Hernando V, Arranz LN, Catalán S, Gómez P, Hidalgo C, Barrasa A, et al. Investigación de una toxiinfecção alimentaria en un centro penitenciario de alta ocupación. *Gac Sanit*. 2007;21(6):452-7.
8. Passos EC, Almeida CS, Rosa JP, Rozman LM, Mello ARP, Souza CV, et al. Surto de toxinfecção alimentar em funcionários de uma empreiteira da construção civil no município de Cubatão, São Paulo/Brasil. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2008;67(3):237-40.
9. Van Amson G, Haracemiv SMC, Masson ML. Levantamento de dados epidemiológicos relativos a ocorrências/surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no Estado do Paraná – Brasil, no período de 1978 a 2000. *Ciênc Agrotec*. 2006;30(6):1139-45.
10. Marchi DM, Baggio N, Teo CRPA, Busato MA. Ocorrência de surtos de doenças transmitidas por alimentos no Município de Chapecó, Estado de Santa Catarina, Brasil, no período de 1995 a 2007. *Epidemiol Serv Saúde*. 2011;20(3):401-7.
11. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, et al. Foodborne Illness Acquired in the United States – Major Pathogens. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(1):7-15.

12. Downes FP, Ito K, editors. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Washington: Edwards Brothers; 2001.
13. Potes ME. Segurança alimentar em produtos tradicionais. *Rev Ciênc Agrárias*. 2007;30(1):439-47.
14. Chouman K, Ponsano EHG, Michelin AF. Qualidade microbiológica de alimentos servidos em restaurantes self-service. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2010;69(2):261-6.
15. Cardoso RCV, Almeida RCC, Guimarães AG, Góes JAW, Santana AAC, Silva SA, et al. Avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos para consumo servidos em escolas atendidas pelo Programa Nacional de Alimentação Escolar. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2010;69(2):208-13.

## Leveduras isoladas de uvas *Vitis vinifera* L. cultivadas na região equatorial brasileira

### Yeasts isolated from *Vitis vinifera* L. grapes cultivated in Brazilian Equatorial region

RIALA6/1526

Mariana Oliveira ASSIS<sup>1</sup>, Maria Eugênia de Oliveira MAMEDE<sup>1\*</sup>, Aláise Gil GUIMARÃES<sup>1</sup>, Luíze Sales SANTOS<sup>2</sup>, Carlos Augusto ROSA<sup>3</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Departamento de Análises Bromatológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Rua Barão de Jeremoabo, s/n, Ondina, Salvador, BA, Brasil, CEP: 40170-115. Tel.: (71) 3283-6916. E-mail: mmamede@ufba.br

<sup>2</sup>Escola de Nutrição, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA

<sup>3</sup>Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG

Recebido: 31.07.2012 – Aceito para publicação: 22.11.2012

#### RESUMO

O Vale do Submédio São Francisco, localizado nos estados da Bahia e Pernambuco, é uma das regiões mais promissoras na produção de vinho no Brasil. É ainda desconhecida a possibilidade dessa região em produzir vinhos por fermentação espontânea e gerar produto com características típicas regionais. Neste estudo foram isoladas e identificadas as leveduras da superfície de uvas *Vitis vinifera* L. frescas, cultivadas na região do Vale do Submédio São Francisco, Brasil. Os isolados foram identificados pelas características morfofisiológicas, habilidade de crescimento em meio de cultura ágar L-lisina e identificação bioquímica, baseando-se em testes fisiológicos (habilidade de fermentação da glicose, assimilação de fontes de carbono e nitrogênio, osmotolerância e termotolerância). Sessenta isolados de leveduras foram obtidos no meio ágar extrato de malte-extrato de levedura (YM); e todos foram pertencentes ao grupo não-*Saccharomyces*. Por meio de testes fisiológicos, 20 dos 60 isolados não foram agrupados em nenhum gênero. 40 dessas leveduras foram sugestivamente identificadas como pertencentes ao gênero *Hanseniaspora* spp. Dessas 40 amostras, 17 receberam sugestiva identificação como pertencentes à espécie *Hanseniaspora guilliermondii*. Em conclusão, a microbiota da casca das uvas cultivadas nessa região é predominada por leveduras não *Saccharomyces*, especificamente *Hanseniaspora* spp.

**Palavras-chave.** identificação bioquímica, *Vitis vinifera* L., leveduras, *Hanseniaspora*, vale do submédio São Francisco.

#### ABSTRACT

The São Francisco Submid Valley is located in Bahia and Pernambuco states, and it is one of most promising regions for wine production in Brazil. It is still unknown the capability of this region in producing wine by spontaneous fermentation, and generating a product with typical regional characteristics. This study aimed at isolating and identifying the yeasts contaminating the peel of grapes *Vitis vinifera* L. cultivated in the Valley of the São Francisco Submid, Brazil. The isolates were identified based on morpho-physiological characteristics, growth ability in culture medium L-lysine agar, and biochemical identification by means of physiological tests (glucose fermentation ability, assimilation of carbon and nitrogen sources, osmotolerance and thermotolerance). Sixty yeasts isolates were detected on yeast extract-malt extract (YM) agar, and all of them belonged to non-*Saccharomyces* group. Physiological tests showed that 20 of 60 isolates did not grouped into any genera; and 40 isolates were suggestively identified as belonging to *Hanseniaspora* spp. Of 40 isolates, 17 were suggestively classified into *Hanseniaspora guilliermondii* species. The microbiota found on the grapes peel, grown in this region, is predominantly non-*Saccharomyces* yeasts, specifically *Hanseniaspora* spp.

**Keywords.** biochemistry identification, *Vitis vinifera* L., yeasts, *Hanseniaspora*, São Francisco submid valley.

## INTRODUÇÃO

O Vale do Submédio São Francisco está localizado entre 9° e 10° de latitude sul e é a região produtora de vinho mais próxima da linha do equador em todo o mundo. Atualmente, há nessa região uma área equivalente a 700 hectares de parreiras com cultivares que dão origem a aproximadamente 7 milhões de litros de vinho por ano, sendo 80 e 20% destinado à produção de vinho tinto e branco, respectivamente<sup>1</sup>.

Fleet<sup>2</sup> relata em sua revisão que há concorrência internacional no mercado do vinho; demandas dos consumidores por novos estilos de vinhos; preocupações crescentes sobre os impactos ambientais da produção de vinho e o que isto contribui para a busca de novos desafios para a inovação na tecnologia de produção de vinho.

A fermentação espontânea do vinho é um processo complexo que dá origem a diferentes compostos que definem a qualidade do produto. O processo de fermentação pode ser conduzido por leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*, sendo que o papel de diferentes linhagens de *Saccharomyces* na fermentação tem sido muito estudado<sup>3</sup>. Pesquisas têm sido realizadas no sentido de explorar o potencial das leveduras não-*Saccharomyces* na sua contribuição na formação do aroma e sabor do vinho, podendo dar origem a um produto diferenciado e com características específicas regionais<sup>4,5</sup>. Ganga e Martinez<sup>6</sup>, estudando a biodiversidade de leveduras indígenas na produção de vinho, identificaram leveduras não-*Saccharomyces* no processo de fermentação, verificando que estas apresentaram potencial para serem utilizadas em processos industriais de produção de vinhos.

Estudos demonstram que as leveduras apiculadas a exemplo da *Hanseniaspora uvarum* e sua forma anamórfica, *Kloeckera apiculata*, bem como a *Candida*, *Pichia*, *Rhodotorula* e *Kluyveromyces* são predominantes nas superfícies de uvas<sup>7</sup>.

A técnica convencional de identificação morfológica e bioquímica/fisiológica, quando realizada adequadamente, pode ser uma ferramenta útil e de alto grau de confiança. Essas análises podem ser empregadas para se chegar à conclusão em nível de gênero pelo agrupamento das leveduras<sup>8</sup>.

A produção de uvas fora das tradicionais zonas temperadas merece estudo, pois pode se mostrar com potencial para produção de vinhos típicos regionais e abrir oportunidades de desenvolvimento social,

econômico e tecnológico. Diante do exposto, nosso objetivo foi isolar e identificar leveduras, em nível de gênero, predominantes em uvas frescas cultivadas na região do Vale do Submédio São Francisco (BA/PE), visando à possibilidade da utilização destas em processos biotecnológicos e produção de vinho.

## MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia de Alimentos do Departamento de Análises Bromatológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia – UFBA em parceria com o Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

As amostras de uvas utilizadas foram de cultivares de uvas brancas e tintas das variedades *Vitis vinifera* L., cultivadas nos municípios de Casa Nova (Bahia), localizado a 380 metros de altitude, latitude Sul 09°05'00" e longitude 40°37'00"; Lagoa Grande (Pernambuco), a 361 metros de altitude, 8°59'47" de latitude Sul e longitude 40°16'18" e Santa Maria da Boa Vista (Pernambuco), localizado a 371 de altitude, latitude Sul 8°47'58" e longitude 39°49'39", compreendendo um raio de 200 km de distância entre os locais de coleta. As uvas tintas utilizadas foram: *Cabernet sauvignon* (18,8°Brix), *Syrah* (18,6°Brix), *Egiodolla* (19,6°Brix), *Tempranillo* (21,2°Brix) e *Mouvedre* (17,6°Brix), e as variedades brancas foram *Chenin Blanc* (20°Brix), *Petit verdot* (21°Brix) e *Itália* (17°Brix), totalizando 8 amostras.

Aproximadamente 2 kg de uva de cada cultivar foram coletados diretamente do vinhedo e armazenados em embalagens assépticas e transportadas em caixas térmicas à baixa temperatura. O período entre a coleta de amostra e as análises foi inferior a 24 horas.

De cada variedade foram retiradas 25g e adicionadas em 225 mL de água destilada estéril. Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas em *stomacher* Mc 1204 (Digital blender ITR) a 200 rpm por 2 min. Foi retirada uma alíquota de 0,1 mL e semeada com auxílio da alça de Drigalski em placas de Petri, em duplicata, contendo ágar extrato de malte-extrato de levedura (YM) (1% de glicose (Vetec); 2% de ágar bacteriológico (Acumedia); 0,5% de peptona (Acumedia); 0,3% de extrato de malte (Acumedia) e 0,3% de extrato de levedura (Acumedia), suplementadas com cloranfenicol (Himedia), na concentração 100 mg/L.

As placas foram incubadas invertidas em estufa BOD (Alfakit) à temperatura de 28 °C por 48 h. Uma em cada oito colônias de leveduras representativas de cada amostra foram selecionadas ao acaso<sup>9</sup>.

As colônias puras foram repicadas para tubos contendo ágar YM inclinado com adição de glicerina estéril (Vetec) e mantidas sob refrigeração (4 °C) por 30 dias, com repiques a cada 15 dias, para posterior identificação<sup>8</sup>.

Um total de 60 isolados de leveduras foi submetido à identificação de acordo com Kurtzman et al.<sup>8</sup>. Para discriminação rápida entre isolados *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*, foi verificada a habilidade do crescimento em meio de cultura seletivo ágar L-Lisina (1,17% de *Yeast Carbon Base*-YCB (Difco), 2% de ágar (Acumedia) com adição de 0,056% de lisina (Merk) e 0,001% de cloranfenicol (Himedia)). Para a identificação fisiológica, os isolados foram reativados em ágar YM por 24 h a 25 °C e, em seguida, realizada a suspensão celular em tubo contendo 5 mL de água destilada estéril. A concentração foi estimada baseando-se no cartão de Wickerham, no nível 3+ de densidade celular forte, equivalente a 10<sup>6</sup> UFC/mL<sup>9</sup>.

Os testes fisiológicos foram realizados com base na metodologia descrita por Yarrow<sup>10</sup>, seguindo as chaves taxonômicas de Kurtzman et al.<sup>8</sup>, utilizando como critério a assimilação de fontes de carbono e nitrogênio em condições de aerobiose; resistência/sensibilidade ao antifúngico ciclohexamida a 0,01%; osmotolerância utilizando 50% de glicose, 10% de NaCl; termotolerância em temperatura de 37 °C e 40 °C e habilidade em fermentar a glicose. As suspensões de leveduras foram inoculadas em placas de Petri contendo os meios de ágar YNB/ e ágar YCB/ (sem fonte de carbono e nitrogênio, respectivamente) como controle negativo. As avaliações referentes à assimilação de compostos como fontes de carbono e nitrogênio foram realizadas por um período máximo de 21 dias<sup>9</sup>.

A análise morfológica e o tipo de reprodução das leveduras isoladas, agrupadas por meio de testes fisiológicos, foi realizada a partir de culturas com crescimento de 48 a 72 h em placas de ágar YM e pela técnica de preparação a fresco entre lâmina e lamínula, sendo ambos observados em microscópio óptico (1.000 x)<sup>9</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as 60 leveduras isoladas apresentaram habilidade de desenvolvimento em meio ágar L-lisina, sendo assim identificadas como não-*Saccharomyces*.

Segundo Fleet<sup>3</sup>, o meio de cultura L-lisina empregado para o desenvolvimento de leveduras de origem enológica pode discriminá-las de forma rápida entre não *Saccharomyces* e *Saccharomyces*, pois esse meio não permite o crescimento de *Saccharomyces* devido à inabilidade desta em utilizar esse aminoácido como única fonte de nitrogênio.

Os isolados foram submetidos à identificação fisiológica, de forma a agrupá-los com base nas respostas dos testes bioquímicos<sup>8,10</sup> (Tabela 1). Dos 60 isolados classificados como não-*Saccharomyces*, 40 foram agrupados como pertencente ao gênero *Hanseniaspora* (dos isolados 1 ao 40).

Desse grupo de 40 leveduras, 17 (as de números 24 a 40 da Tabela 1) responderam de forma similar para a assimilação de compostos de carbono (glicose, celobiose, D-gluconato), nitrogênio (meio com lisina), em meio ausente de aminoácidos, à temperatura de 37 °C, em meio contendo ciclohexamida a 0,01% (resistência ao antifúngico nessa concentração). De acordo com a chave taxonômica utilizada, essas leveduras foram classificadas como espécie sugestiva de *Hanseniaspora guilliermondii* (anamorfo *Kloeckera apis*). Kurtzman et al.<sup>8</sup> constataram que *Hanseniaspora guilliermondii* se desenvolve à temperatura de 37 °C, diferenciando-se das demais leveduras. Embora as leveduras de números de 1 a 23 tenham crescido a 37 °C, característica esta do gênero *Hanseniaspora*, estas não responderam de forma similar aos demais testes fisiológicos citados acima, impossibilitando o seu agrupamento em um grupo específico quanto à espécie.

Estudos similares para identificação de leveduras por meio de testes bioquímicos/fisiológicos foram realizados por vários pesquisadores. Moreira et al.<sup>11</sup>, ao avaliarem as características fisiológicas da *H. guilliermondii* e da *H. uvarum* por meio de testes bioquímicos, revelaram que *H. guilliermondii* se desenvolveu à temperatura de 37 °C e em meio de cultivo contendo 0,01% de cicloheximida. Barata et al.<sup>12</sup> isolaram leveduras de uvas da cultivar Trincadeira preta e, por meio de testes fisiológicos de termotolerância, diferenciaram as leveduras *Hanseniaspora guilliermondii* da *H. uvarum* pelo seu crescimento em temperatura de 37 °C.

Li et al.<sup>13</sup> identificaram leveduras do gênero *Hanseniaspora* em uvas *Cabernet sauvignon* em fermentação espontânea de vinho, na China, e verificaram que estas permaneceram até o final da fermentação. Os autores consideraram esse resultado importante e



sugeriram maiores estudos sobre o papel dessas leveduras na qualidade do vinho.

Quanto à avaliação morfológica, as 40 leveduras agrupadas como *Hanseniaspora* apresentaram morfologia apiculada e reprodução assexuada por brotamento bipolar e estão de acordo com aqueles encontrados por Fleet<sup>3</sup>, que verificou que as leveduras apiculadas são predominantes nas superfícies de uvas maduras, em especial as do gênero *Hanseniaspora* (anamorfa de *Kloeckera*).

Segundo Bisson et al.<sup>5</sup>, a forma anamorfa da levedura (*Kloeckera*) é predominante em regiões de clima frio. Em 1998, Yarrow<sup>10</sup> observou que a predominância dos gêneros *Kloeckera* e *Hanseniaspora* está diretamente relacionada com a região e a altitude onde se localizam os vinhedos e concluiu que em regiões de altas altitudes há um maior domínio de *Kloeckera* e em baixas altitudes de *Hanseniaspora*. *Kloeckera apiculata* foi identificada em uvas da cultivar *Chardonnay*, proveniente da região da Serra Gaúcha (RS-Brasil)<sup>14</sup>, região que apresenta clima mais frio que o Vale do Submédio São Francisco. Os municípios localizados no Vale do Submédio São Francisco apresentam média altitude, 361 a 380 metros acima do nível do mar, portanto, devido às condições edofo-climáticas da região, houve uma predominância de leveduras do gênero *Hanseniaspora* nas uvas estudadas. Moreira et al.<sup>15</sup> verificaram que leveduras do gênero *Hanseniaspora* podem contribuir muito para a qualidade do vinho, pois produzem concentrações desejáveis de ésteres e ácidos graxos em fermentação espontânea. Esses autores sugerem que as *Hanseniaspora* podem produzir vinhos com características diferenciadas quando combinadas com *Saccharomyces cerevisiae*. Dessa forma, a predominância de *Hanseniaspora* nos cultivares do Vale do Submédio São Francisco pode contribuir para a produção de um vinho com características peculiares da região.

As 20 leveduras que não foram identificadas em gênero pelos testes fisiológicos poderão ser submetidas a técnicas moleculares como ampliação dos domínios D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA.

## CONCLUSÃO

A predominância de leveduras *Hanseniaspora* spp em uvas frescas cultivadas no Vale do Submédio São Francisco pode ter importante significado para a indústria vinícola local, na possibilidade de utilização durante a fermentação espontânea do vinho. Entretanto, estudos complementares de identificação molecular devem ser realizados para explorar a utilização de leveduras desse

gênero, assim como o estudo da contribuição dessas leveduras para o sabor e aroma do vinho.

---

## AGRADECIMENTOS

Às vinícolas Miolo, Rio Sol e Botticelli. Ao programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos – PGALI. À FAPESB, pelo apoio financeiro. Ao Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

---

## REFERÊNCIAS

1. Silva PC, Correia RC, Soares JM. Histórico e importância socioeconômica. In: Soares JM, Souza PC. A vitivinicultura no semiárido brasileiro. Brasília (DF)/Petrolina (PE): Embrapa Informação Tecnológica/Embrapa Semiárido; 2009. p.19-34.
2. Fleet GH. Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast*. 2008;8(7):979-95.
3. Fleet GH. Yeast interactions and wine flavour. *Int J Food Microbiol*. 2003;86(1-2):11-22.
4. Pretorius IS, Westhuizen Vaan-der JJ, Augustyn OPH. Yeasts biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African wine industry. *S Afr J Enol Vitic*. 1999;20(2):61-74.
5. Bisson LF, Waterhouse AL, Ebeler SEM, Walker A, Lapsley JT. The present and future of the international wine industry. *Nature*. 2002;418(6898):696-9.
6. Ganga MA, Martinez C. Effect of wine yeast monoculture practice on the biodiversity of non-Saccharomyces yeasts. *Int J Food Microbiol*. 2004;96(1):76-83.
7. Fleet GH, Heard GM. Yeast-growth during fermentation. In: Fleet GH. *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers; 1993. p. 27-54.
8. Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout J. *The Yeasts. A Taxonomic Study*. 5. ed. EUA: Elsevier Academic Press; 2011. 1873p.
9. Prado GMM, Castro MMS. Usinas de açúcar e álcool: estudos de leveduras e dos fatores que afetam a fermentação. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello; 1995.
10. Yarrow D. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In: Kurtzman CP, Fell JW. *The Yeasts. A Taxonomic Study*. 4. ed. Amsterdã: Elsevier Science BV; 1998. p.75-107.
11. Moreira N, Mendes F, Hogg T, Vasconcelos I. Alcohols, esters and heavy sulphur compounds production by pure and mixed cultures of apiculate wine yeasts. *Int J Food Microbiol*. 2005;103(3):285-94.
12. Barata A, Gonzalez S, Malfeito-Ferreira M, Querol A, Loureiro V. Sour rot-damaged grapes are sources of wine spoilage yeasts. *FEMS Yeast Res*. 2008;8(7):1008-17.
13. Li SS, Cheng C, Li Z, Chen JY, Yan B, Han BZ, et al. Yeast species associated with wine grapes in China. *Int J Food Microbiol*. 2010;138(1-2):85-90.
14. Mamede MEO, Pastore GM. Avaliação da produção dos compostos majoritários da fermentação de mosto de uva por leveduras isoladas da região da “Serra Gaúcha” (RS). *Cienc Tecnol Aliment*. 2004;24(3):453-8.
15. Moreira N, Pina C, Mendes F, Couto JA, Hogg T, Vasconcelos I. Volatile compounds contribution of *Hanseniaspora guilliermondii* and *Hanseniaspora uvarum* during red wine vinifications. *Food Control*. 2011;22:662-7.

## Elaboração e análise sensorial de pão caseiro com reduzido teor de cloreto de sódio e acrescido de condimentos como alternativa para pacientes hipertensos

Homemade bread prepared with reduced amount of NaCl and adding condiments as an alternative product for patients with hypertension and its sensory characteristics

RIALA6/1527

Janaina STEIN<sup>1</sup>, Helena de Oliveira Santos SCHMIDT<sup>2</sup>, Viviani Ruffo de OLIVEIRA<sup>2\*</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>2</sup>Curso de Nutrição, Departamento de Medicina Interna, Faculdade de Medicina (FAMED), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), R. Ramiro Barcelos, 2400, 4º andar, Porto Alegre, RS, Brasil, CEP: 90035-003. Tel.: (51) 3308-5122. E-mail: vivianiruffo@hotmail.com

<sup>1</sup>Curso de Nutrição, Centro Universitário Franciscano (UNIFRA), Santa Maria, RS, Brasil.

Recebido: 04.10.2012 – Aceito para publicação: 28.12.2012

### RESUMO

Neste estudo foram elaborados pães caseiros com baixo teor de cloreto de sódio e acrescido de condimentos, o qual foi avaliado quanto à aceitação. A presente investigação foi realizada seguindo-se o modelo experimental, com a participação de 50 avaliadores não treinados. Os aspectos sensoriais de três amostras elaboradas foram analisados utilizando-se escala hedônica, baseada nos pontos de 1 a 9 para os seguintes atributos: aparência, sabor, odor e textura. Observou-se diferença estatística significativa para o pão com adição de manjerição e cebola, o qual mostrou maior aceitação em todos os atributos. Para os atributos sensoriais avaliados, os condimentos enquadram-se como aceitáveis na sugestão dietoterápica, podendo ser utilizados como alternativas dietéticas, não apenas no tratamento de hipertensos, mas também para a população em geral e, ainda, promover melhor qualidade de vida por meio de inserção de hábitos alimentares saudáveis.

**Palavras-chave.** sal, condimentos, panificação, análise sensorial.

### ABSTRACT

The present study aimed at preparing condiment-added homemade breads and containing low amount of sodium, and also to evaluate their acceptance aspects. This study was performed as an experimental investigation, and the sensory parameters were evaluated by 50 non-trained tasters. The bread samples were prepared with reduced sodium contents and adding condiments, such as: basil, sage and onion, as an alternative. Three elaborated samples were analyzed on sensory characteristics by using an appropriate hedonic scale, based on the points from 1 to 9 for measuring the following attributes: appearance, flavor, odor and texture. The basil and onion-added breads showed statistically significant differences, and these samples demonstrated the highest acceptance in all of the sensorial attributes. According to the sensory characteristics, the condiments were well accepted as a dietotherapy approach and to be used as an alternative, not only for hypertension treatment, but also for the general population to promote better life quality by making use of healthful nourishment habits.

**Keywords.** salt, spices, bakery, sensory analysis.

## INTRODUÇÃO

A Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) é uma doença que compromete os vasos sanguíneos, coração, cérebro, olhos e pode causar comprometimento dos rins, ocorre quando a medida da pressão se mantém frequentemente acima de 140 por 90 mmHg<sup>1</sup>.

É uma doença de alta prevalência no Brasil, atingindo os jovens, os adultos e os idosos em aproximadamente 20% a 50%, respectivamente. São cerca de 17 milhões de portadores de hipertensão arterial, sendo que destes 35% possuem mais de 40 anos. Contudo, seu aparecimento está cada vez mais precoce, e estima-se que cerca de 4% das crianças e adolescentes também sejam portadoras. O reconhecimento do aumento da prevalência da hipertensão arterial na população jovem e de suas possíveis complicações na vida adulta tem implicações importantes para a prevenção de doenças crônicas, em especial as cardiovasculares<sup>2</sup>.

Essa doença geralmente é herdada dos pais em 90% dos casos, todavia há vários fatores que influenciam nos níveis de pressão arterial, entre eles o tabagismo, o etilismo, o estresse, a falta de atividade física, a obesidade, níveis elevados de colesterol e o elevado consumo de cloreto de sódio (NaCl)<sup>1</sup>.

Tanto na prevenção quanto no tratamento, as estratégias não farmacológicas adotadas estão baseadas nessas modificações do estilo de vida, tendo como uma das principais recomendações a redução da ingestão de cloreto de sódio<sup>3</sup>.

No caso dos pacientes já hipertensos, os hábitos alimentares devem incluir redução da quantidade de sal, retirada do saleiro da mesa, restrição de fontes industrializadas de sal, como molhos prontos, sopas em pó, embutidos, conservas, enlatados, congelados, defumados e salgados do tipo empanado, preferir condimentos como limão, salsa, cebola, alho, além de redução de alimentos altamente calóricos<sup>1</sup>.

Em 2011, o Ministério da Saúde também estabeleceu metas nacionais para redução do teor de sódio em alimentos. Para o pão francês, por exemplo, acordou-se uma redução progressiva de sal ao produto de 2% para 1,8% até o final de 2014, o que representará uma redução de 10% na quantidade de sódio no produto<sup>4</sup>.

Segundo os dados da Pesquisa de Orçamento Familiar (POF 2008-2009) do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o consumo *per*

*capita* do pão de sal foi de 53g/dia<sup>5</sup>. Dessa forma, pode-se inferir que o consumo diário do pão é um hábito da população brasileira, porém sabe-se que esse alimento contém um teor elevado de cloreto de sódio, pois uma unidade de pão francês (50 g) contém, aproximadamente, 320 mg de sódio. Segundo Silva et al.<sup>6</sup>, duas unidades suprem as necessidades diárias de cloreto de sódio, o que poderia ocasionar um aumento da pressão arterial.

Uma estratégia para auxiliar nessa redução de sal em pães seria a adição de condimentos. De acordo com Salgado e Campos<sup>7</sup>, os condimentos de origem vegetal há muitos anos são utilizados na alimentação humana com propósito de realçar o sabor e preservar os alimentos. Dentre os condimentos utilizados para ressaltar o sabor, pode-se destacar o manjeriço (*Ocimum basilicum* L.), a cebola (*Allium cepa* L.) e a sálvia (*Salvia officinalis* L.), que são vegetais populares e que há décadas vêm sendo estudados devido aos seus componentes antioxidantes<sup>8</sup>.

Em estudo realizado por Campos et al.<sup>3</sup>, a cebola ainda apresenta efeitos biológicos importantes, tais como aumento do fluxo urinário e redução da HAS. O efeito do extrato aquoso da cebola sobre o fluxo de água e eletrólitos em ratos Wistar foi avaliado por esse autor, o qual observou alterações da HAS.

Sendo assim, este estudo teve como objetivos elaborar formulações de pão caseiro com reduzido teor de cloreto de sódio e acrescido de condimentos, assim como avaliar a aceitação dos pães elaborados.

## MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo experimental, o qual foi conduzido no Laboratório de Técnica Dietética de um Curso de Nutrição do Centro Universitário Franciscano (UNIFRA). Para as formulações dos pães, os ingredientes foram adquiridos em um estabelecimento comercial da cidade de Santa Maria-RS.

### Elaboração dos pães

A formulação dos pães foi estabelecida através de testes preliminares para se avaliar qual proporção de cada condimento seria mais viável para ser adicionada aos pães com reduzido teor de cloreto de sódio. Três amostras foram elaboradas, na primeira utilizou-se apenas cloreto de sódio (Formulação Padrão), na segunda utilizou-se manjeriço e cebola desidratada (Formulação A) e na

terceira amostra manjericão e sálvia (Formulação B), além do reduzido teor de sódio dos pães.

Os pães foram elaborados de acordo com a formulação sugerida por Silva et al.<sup>6</sup> com adaptações, a fim de se adequar a formulação ao propósito do estudo. Na Tabela 1, encontram-se os ingredientes utilizados para a preparação dos pães.

**Tabela 1.** Formulação utilizada para elaboração dos pães com condimentos e diferentes teores de cloreto de sódio

Ingredientes	Formulação	Formulação	Formulação
	Padrão	A	B
Farinha de trigo (g)	1.000	1.000	1.000
Cloreto de sódio (g)	16	6	6
Manjericão (g)	-	4	4
Sálvia (g)	-	-	4
Cebola desidratada(g)	-	6	-
Água morna (mL)	480	480	480
Fermento biológico (g)	10	10	10
Óleo (mL)	240	240	240
Açúcar (g)	17	17	17
Ovos (g)	75	75	75

Os ingredientes dos pães foram pesados em balança digital da marca Glam®, modelo GL301, de carga máxima de 5.000 gramas e graduação de 1 g.

Os pães foram elaborados pelo método direto. Após todos os ingredientes serem misturados e sovados, foram levados para a primeira fermentação por cerca de 40 minutos em torno dos 21 °C de temperatura ambiente. Os pães foram modelados e colocados em forma retangular contendo proporções de 32 cm × 27 cm e levados a descansar por mais 50 minutos a 21 °C. Os pães foram postos para assar em forno a gás semi-industrial da marca Venâncio®, modelo Roma 110, com temperatura média (250 °C), por cerca de 50 minutos. Depois de assados, foram resfriados em temperatura ambiente por 15 minutos, desenformados e acondicionados para análise sensorial.

### Análise sensorial

Foi realizado um teste afetivo com 50 avaliadores não treinados de ambos os sexos, com idade entre 19 e 35 anos, estudantes e funcionários do Centro Universitário Franciscano (UNIFRA), onde cada avaliador realizou o teste de aceitação das três amostras de pães elaboradas.

Os avaliadores realizaram um teste de aceitabilidade utilizando a escala hedônica, ancorada

em seus extremos pelos termos “gostei muitíssimo” (9) e “desgostei muitíssimo” (1), a fim de se avaliar os atributos aparência, sabor, odor e textura. Todos os avaliadores receberam as 3 amostras, que foram oferecidas em pratos descartáveis brancos de 18 cm de diâmetro, codificados com algarismos de três dígitos aleatórios. Cada avaliador recebeu aproximadamente 25 g da amostra de cada pão sob temperatura ambiente, além da ficha para o teste de aceitação das amostras.

Além disso, os participantes receberam água mineral sem gás em copo plástico com capacidade de 50 mL para serem consumidos entre as amostras, a fim de limpar as papilas gustativas e retirar resquícios das amostras anteriores de modo que não interferisse na seguinte.

### Aspectos éticos

Os avaliadores receberam informações sobre a pesquisa, e como critério de inclusão do estudo todos os avaliadores deveriam ser consumidores de pão e não possuir alergia a algum componente das formulações dos pães, além de assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Centro Universitário Franciscano (UNIFRA), conforme a Resolução 196/96 do CNS/MS e somente executado mediante o protocolo de aprovação nº 329.2008-2.

### Análise estatística

Os resultados foram avaliados através de análise de variância e para a comparação das médias das amostras aplicou-se o teste de Friedman, utilizando-se um nível de significância de 5% de probabilidade de erro. Para análise dos dados foi utilizado o software estatístico STATISTICA versão 7.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise sensorial para o atributo textura as três amostras de pão não apresentaram diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ) entre si. No entanto, para os atributos aparência, sabor e odor, todas as amostras apresentaram diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre si. O pão elaborado com cebola desidratada e manjericão (pão A) apresentou média mais elevada para aparência (8,11), sabor (8,03) e odor (7,80) do que as médias do pão Padrão e do pão B.

**Tabela 2.** Escores médios dos atributos sensoriais dos pães (Padrão), pão elaborado com manjericão, cebola desidratada e reduzido teor de cloreto de sódio (pão A) e pão elaborado com manjericão, sálvia e reduzido teor de cloreto de sódio (pão B)

Atributos	Pão Padrão	Pão A	Pão B
Textura	7,66a ± 1,16	7,98a ± 1,06	7,50a ± 1,61
Aparência	7,68c ± 1,42	8,11a ± 1,39	7,76b ± 1,20
Sabor	7,37c ± 1,19	8,03a ± 1,67	7,09b ± 2,10
Odor	6,88c ± 1,54	7,80a ± 1,31	7,17b ± 1,74

Médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente  $p < 0,05$  pelo teste de Friedman.

Conforme a Tabela 2, o pão com manjericão e cebola desidratada (pão A) foi a amostra que mais agradou em todos os atributos, pois recebeu as maiores médias, enquanto o pão Padrão foi o que menos agradou nos atributos aparência (7,68), sabor (7,37) e odor (6,88), pois recebeu as menores médias. O pão A alcançou na escala hedônica para os atributos aparência e sabor médias acima de 8,0, o que representa “Gostei muito”, enquanto o pão Padrão e o pão B receberam para esses mesmos atributos médias acima de 7,0, indicando “Gostei regularmente”.

Apesar do cloreto de sódio ser responsável pelo fortalecimento da rede de glúten, formação da crosta crocante do pão, sabor e conservação do produto<sup>9</sup>, a sua redução não prejudicou o crescimento do pão e a sua qualidade sensorial. Além disso, merece ser ressaltado que em quantidade elevada, o NaCl inibe o desenvolvimento de leveduras, prejudica a fermentação do pão e contribui para uma maior ingestão de sódio na alimentação.

Os resultados deste trabalho corroboram com os de Kwiatkowski et al.<sup>10</sup>, no qual a cebola desidratada obteve melhor aceitação na elaboração do pão do que as outras amostras. Isto sugere que se pode modificar o sabor tradicional dos produtos de panificação com boa aceitação do consumidor.

Além disso, a restrição de sal na dieta é uma medida recomendada não apenas para hipertensos, mas para a população de modo geral. Tal orientação deve objetivar ingestão em torno de 5 g/dia de cloreto de sódio, como medida preventiva da HAS e, conseqüentemente, de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares<sup>11</sup>.

De acordo com Dallepiane<sup>12</sup>, uma preparação que apresente o flavor diferenciado através da utilização de um condimento poderá ter maior chance de ser aceita em dietas com restrição de sódio, diminuindo o uso de sal/dia, além de valorizar o sabor natural dos alimentos no preparo doméstico e no hábito do uso de saleiros na mesa dos brasileiros.

No estudo de Doyle<sup>13</sup>, constatou-se que por motivo de saúde as pessoas diminuem gradativamente o consumo de cloreto de sódio e se acostumam com uma quantidade reduzida nos seus alimentos dentro de alguns meses, além disso, esse autor também sugere a inserção de ervas aromáticas e especiarias. Monego e Maggi<sup>14</sup> também sugerem para pacientes hipertensos, como uma estratégia dietoterápica, a substituição do cloreto de sódio por temperos isentos de sódio, como limão, alho, cebola, cheiro verde, manjericão, entre outros.

Nakasato<sup>15</sup> ressalta que o cloreto de sódio é utilizado na conservação de alimentos, por isso alimentos industrializados contêm grande quantidade de sal e devem ser evitados. A substituição por temperos naturais, como alho, manjericão, gengibre, entre outros, parece saudável e os pacientes devem ser orientados a ler os rótulos na hora da compra e a adquirir aqueles com menor percentual de cloreto de sódio.

Os resultados obtidos neste estudo confirmam que a introdução de condimentos foi viável na elaboração de pães e sensorialmente promissora, podendo aumentar a adesão de hipertensos à dieta hipossódica, contribuindo positivamente para mudanças no estilo de vida, como formação de hábitos alimentares mais saudáveis de pessoas hipertensas ou não, além de sustentar a proposta do Ministério da Saúde através do Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas não Transmissíveis (DNCT) no Brasil.

## CONCLUSÃO

De acordo com os resultados pode-se concluir que as características sensoriais do pão caseiro elaborado com manjericão, cebola desidratada e reduzido teor de cloreto de sódio tiveram boa aceitação enquadrando-se nos padrões aceitáveis de qualidade e podendo ser sugerido como alternativa dietética ou como coadjuvante no tratamento medicamentoso do hipertenso.

## REFERÊNCIAS

1. Appel LJ, Brands MW, Daniels SR, Karanja N, Elmer PJ, Sacks FM. Dietary Approaches to Prevent and Treat Hypertension: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Hypertension*. 2006;47(2):296-308.
2. Araújo TL, Lopes MVO, Cavalcante TF, Guedes NG, Moreira RP, Chaves ES, et al. Análise de indicadores de risco para hipertensão arterial em crianças e adolescentes. *Rev Esc Enferm USP*. 2008;42(1):120-6.
3. Campos MTFS, Monteiro JBR, Ornelas APRC. Fatores que afetam o consumo alimentar e a nutrição do idoso. *Rev Nutr*. 2000;13(3):157-65.

4. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de Situação de Saúde. Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas não Transmissíveis (DNCT) no Brasil, 2011-2022. Série B. Textos Básicos de Saúde. Brasília (DF); 2011. 160p.
5. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de orçamentos familiares, 2008-2009. Despesas, Rendimentos e Condições de Vida. Rio de Janeiro; 2010.
6. Silva MEMP, Yonamine GH, Mitsui L. Desenvolvimento e avaliação do pão francês caseiro sem sal. *Braz. J. Food Technol*. 2003;6(2):229-36.
7. Salgado SML, Campos VP. Ecloração e mortalidade de *Meloidogyne exigua* em extratos e em produtos naturais. *Fitopatol Bras*. 2003;28(2):166-70.
8. Bueno AL, Czepielewski MA. Micronutrientes envolvidos no crescimento. *Rev HCPA*. 2007;27(3):47-56.
9. Miller RA, Hoseney RC. Role of salt in baking. *Cereal Foods World*. 2008;53:4-6.
10. Kwiatkowski A, Alves APF, Davanco GE, Santos BC. Avaliação das características sensoriais de pães formulados com abóbora (*Cucurbita moschata* Duch.) da variedade paulista e de cebola (*Allium cepa* L.). In: II Congresso Científico da Região Centro-Ocidental do Paraná. Paraná; maio 2007.
11. Sociedade Brasileira de Cardiologia/Sociedade Brasileira de Hipertensão/Sociedade Brasileira de Nefrologia. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. *Arq Bras Cardiol*. 2010;95(1):1-51.
12. Dallepiane LB. Efeito do uso de condimentos e da participação da família na adesão à restrição de sódio em um grupo de hipertensos [tese de doutorado]. Porto Alegre (RS): Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2004.
13. Doyle ME. Sodium reduction and its effects on food safety. *Food Quality and Human Health*. Food Research Institute. Madison: University of Wisconsin; 2008.
14. Monego ET, Maggi C. Gastronomia na promoção da saúde dos pacientes hipertensos. *Rev Bras Hiperten*. 2004;11(2):105-8.
15. Nakasato M. Sal e hipertensão arterial. *Rev Bras Hiperten*. 2004;11(2):95-7.

# Avaliação das características físico-químicas e microbiológicas dos componentes fibrosos obtidos da moagem úmida de grãos de milho

## Physical-chemical and microbiological characteristics of fibrous components obtained from corn wet milling

RIALA6/1528

Camila Mattos ROCHA-OLIVIERI<sup>1</sup>\*, Ana Carolina CONTI-SILVA<sup>2</sup>, José Francisco LOPES-FILHO<sup>3</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Laboratório de Bioquímica e Propriedades Funcionais dos Alimentos, Departamento de Nutrição, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, Avenida Dr. Arnaldo, 715, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 01246-904. Tel.: (11) 3061-7705. E-mail: camilamattosrocha@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Laboratório de Análise Sensorial, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto, SP, Brasil.

<sup>3</sup>Laboratório de Moagem Úmida, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto, SP, Brasil.

Recebido: 02.10.2012 – Aceito para publicação: 28.12.2012

### RESUMO

As fibras são materiais não digeríveis pelo organismo humano e insolúveis em condições específicas. A fibra do milho tem sido utilizada como componente alternativo para enriquecer produtos alimentícios destinados ao consumo humano, com o intuito de agregar valor a esse coproduto. No presente estudo foram determinadas as características químicas e as frações componentes de fibras de milho, extraídas por moagem úmida, em laboratório (FLab), e moagem semiúmida, em processo industrial (FInd); neste último produto foi realizada análise microbiológica. A composição das fibras diferiu estatisticamente entre ambas as amostras ( $p < 0,05$ ) quanto aos teores de umidade, cinzas, lipídeos, proteínas, fibra alimentar insolúvel, fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), celulose e lignina. A amostra FInd demonstrou parâmetros microbiológicos em conformidade com as especificações adequadas para o consumo. As fibras de milho estudadas podem contribuir efetivamente para o aumento do aporte de fibras na dieta alimentar. Em vista da fibra obtida pelo FInd ter demonstrado parâmetros microbiológicos em conformidade com as especificações para alimentos, esse componente poderá ser incorporado na formulação de produtos alimentícios.

**Palavras-chave.** coproduto, fibra alimentar, milho, moagem úmida.

### ABSTRACT

Fibers are non-digestible materials by human organism, and they are insoluble in specific conditions. The corn fiber has been used as an alternative to enrich the food products for human consumption, in order to add nutritious value to this co-product. This study aimed at determining the chemical and fractions components of corn fiber, extracted by semi-wet milling in laboratory (LabF), and by semi-humid milling in industrial process (IndF); and microbiological analyses were performed in the last fraction. The fiber composition differed significantly among these two products as to moisture, ash, lipids, proteins, insoluble dietary fiber, neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF), cellulose and lignin contents. The sample IndF showed microbiological parameters in compliance with the specifications for consumption. The investigated corn fiber may effectively contribute to increase the fiber intake in the diet. As the industrially processed fiber (IndF) showed compliant microbiological parameters with the specifications for food, this component might be incorporated into the food products formulation.

**Keywords.** co-products, corn, dietary fiber, wet milling.

## INTRODUÇÃO

O milho é um produto agrícola largamente utilizado na alimentação humana e animal, consistindo uma importante fonte energética para o homem. Durante seus processos de industrialização, conserva sua casca, que é rica em fibras, fundamental para a eliminação das toxinas do organismo humano. Além das fibras, o grão de milho é constituído de carboidratos, proteínas, vitaminas (complexo B), minerais (ferro, fósforo, potássio, cálcio) e óleo<sup>1</sup>.

A moagem úmida do milho envolve transformações químicas, bioquímicas e operações mecânicas, com o objetivo de separar o grão em frações relativamente puras, chamados de coprodutos da moagem, que são o germe, amido, fibra e glúten. A fibra e o glúten, devido ao baixo valor, vêm sendo utilizados basicamente em formulações para ração animal<sup>2,3</sup>.

A American Association of Cereal Chemistry<sup>4</sup> definiu fibra alimentar como sendo a “parte comestível de plantas ou carboidratos análogos, que são resistentes à digestão e absorção no intestino delgado, com fermentação completa ou parcial no intestino grosso. Incluem também polissacarídeos, oligossacarídeos, lignina e substâncias associadas a vegetais”.

Estudos epidemiológicos indicam a relação entre a ausência de fibras na dieta e muitas doenças como câncer de cólon, diabetes, hipercolesterolemia, diverticulite, constipação intestinal, obesidade e cálculos biliares. Dentre os efeitos benéficos das fibras, podemos citar o prolongamento do tempo de esvaziamento gástrico, diminuição do nível de glicose sérica, aumento da taxa de excreção de ácidos biliares, aumento do peso fecal e da sua capacidade de ligação à água<sup>5,6</sup>.

A elaboração de produtos utilizando os coprodutos da moagem do milho que possuem menor valor agregado permitirá melhor aproveitamento e melhores alternativas de uso. Para tanto, é necessário conhecer suas características químicas e higiênico-sanitárias.

Os objetivos deste estudo foram obter a composição química da fibra do milho, determinar suas frações componentes em termos de fibra alimentar total, fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), celulose e lignina, além da verificação da qualidade microbiológica do produto.

## MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi conduzida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do IBILCE/UNESP, com protocolo de aprovação nº 0028.0.229.000-09.

Foi utilizada para realização das análises, a fibra de milho fornecida por indústria de processamento (FInd) (Corn Bran Flour-R<sup>®</sup>) e comparando-se os resultados com a fibra de milho extraída por processo de moagem úmida em laboratório (FLab). Ambas foram moídas em moinho de discos para cereais e peneiradas em peneira com abertura de 25 mesh (0,71 mm), para padronização da granulometria.

Para a composição centesimal, realizaram-se as análises de umidade, proteínas, lipídeos, cinzas, de acordo com metodologias propostas pela AOAC<sup>7</sup> e carboidratos disponíveis estimados por diferença. A fibra alimentar solúvel e insolúvel foi determinada pelo método enzimático gravimétrico proposto por Prosky et al.<sup>8</sup>, no qual é realizada digestão enzimática sequencial de  $\alpha$ -amilase termoestável, protease e amiloglicosidase em tampão fosfato, sendo a fibra alimentar total obtida pela soma das frações insolúvel e solúvel. Para determinação das frações da fibra (FDN, FDA, celulose, hemicelulose e lignina), utilizou-se a metodologia proposta por Van Soest e Wine<sup>9</sup>, método utilizado para determinar, em uma amostra de alimento, o resíduo resultante da extração durante 60 minutos em solução em ebulição de detergente neutro e detergente ácido.

A análise microbiológica da FInd foi realizada de acordo com a legislação vigente para farelo e fibras de cereais, RDC nº 12/2001<sup>10</sup>, e seguiu-se metodologia recomendada por Silva et al.<sup>11</sup>. Foi realizado o monitoramento dos bioindicadores coliformes totais e termotolerantes a 45 °C/g, dos micro-organismos *Salmonella* spp./25g, *Bacillus cereus*/g, além da pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positiva, que não é preconizada pela legislação RDC, mas foi analisada por medida de precaução, devido ao fato de ser um produto processado manualmente.

### Análise estatística dos dados

Os dois tipos de fibras (FInd e FLab) foram avaliados e comparados um com o outro. Três repetições foram tratadas como blocos, e as médias dos dados da análise química e das frações das fibras foram comparadas pelo teste *t* de Student. As diferenças foram consideradas significativas para  $p < 0,05$ . Todas as análises foram realizadas com o programa Minitab<sup>R</sup>, versão 16.1.0.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observado que a umidade das fibras (FInd = 8,9 e FLab = 9,9) (Tabela 1) diferiu significativamente, sendo obtidos valores superiores ao encontrado por Noureddini e Byun<sup>12</sup>, que observaram 5,3% para fibra de milho industrial. As diferenças entre os valores devem-se, provavelmente, às condições diferentes de temperatura e umidade relativa durante o armazenamento para cada amostra.

**Tabela 1.** Composição centesimal (média ± desvio padrão) de fibras de milho obtidas do processamento industrial e de fibras extraídas por moagem úmida em laboratório

Componente	Fibra de milho industrial (FInd)	Fibra de milho de laboratório (FLab)
Umidade (%)	8,9 ± 0,03 <sup>b</sup>	9,9 ± 0,12 <sup>a</sup>
Cinzas (%)	1,6 ± 0,13 <sup>a</sup>	0,6 ± 0,06 <sup>b</sup>
Lipídeos (%)	3,6 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,9 ± 0,02 <sup>b</sup>
Proteínas (%)	6,1 ± 0,09 <sup>b</sup>	12,2 ± 0,16 <sup>a</sup>
Fibra alimentar total <sup>1</sup> (%)	82,1	50,6
Fibra alimentar insolúvel (%)	81,8 ± 2,21 <sup>a</sup>	50,5 ± 1,35 <sup>b</sup>
Fibra alimentar solúvel (%)	0,2 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,1 ± 0,00 <sup>a</sup>
Carboidratos disponíveis <sup>2</sup> (%)	6,6	35,7

Resultados expressos em base seca (g.100 g<sup>-1</sup>), exceto a umidade, expressa em base úmida. <sup>1</sup>Determinada pela somatória das fibras alimentares solúvel e insolúvel, por isso não apresenta o teste de comparação de médias. <sup>2</sup>Determinados por diferença. <sup>a, b</sup>Médias seguidas de letras diferentes, em cada linha, diferem entre si pelo Teste *t* de Student ( $p \leq 0,05$ ).

A fibra de milho extraída em laboratório apresentou maior teor proteico (12,2%) do que a industrial (6,1%) ( $p < 0,05$ ). Essa diferença está relacionada com o processo artesanal de extração em laboratório, de modo que na separação das frações permanece um residual de outros componentes na porção fibrosa. Tanto o conteúdo proteico da amostra industrial quanto o da fibra de laboratório foram superiores ao encontrado por Paes<sup>13</sup>, que verificou 2,6% de proteínas em pericarpo de milho. Além da contaminação residual de outros coprodutos (como a proteína) nessas frações em função do método de separação dos componentes, a fibra industrial (FInd) pode apresentar, também, partes do endosperma e camada de aleurona, ricas em proteínas e enzimas, que desempenham papel importante no processo de germinação<sup>1</sup>.

O teor mineral para FLab foi de 0,6%, evidenciando que em torno de 37% dos minerais do grão

encontram-se na porção fibrosa. O teor mineral de cereais é influenciado pelas condições de cultivo, incluindo fertilização e condições do solo, e de processamento<sup>15</sup>. Assim, a composição dos produtos derivados do milho depende de quais partes do grão os produtos incluem. O maior teor de cinzas encontrado para a fibra industrial (1,6%) pode ser também reflexo da incorporação da camada de aleurona, que se situa logo abaixo do pericarpo, e parte do gérmen, onde os minerais são mais concentrados.

A porcentagem de lipídeos (3,6%) na FInd diferiu significativamente do teor de FLab (0,9%), como pode ser observado na Tabela 1. As principais razões dessa diferença provavelmente estejam relacionadas ao método de obtenção da fibra industrial, normalmente realizada por moagem semiúmida e nas diferentes características genótípicas das matérias-primas, além da possível incorporação, durante o processo de moagem, de parte do gérmen e camada de aleurona, que possuem maiores teores de lipídeos.

Quanto aos teores de fibra alimentar total, as amostras diferiram significativamente entre si (FInd = 82,1% e FLab = 50,6%). Para a fibra insolúvel, as amostras também diferiram (FInd = 81,8% e FLab = 50,5%). Os resultados para fibra solúvel foram estatisticamente iguais (FInd = 0,2% e FLab = 0,1%). O conteúdo de fibra alimentar insolúvel foi predominante em relação ao de fibra alimentar solúvel, tanto na FInd quanto na FLab. Esses achados corroboram com resultados encontrados por Cherbut et al.<sup>14</sup>, que verificaram somente fibra insolúvel em farelo de milho.

Com esses dados, verifica-se que a fibra alimentar das amostras em estudo (FInd e FLab) é composta quase que em sua totalidade de fibra insolúvel. As variações observadas em relação à fibra alimentar solúvel, insolúvel e total nas FInd e FLab podem ser justificadas por fatores associados à variedade genética, condições ambientais e a própria estrutura do grão de milho de onde foram extraídas as fibras, o que influencia de forma significativa a composição do grão.

Com relação à composição das frações componentes da fibra (Tabela 2), tem-se a fração FDN constituída por celulose, hemicelulose, lignina e proteína lignificada, e a fração FDA, que corresponde à porção menos digerível da parede celular, constituída na sua quase totalidade de lignocelulose, ou seja, celulose e lignina.

**Tabela 2.** Composição das frações componentes (média  $\pm$  desvio padrão) de fibra de milho industrial, fibra de milho extraída em laboratório e fibra de milho (dados de literatura)\*

Composição	Fibra de milho industrial <sup>3</sup> (FInd)	Fibra de milho de laboratório (FLab)	Fibra de milho industrial*
FDN <sup>1</sup> (%)	85,6 $\pm$ 3,09 <sup>a</sup>	64,8 $\pm$ 4,15 <sup>b</sup>	-
FDA <sup>2</sup> (%)	5,8 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	11,7 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>	-
Hemicelulose** (%)	66,8	53,1	38,8 $\pm$ 0,4
Celulose (%)	7,6 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	3,1 $\pm$ 0,43 <sup>b</sup>	13,0 $\pm$ 0,2
Lignina (%)	6,8 $\pm$ 0,13 <sup>b</sup>	10,7 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	7,5 $\pm$ 0,3

\*Fonte: Nouredini; Byun, 2010. <sup>1</sup>Fibra em detergente neutro. <sup>2</sup>Fibra em detergente ácido. <sup>3</sup>Corn Bran Flour-R'. \*\*Determinada por diferença por isso não apresenta o teste de comparação de médias. <sup>a</sup> <sup>b</sup>Médias seguidas de letras diferentes, em cada linha, diferem entre si pelo teste *t* de Student ( $p \leq 0,05$ ).

Pela metodologia usada na determinação da FDN, foi possível separar o conteúdo intracelular, ou constituintes solúveis, da fração correspondente aos constituintes da parede celular, formada basicamente de celulose, hemicelulose, lignina e proteína lignificada. Verificou-se que as amostras diferiram significativamente quanto às frações FDN e FDA e também quanto aos teores de celulose e de lignina.

Houve predominância dos constituintes da parede celular (fração insolúvel) na fibra derivada do processo industrial (FInd) e na fibra derivada da moagem úmida em laboratório (FLab). FInd apresentou 85,6% da fração de constituintes da parede celular, enquanto em FLab o teor foi menor: 64,8%. Esses resultados são similares aos de Blanco-Metzler et al.<sup>15</sup>, que encontraram predominância da fração insolúvel (24%) em fibra de milho industrial.

Assim, a partir da porcentagem dos constituintes da parede celular (FDN) e (FDA) do material analisado, foi calculada a fração de hemicelulose, pela diferença entre as frações. FInd apresentou maior teor de hemicelulose (66,8%) comparada com a FLab (53,1%).

Ainda na Tabela 2, pode ser observado que o percentual de hemicelulose encontrado foi maior do que o de celulose e lignina, nas amostras de FInd e FLab, assim como também reportado por Nouredini e Byun<sup>12</sup>.

Os resultados das análises microbiológicas mostraram que os parâmetros encontram-se dentro dos limites permitidos pelo Padrão Federal<sup>10</sup> para cada tipo de micro-organismo analisado, ou seja, todas as amostras estavam com contagens abaixo do máximo estabelecido pela legislação vigente. Verificou-se para *Staphylococcus aureus* (ou coagulase positiva), que foi analisado por razões de segurança sanitária devido à manipulação do produto, um valor de  $< 100$  Unidades Formadoras de

Colônia por grama (UFC/g) de amostra analisada. Para coliformes totais,  $< 3$  Número Mais Provável por grama (NMP/g) de amostra analisada, mas a resolução não estabelece padrão para esses micro-organismos nesse tipo de amostra. Já para os coliformes termotolerantes, verificou-se  $< 3$  NMP/g e o valor de referência permitido seria de até  $5 \times 10^2$  NMP/g. Com relação à *Escherichia coli*, notou-se ausência deste micro-organismo, mas a resolução também não estabelece padrão para estes nesse tipo de amostra. Observou-se ainda ausência de *Salmonella* spp., e o valor de referência permitido é a ausência em 25 g de amostra, e, finalmente, encontrou-se  $< 100$  UFC/g de *Bacillus cereus*, sendo o valor de referência permitido de até  $5 \times 10^3$  UFC/g de amostra analisada.

Assim, verifica-se que as condições higiênicas sanitárias da matéria-prima, do seu processamento e da sua estocagem são satisfatórias, permitindo o seu uso para a incorporação em produtos alimentícios, tais como barras de cereais.

## CONCLUSÃO

As fibras de milho FInd e FLab estudadas podem contribuir efetivamente para o aporte de fibras na dieta alimentar, com predominância dos constituintes da parede celular, ou seja, fração insolúvel. São fontes de proteínas, lipídios e fibra alimentar, e por serem ricas em fibra são consideradas produtos funcionais e, assim, podem ser utilizadas na alimentação humana. A amostra analisada de FInd apresentou parâmetros microbiológicos dentro das especificações, podendo ser utilizada para a incorporação em produtos alimentícios, sem acarretar prejuízos higiênico-sanitários ao consumidor.

## AGRADECIMENTOS

À Capes, pela bolsa de estudos, e à “Integrada Cooperativa Agroindustrial”, por ceder o produto “Corn Bran Flour-R” para as análises.

## REFERÊNCIAS

1. Watson SA. Structure and Composition. *In*: White P, Johnson LA, orgs. Corn: Chemistry and Technology. St. Paul: American Association of Cereal Chemists; 1991. p. 53-82.
2. Singh N, Eckhoff SR. Wet milling of corn – a review of laboratory – scale and pilot plant – scale procedures. *Cereal Chem*. 1996;73(6):659-67.

3. Rose DJ, Inglett GE, Liu SX. Utilization of corn (*Zea mays*) bran and corn fiber in the production of food components. *J Sci Food Agric*. 2010;90(6):915-24.
4. AACC. American Association of Cereal Chemists. AACC Report. Dietary fiber technical committee. The definition of dietary fiber. *Cereal Foods World*. 2001;46(3):112-26.
5. Trowell H, Burkitt D, Heaton K. Dietary fibre, fibre-depleted foods and disease. London: Academic Press; 1985.
6. Stewart ML, Nikhanj SD, Tim DA, Thomas W. Evaluation of the effect of four fibers on laxation, gastrointestinal tolerance and serum markers in healthy humans. *Ann Nutr Metab*. 2010;56(2):91-8.
7. AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the association of analytical chemistry. 12. ed. Washington (DC); 1992.
8. Prosky L, Asp NG, Schweizer TE, De Vries JW, Furda I. Determination of insoluble, soluble and total dietary fiber in foods and food-products – Interlaboratory study. *J AOAC*. 1988;71(5):1017-23.
9. Van Soest PJ, Wine RH. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. 4. Determination of plant cell wall constituents. *J AOAC*. 1967;50:50-5.
10. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos e seus anexos I e II. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília (DF); 10 jan 2001; Seção 1(7-E):45.
11. Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos. São Paulo: Varela; 2001.
12. Nouredini H, Byun J. Dilute-acid pretreatment of distillers' grains and corn fiber. *Biores Technol*. 2010;101:1060-7.
13. Paes MCD. Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do Grão de Milho. Circular Técnica, 75. Sete Lagoas (MG): Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Embrapa; 2006.
14. Cherbut C, Aube AC, Mekki N, Dubois C, Lairon D, Barry JL. Digestive and metabolic effects of potato and maize fibres in human subjects. *Br J Nutr*. 1997;77:33-46.
15. Blanco-Metzler A, Montero CMA, Fernández PM. Chemical composition of food products derived from wheat and corn produced in Costa Rica. *Arch Latinoam Nutr*. 2000;50:91-6.

## Avaliação da qualidade microbiológica e nutricional de salsichas tipo *hot dog*

### Evaluation of the microbiological and nutritional quality of hot dog sausage

RIALA6/1529

Débora Francielly de OLIVEIRA<sup>1\*</sup>, Alexandre Rodrigo COELHO<sup>2</sup>, José Francisco SILVEIRA JUNIOR<sup>1</sup>, Francieli BRAGHINI<sup>2</sup>, Claudia Eugênia Castro BRAVO<sup>2</sup>, Ivane Benedetti TONIAL<sup>1</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Laboratório de Química de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Rua Porto Alegre, 909, Bairro Alvorada, Francisco Beltrão, PR, Brasil, CEP: 85480-070. Tel.: (46) 3523-7111. E-mail: deborafolhe@hotmail.com

<sup>2</sup>Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Francisco Beltrão, PR, Brasil

Recebido: 11.09.2012 – Aceito para publicação: 28.12.2012

#### RESUMO

A busca por alimentos de preparo rápido e fácil, e ao mesmo tempo com potencial nutritivo adequado, tem favorecido a industrialização e o aumento do consumo de produtos cárneos emulsionados, entre eles, a salsicha. Com o objetivo de avaliar a qualidade desses produtos, foram realizadas análises físico-químicas e microbiológicas em amostras de salsichas de diferentes marcas comercializadas a granel. Das amostras analisadas, 58,33% mostraram contagem para *Staphylococcus* coagulase positiva acima do limite permitido pela legislação vigente. Nos exames físico-químicos, em 50% das marcas analisadas foram detectados teores de proteína, de carboidratos totais e de amido em discordância com os valores estabelecidos pela legislação. Foi também constatado que 25% das marcas demonstraram conteúdo de gordura acima do permitido.

**Palavras-chave.** produto cárneo emulsionado, *Staphylococcus* coagulase positiva, saúde pública.

#### ABSTRACT

Demanding for foods of rapid and easy preparation, and also with adequate nutritional potential has favored to increase the consumption and the industrialization of emulsified meat product and among them the sausage. Aiming at assessing the quality of these products, the physical-chemical and microbiological analyses were performed in different brands of sausages commercialized in bulk. Of the analyzed samples, 58.33% showed coagulase positive *Staphylococcus* counting higher than the limit allowed by the legislation in force. The physical-chemical analysis showed that in 50% of tested sausage brands the protein, total carbohydrates and starch contents were in disagreement with the values established by the legislation. It was also found that 25.00% of the analyzed brand showed the fat contents above the permitted values.

**Keywords.** emulsified meat product, coagulase positive *Staphylococcus*, public health.

## INTRODUÇÃO

Na atualidade, em função da escassez do tempo, é cada vez mais evidente a busca por alimentos de preparo rápido<sup>1</sup>. Esse contexto tem favorecido a industrialização e o consumo de produtos alimentícios que não demandem muito tempo de preparo. Prova disso, os produtos cárneos industrializados tornaram-se opção crescente entre a população<sup>2</sup>.

A salsicha tipo hot-dog destaca-se como um dos produtos cárneos emulsionados mais populares<sup>3</sup>, representando um importante segmento das carnes industrializadas. Segundo Datamark<sup>4</sup>, o volume de salsichas produzidas no Brasil no ano de 2008 atingiu 511.196 toneladas, e estima-se que em 2013 a produção atinja 701.140 toneladas.

Devido à demanda do consumidor, é comum encontrar salsichas sendo comercializadas na forma a granel. No entanto, condições inadequadas de armazenamento durante a sua distribuição e comercialização podem interferir de forma negativa na qualidade microbiológica desses produtos, podendo provocar toxinfecções alimentares em seus consumidores, e assim, se constituindo em um problema de saúde pública.

O presente estudo objetivou avaliar a qualidade microbiológica e físico-química de salsichas tipo hot-dog comercializadas a granel.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas e analisadas 24 amostras de diferentes marcas de salsichas conhecidas nacionalmente e comercializadas em mercado varejista da região sudoeste do Paraná. No momento da coleta das amostras, considerou-se um período de dez dias após a fabricação das salsichas.

Com o intuito de avaliar se as amostras atendiam aos requisitos físico-químicos preconizados pela legislação<sup>5</sup>, as mesmas foram analisadas quanto aos teores de umidade, cinzas e proteína total<sup>6</sup>. Os lipídios totais foram extraídos segundo método proposto por Bligh e Dyer<sup>7</sup>, e os teores de carboidratos obtidos por diferença entre 100% e a soma dos percentuais de umidade, cinzas, proteínas e lipídios totais<sup>8</sup>. Os teores de amido foram determinados conforme preconizado na Instrução Normativa nº 20/1999 do Ministério da Agricultura e do Abastecimento<sup>9</sup>. O valor calórico foi obtido pela somatória dos teores de carboidratos e proteínas, multiplicados por quatro, e de lipídeos,

multiplicados por nove. O teor de extrato seco total foi obtido pela soma dos percentuais de cinzas, proteína, lipídios e carboidratos, sendo a determinação do teor de gordura no extrato seco realizada por modo indireto, considerando a razão entre o teor de gordura e o teor de extrato seco total das salsichas.

As análises microbiológicas foram realizadas assim que as amostras chegaram aos laboratórios da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Francisco Beltrão. Para a determinação de coliformes termotolerantes, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Salmonella* sp., seguiu-se a metodologia definida pela Instrução Normativa do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento nº 62/2003<sup>10</sup>.

Os resultados das análises físico-químicas foram submetidos aos cálculos de média, desvio padrão e Análise de Variância (ANOVA), sendo posteriormente aplicado teste de Tukey, ao nível de 5% de significância, na comparação das médias<sup>11</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados físico-químicos das amostras de salsichas analisadas estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Composição centesimal e parâmetros físico-químicos de salsichas comercializadas a granel

Parâmetros	Marcas de Salsichas			
	A	B	C	D
Umidade (%)	62,12 ± 0,04 <sup>a</sup> CV(%) 0,06	49,71 ± 0,05 <sup>b</sup> CV(%) 0,10	49,75 ± 0,22 <sup>b</sup> CV(%) 0,44	59,88 ± 0,02 <sup>c</sup> CV(%) 0,03
Cinzas (%)	3,09 ± 0,01 <sup>a</sup> CV(%) 0,32	3,14 ± 0,03 <sup>a</sup> CV(%) 0,95	3,21 ± 0,02 <sup>b</sup> CV(%) 0,62	2,39 ± 0,04 <sup>c</sup> CV(%) 1,67
Proteínas (%)	12,15 ± 0,04 <sup>a</sup> CV(%) 0,33	11,97 ± 0,16 <sup>a</sup> CV(%) 1,34	9,22 ± 0,04 <sup>b</sup> CV(%) 0,43	12,08 ± 0,08 <sup>a</sup> CV(%) 0,66
Lipídios (%)	17,04 ± 0,19 <sup>a</sup> CV(%) 1,11	28,09 ± 0,15 <sup>b</sup> CV(%) 0,53	31,08 ± 0,09 <sup>c</sup> CV(%) 0,29	18,57 ± 0,09 <sup>d</sup> CV(%) 0,48
Carboidratos (%)	5,59 ± 0,01 <sup>a</sup> CV(%) 0,18	7,08 ± 0,02 <sup>b</sup> CV(%) 0,28	6,78 ± 0,01 <sup>c</sup> CV(%) 0,15	7,09 ± 0,02 <sup>b</sup> CV(%) 0,28
Amido (%)	1,23 ± 0,01 <sup>a</sup> CV(%) 0,81	2,08 ± 0,02 <sup>b</sup> CV(%) 0,96	1,14 ± 0,01 <sup>a</sup> CV(%) 0,88	2,66 ± 0,02 <sup>c</sup> CV(%) 0,75
Extrato seco total	37,87 ± 0,01 <sup>a</sup> CV(%) 0,03	50,28 ± 0,01 <sup>a</sup> CV(%) 0,02	50,29 ± 0,01 <sup>a</sup> CV(%) 0,02	40,13 ± 0,01 <sup>a</sup> CV(%) 0,02
GES	44,99 ± 0,01 <sup>a</sup> CV(%) 0,02	55,87 ± 0,01 <sup>a</sup> CV(%) 0,02	61,80 ± 0,11 <sup>a</sup> CV(%) 0,18	46,27 ± 0,09 <sup>a</sup> CV(%) 0,19
Valor calórico	224,32 ± 0,11 <sup>a</sup> CV(%) 0,05	328,77 ± 0,14 <sup>a</sup> CV(%) 0,04	343,72 ± 0,02 <sup>a</sup> CV(%) 0,04	247,41 ± 0,01 <sup>a</sup> CV(%) 0,01

Os resultados são médias de 18 replicatas com as respectivas estimativas do desvio padrão. Valores na mesma linha seguidos de letras iguais não diferem entre si ( $p > 0,05$ ). [Análise de variância – ANOVA e Teste de Tukey]. CV = coeficiente de variação = (desvio padrão/média) x 100.

Os resultados das análises físico-químicas demonstraram que todas as amostras referentes à marca A se apresentaram em conformidade com a legislação pertinente. Em contrapartida, a marca B, por ter apresentado valores médios acima de 7,00% para carboidratos totais e 2,00% para amido, apresentou-se em desacordo com os valores preconizados pela legislação brasileira<sup>5</sup>, apresentando também o segundo maior valor de lipídios totais ( $p < 0,05\%$ ) entre as marcas avaliadas. Mariath et al.<sup>12</sup> relataram que a obesidade é vista como um problema de saúde pública e comprovaram que a ingestão de alimentos com altos teores de gorduras saturadas foi a principal causa do aumento de peso corporal.

As salsichas referentes à marca C, por apresentarem conteúdo proteico abaixo de 12,00% e percentual de gordura total acima de 30,00%, se encontravam em desacordo com a legislação. Assim como a marca B, as salsichas da marca D apresentaram teores de carboidratos totais e amido acima dos valores máximos preconizados pela Instrução Normativa nº 4/2000<sup>5</sup>, sendo responsáveis pelos maiores valores ( $p < 0,05\%$ ) observados para esses parâmetros durante o estudo. O uso de amido em formulações cárneas tem o objetivo de conferir maior uniformidade e textura mais firme aos produtos emulsionados<sup>13</sup>. Em contrapartida, o amido pode também contribuir para a redução da quantidade de matéria-prima e, conseqüentemente, para a redução do custo de produção, o que tem levado algumas indústrias do setor a burlarem a legislação quanto a quantidade desse ingrediente nas formulações de seus produtos.

As amostras de salsichas analisadas por Kawaiti et al.<sup>13</sup> apresentaram valores médios de umidade, proteína total, gordura total, carboidratos e amido na ordem de 56,47%, 14,10%, 22,91%, 2,49% e 1,92%, respectivamente, valores semelhantes aos verificados neste estudo.

Os resultados microbiológicos das amostras de salsichas analisadas são apresentados na Tabela 2.

Segundo a RDC nº 12/2001<sup>14</sup>, o limite máximo permitido para coliformes a 45 °C, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Salmonella* sp. em produtos cárneos cozidos, incluindo as salsichas, é de  $1 \times 10^3$  NMP.g<sup>-1</sup>,  $3 \times 10^3$  UFC.g<sup>-1</sup> e ausência em 25 g do alimento, respectivamente. Como pode-se observar na Tabela 2, em nenhuma das amostras foi verificada a presença de *Salmonella* sp. As contagens de coliformes a 45 °C foram consideradas aceitáveis para embutidos processados, no entanto, foi verificado que todas as marcas apresentaram

amostras com contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva acima dos valores máximos preconizados pela legislação<sup>15</sup>, indicando, portanto, que as salsichas analisadas podem ser tidas como um problema de saúde pública.

**Tabela 2.** Resultados das análises microbiológicas de salsichas comercializadas a granel

Marcas	Coletas	Coliformes 45 °C (NMP.g <sup>-1</sup> )*	<i>Staphylococcus</i> coagulase (+) (UFC.g <sup>-1</sup> )**	<i>Salmonella</i> spp. (em 25 g)
A	1 <sup>a</sup>	< 3,0	$3,4 \times 10^3$	Ausência
	2 <sup>a</sup>	< 3,0	$2,4 \times 10^2$	Ausência
	3 <sup>a</sup>	< 3,0	$2,4 \times 10^2$	Ausência
	4 <sup>a</sup>	< 3,0	$4,1 \times 10^3$	Ausência
	5 <sup>a</sup>	< 3,0	$3,7 \times 10^3$	Ausência
	6 <sup>a</sup>	< 3,0	$1,3 \times 10^2$	Ausência
B	1 <sup>a</sup>	< 3,0	$3,8 \times 10^3$	Ausência
	2 <sup>a</sup>	< 3,0	$4,6 \times 10^3$	Ausência
	3 <sup>a</sup>	< 3,0	$7,9 \times 10^2$	Ausência
	4 <sup>a</sup>	< 3,0	$4,4 \times 10^2$	Ausência
	5 <sup>a</sup>	< 3,0	$3,0 \times 10^2$	Ausência
	6 <sup>a</sup>	< 3,0	$2,9 \times 10^2$	Ausência
C	1 <sup>a</sup>	< 3,0	$3,0 \times 10^2$	Ausência
	2 <sup>a</sup>	< 3,0	$3,2 \times 10^3$	Ausência
	3 <sup>a</sup>	< 3,0	$3,5 \times 10^3$	Ausência
	4 <sup>a</sup>	< 3,0	$3,8 \times 10^3$	Ausência
	5 <sup>a</sup>	< 3,0	$4,4 \times 10^3$	Ausência
	6 <sup>a</sup>	< 3,0	$4,8 \times 10^2$	Ausência
D	1 <sup>a</sup>	< 3,0	$4,6 \times 10^2$	Ausência
	2 <sup>a</sup>	< 3,0	$3,9 \times 10^3$	Ausência
	3 <sup>a</sup>	< 3,0	$4,7 \times 10^3$	Ausência
	4 <sup>a</sup>	< 3,0	$4,4 \times 10^3$	Ausência
	5 <sup>a</sup>	< 3,0	$4,1 \times 10^3$	Ausência
	6 <sup>a</sup>	< 3,0	$3,4 \times 10^3$	Ausência

\*NMP.g<sup>-1</sup>: Número mais provável por grama. \*\*UFC.g<sup>-1</sup>: Unidades formadoras de colônias por grama.

Em estudo realizado por Martins et al.<sup>15</sup>, ficou constatado que 22,00% e 28,00% das amostras de salsichas *hot-dog* comercializadas a granel apresentaram contaminação por coliformes termotolerantes e *Staphylococcus* coagulase positiva, respectivamente, sendo que 12,00% e 14,00% das embaladas à vácuo também apresentaram contagens para coliformes termotolerantes e *Staphylococcus* coagulase positiva acima do máximo permitido pela legislação vigente. No mesmo estudo foi detectada presença de *Salmonella* sp. em 6,00% das amostras comercializadas a granel. Segundo os mesmos autores, a contaminação do alimento por coliformes e *Staphylococcus* coagulase positiva pode indicar falta de procedimentos de Boas

Práticas de Fabricação, tratamento térmico ineficiente, recontaminação após tratamento térmico, tempo e/ou temperatura de armazenamento inadequados, ou ainda acondicionamento em embalagens contaminadas ou exposição do alimento ao ambiente.

## CONCLUSÃO

Sob o aspecto microbiológico, todas as marcas de salsichas analisadas estavam impróprias para consumo humano. Os resultados físico-químicos demonstraram que 75% das marcas avaliadas apresentaram teores de proteína, gordura, carboidratos e amido divergentes aos valores estabelecidos pela legislação brasileira.

Os resultados obtidos e o elevado consumo de produtos cárneos emulsionados comercializados a granel, bem como a existência de poucos estudos sobre a qualidade de salsichas, indicam, especialmente às autoridades sanitárias, a necessidade de maior controle na produção e comercialização como prática fundamental na defesa da saúde do consumidor.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Universidade Tecnológica Federal do Paraná, pela estrutura cedida para análises, e à Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão de bolsa.

## REFERÊNCIAS

1. Ortigoza SAG. Alimentação e saúde: as novas relações espaço-tempo e suas implicações nos hábitos de consumo de alimentos. Curitiba: Editora UFPR; 2008. v.1.
2. Tavares TM, Serafini AB. Carnes de hambúrgueres prontas para consumo: Aspectos legais e riscos bacterianos. *Rev Patol Trop*. 2006;35(1):17-23.
3. Bogusz Junior S, Santos JS, Xavier AAO, Weber J, Leães FL, Costabeber I. Contaminação por compostos organoclorados em salsichas hot-dog comercializadas na cidade de Santa Maria (RS), Brasil. *Cienc Rural*. 2004;34(5):161-7.
4. Datamark. Carne industrializada/Salsichas. [acesso 2012 mar 02]. Disponível em: [<http://www.brazilfocus.com/newbrazilfocus/ASP/bf/yearlypd/ys00861.asp>].
5. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 4, de 31 de março de 2000. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de carne mecanicamente separada, de mortadela, de linguiça, de salsicha. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília (DF); 5 abr 2000; Seção I: 6-10.
6. AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 16.ed. Washington: DL; 1997.
7. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Cell Biol*. 1959;37:911-7.
8. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo – Brasil). Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4.ed. Brasília: ANVISA; 2005.
9. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 20, de 21 de julho de 1999. Regulamento de métodos para controle de produtos cárneos e seus ingredientes – métodos físico-químicos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília (DF); 9 set 1999; Seção I:29.
10. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília (DF); 18 set 2003.
11. STatsoft Inc. Statistica data analysis system version 7.0. 1.ed. Tulsa: Statsoft Inc.; 2004.
12. Mariath AB, Grillo LP, Silva RO, Schmitz P, De Campos IC, Medina JRP, et al. Obesidade e fatores de risco para o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis entre usuários de unidade de alimentação e nutrição. *Cad Saúde Públ*. 2007;23(4):897-905.
13. Kawaiti FY, Hagiwara MMH, Lemos ALSC, Miyagusku L, Yamada EA, Andrade JC, et al. Elaboração de produtos cárneos embutidos com carne de ovelha de descarte. *Anais. Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC)*; 2010. p.01-9.
14. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília (DF); 10 jan 2001; Seção I(7-E):45-53.
15. Martins LL, Santos IF, Franco RM, Oliveira LAT, Bezz J. Avaliação do perfil bacteriológico de salsichas tipo “hot dog” comercializadas em embalagens a vácuo e a granel em supermercados dos municípios Rio de Janeiro e Niterói, RJ/Brasil. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2008;67(3):123-35.

## Atitudes de risco dos consumidores em *self-service*

### Consumers risk attitudes for contaminating foods at self-service restaurants

RIALA6/1530

---

Laissa Benites MEDEIROS\*, Larissa Costa PEREIRA, Ana Lúcia de Freitas SACCOL

\*Endereço para correspondência: Centro Universitário Franciscano – UNIFRA, Santa Maria, RS, Brasil. Rua Appel, n. 132, apto 04, Bairro Bom Fim, CEP: 97015-030. Tel.: (55) 9996-6331. E-mail: laissa\_medeiros\_1@hotmail.com

Recebido: 03.04.2012 - Aceito para publicação: 16.10.2012

---

#### RESUMO

Devem-se considerar os aspectos que fogem ao controle do processador, como por exemplo, o autosserviço, a fim de garantir a inocuidade dos alimentos. Neste estudo foram avaliadas as atitudes de risco dos consumidores que podem favorecer a contaminação dos alimentos durante o autosserviço. Foram avaliadas treze atitudes de risco que possam contaminar os alimentos na distribuição e exposição destes em um restaurante da cidade de Santa Maria (RS). A análise foi feita durante cinco dias consecutivos no mês de setembro de 2011. A avaliação foi efetuada a cada cinco indivíduos no período de maior movimentação do restaurante (das 11h às 14h), totalizando 657 observações. De acordo com os resultados obtidos, notou-se que a atitude de risco mais cometida pelos consumidores foi falar sobre as preparações alimentícias expostas (51%). Em 46% dos casos, os consumidores utilizavam os utensílios de uma preparação em outra já servida no seu prato. Concluiu-se que há probabilidade de ocorrência de contaminação alimentar causada pelos próprios consumidores em restaurantes de autosserviço.

**Palavras-chave.** restaurantes, contaminação de alimentos, segurança dos alimentos, higiene dos alimentos.

#### ABSTRACT

Some consumer behaviors, which are beyond of the processor control, e.g., at self-services, should be regarded to ensure the food safety. This study aimed at assessing the consumers' attitudes which might lead to food contamination during self-servicing. This study evaluated thirteen risk attitudes which might cause contamination during the food distribution and self-serving procedure in a restaurant located in the city of Santa Maria (RS) during five days in September of 2011. The analyses were performed in every five individuals groups at the restaurant during the rush hour (from 11:00 AM to 2:00 PM), resulting in 657 observations. According to these analyses, the mostly common risk attitude (51%) of consumers was talking over the preparations while they were choosing and taking the exposed foods. In 46% of the cases, the consumers used the cutleries disposed for a food in another one which was already served onto the own plate. Therefore, high is the chance of the contamination risk caused by the own consumers at self-service restaurants.

**Keywords.** restaurants, food contamination, food security, food hygiene.

## INTRODUÇÃO

A vida moderna impôs um ritmo acelerado aos indivíduos, causando mudanças nos hábitos de vida e alimentares, modificados por diversos fatores, como o aumento da jornada de trabalho, dificuldades em locomoção e, principalmente, o aumento da utilização da mão de obra feminina. Com isso, torna-se cada vez maior o número de refeições feitas fora do domicílio em função da busca de praticidade e economia de tempo, gerando assim um aumento de restaurantes, principalmente os do tipo *self-service*<sup>1</sup>. Nos estabelecimentos que oferecem esse serviço, rigorosas práticas higiênicas no preparo são essenciais para garantir um alimento seguro<sup>2</sup>.

Em um sistema de distribuição centralizado, como os restaurantes de autosserviço, há probabilidade de contaminação dos alimentos pelos consumidores, pois estes mantêm contato direto com os alimentos expostos no balcão de distribuição<sup>3</sup>.

Segundo Jevšnik et al.<sup>4</sup>, os consumidores acreditam que eles não são responsáveis pela segurança dos alimentos com a mesma intensidade que os manipuladores de alimentos. É importante salientar que o consumidor infectado pelo *Staphylococcus aureus* (presente no nariz, garganta, líquidos corporais, sangue e saliva) pode contaminar o alimento e desenvolver algum tipo de Doença Transmitida por Alimentos (DTA)<sup>5</sup>.

As DTAs são consideradas um problema de saúde pública pela abrangência de disseminação devido ao número de refeições realizadas fora de casa atualmente<sup>6</sup>.

As condições higiênicas dos locais de produção e a manipulação dos alimentos interferem na qualidade microbiológica destes, podendo ser considerados veículos de contaminação, e os manipuladores são frequentemente disseminadores de agentes patogênicos<sup>7</sup>.

Aliteraturarelatacasosdecontaminaçãoalimentar por alimentos mal cozidos, mantidos em temperaturas inadequadas ou manipulados por colaboradores portadores de micro-organismos patogênicos, mas poucos são os dados da possível contaminação provocada pelos consumidores, provavelmente por desconsiderar a hipótese desse tipo de problema<sup>8</sup>.

As mãos também são importantes veículos de contaminação, quando em contato com indivíduo, alimento e equipamento, utensílio e ambiente. O ato de espirrar e falar pode contaminar com uma grande quantidade de micro-organismos<sup>3</sup>. Práticas como deixar as mangas do uniforme encostarem no alimento,

conversar, tocar no cabelo enquanto está se servindo pode causar a contaminação e desenvolver as DTAs<sup>8</sup>.

Sendo assim, para diminuir os riscos de contaminação e contribuir com a inocuidade dos alimentos, devem-se considerar também aspectos em que o controle não é o manipulador, como, por exemplo, o consumidor no autosserviço. O objetivo deste estudo foi avaliar as atitudes de risco dos consumidores que podem favorecer a contaminação dos alimentos durante o autosserviço.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo é de caráter exploratório com técnica de observação não participante, segundo Pereira<sup>9</sup>, e a amostra foi escolhida de maneira sistematizada.

Foram avaliadas as atitudes de risco dos consumidores que podem contaminar os alimentos na distribuição. Selecionou-se treze atitudes de risco adaptadas de Zandonadi et al.<sup>3</sup>, no qual foram analisadas segundo técnica de observação *in loco* de comportamentos, de acordo com Mediano<sup>10</sup>. O presente estudo foi aplicado em um restaurante da cidade de Santa Maria (RS), selecionado por conveniência, durante cinco dias consecutivos, no mês de setembro de 2011.

As atitudes avaliadas foram: mexer no cabelo perto das preparações expostas no balcão (1); falar em cima das preparações no balcão de distribuição (2); deixar a gravata, a manga de camisas, bolsas, blusas, vestidos ou casacos tocarem nas preparações (3); deixar parte do corpo do consumidor encostar nas preparações (4); tossir sobre as preparações (5); espirrar sobre preparações (6); utilizar o utensílio de uma preparação servida no prato do consumidor em outra preparação (7); colocar o utensílio de uma preparação em outra preparação (8); deixar o utensílio cair dentro da preparação (9); retirar alimentos do seu prato e devolvê-las às cubas com a mão ou utensílio disponível (10); consumir alimentos antes da pesagem (11); arrumar alimentos no prato com os utensílios das preparações (12); e tocar nos alimentos enquanto se servia das preparações (13).

A observação foi efetuada a cada cinco indivíduos no período de maior movimentação do restaurante, das 11h às 14h.

Os dados coletados foram analisados no programa *Microsoft Excel*<sup>®</sup>, que determinou por meio de análise estatística simples o percentual de pessoas que praticavam cada atitude de risco.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário Franciscano (UNIFRA), sob registro número 247.2011.2, concomitantemente com a aprovação do local onde se desenvolveu a pesquisa.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante os cinco dias de aplicação do trabalho, totalizaram-se 657 avaliações. Na Tabela 1 é apresentado o percentual de consumidores que cometeram cada atitude de risco avaliada.

**Tabela 1.** Percentual de consumidores que praticaram atitudes de risco no momento da preparação dos seus pratos em restaurante da cidade de Santa Maria, RS, 2011

ATITUDES	n	%
1. Mexer no cabelo perto das preparações expostas no balcão	153	23
2. Falar em cima das preparações no balcão de distribuição	332	51
3. Deixar a gravata, a manga da camisa, bolsas, blusas, vestidos ou casacos tocarem nas preparações	220	33
4. Deixar parte do corpo do consumidor encostar nas preparações	56	9
5. Tossir sobre as preparações	13	2
6. Espirrar sobre as preparações	3	0,4
7. Utilizar o utensílio de uma preparação servida no prato do consumidor em outra preparação	301	46
8. Colocar o utensílio de uma preparação em outra preparação	132	20
9. Deixar o utensílio cair dentro da preparação	46	7
10. Retirar alimentos de seu prato e devolvê-las às cubas com a mão ou utensílio disponível	72	11
11. Consumir alimentos antes da pesagem	11	2
12. Arrumar alimentos no prato com o utensílio da preparação	252	38
13. Tocar nos alimentos enquanto se servia das preparações	144	22

É possível perceber que as atitudes de risco mais cometidas pelos consumidores no momento do autosserviço foram falar em cima das preparações (51%), utilizar o utensílio de uma preparação em outra já servida no prato do consumidor (46%) e arrumar alimentos no prato com o utensílio da preparação (38%).

Zandonadi et al.<sup>3</sup> avaliaram as atitudes de risco dos consumidores que podem favorecer a contaminação dos alimentos durante o autosserviço em restaurantes

do Distrito Federal e constataram que as atitudes mais cometidas eram falar em cima das preparações (53%), utilizar o utensílio de uma preparação em outra já servida no prato do consumidor (50%) e arrumar alimentos no prato com os utensílios das preparações (24%).

As atitudes que obtiveram menor percentual de ocorrência foram tossir (2%) e espirrar (0,4%) sobre as preparações, consumir alimentos antes da pesagem (2%) e deixar o utensílio cair dentro da preparação (7%).

No estudo realizado por Rodrigues<sup>8</sup> foram avaliadas as atitudes de consumidores em restaurantes *self-service* e, apesar de apresentarem baixos percentuais, foi verificado que 0,5% dos consumidores tossiam e 0,25 % espirravam enquanto se serviam. As porcentagens encontradas no estudo anterior são próximas dos resultados deste estudo para as mesmas atitudes.

Banczek et al.<sup>11</sup> avaliaram as possibilidades de contaminação dos alimentos causada pelos clientes em restaurantes de grande porte no município de Curitiba (PR) e constataram que 69,23% dos clientes falavam sobre as preparações no balcão de distribuição e 30,76% mexiam nos cabelos perto das preparações expostas, podendo ocasionar quedas de cabelo, contaminando os alimentos.

Nos restaurantes, o controle da contaminação por micro-organismos deterioradores e patogênicos é difícil, pois existe uma grande variedade de alimentos que são preparados e expostos ao consumo nesses locais. Existe ainda o risco potencial dos manipuladores de alimentos e consumidores serem portadores assintomáticos de micro-organismos patogênicos, podendo ser veículo de contaminação<sup>12</sup>.

Segundo Tondo e Bartz<sup>5</sup>, cerca de 30 a 40% dos humanos são portadores assintomáticos de *Staphylococcus aureus*. Esse micro-organismo pode estar na nasofaringe (nariz e garganta), ouvidos, mãos e pele dos humanos<sup>5</sup>. A intoxicação causada por alimentos contendo enterotoxinas de *Staphylococcus aureus* é um dos tipos mais comuns de doenças transmitidas por alimentos em todo o mundo<sup>13</sup>.

Outro aspecto identificado neste estudo foi que os consumidores no momento do autosserviço se debruçam sobre as preparações, pois no restaurante deste estudo as cubas oferecem preparações diferentes em cada lado do balcão de serviço, uma vez que existe fluxo dos dois lados do balcão. Os balcões térmicos também não possuem barreiras de proteção para evitar a contaminação dos alimentos no autosserviço.

Segundo a Portaria nº 325/2010<sup>14</sup> do estado do Rio Grande do Sul (RS), o balcão de distribuição do alimento preparado deve ser equipado com protetor salivar, que pode ser de vidro, acrílico ou outro material, liso, resistente e de fácil higienização, disposto de modo a evitar que partículas provenientes da saliva, tosse, espirro, fios de cabelo e objetos dos consumidores contaminem o alimento preparado<sup>14</sup>.

O risco de contaminar os alimentos torna-se potencializado quando o utensílio é deixado dentro da preparação, pois a parte usada para segurá-lo entra em contato com as mãos do usuário<sup>3</sup>.

No instrumento de coleta de dados adaptado para o presente estudo não foi avaliada a atitude de não lavar as mãos imediatamente antes do autosserviço, pois na área de distribuição dos alimentos no restaurante avaliado inexistiam lavatórios para a lavagem das mãos.

Segundo a Portaria nº 325/2010 do estado do Rio Grande do Sul (RS), os serviços de alimentação devem ser dotados de lavatório para os clientes, exclusivo para higiene de mãos, em lugares estratégicos e em número suficiente, equipado com torneira, preferencialmente com fechamento automático, sabonete líquido ou sabonete bactericida e álcool 70% (em gel ou líquido) ou outro produto próprio para antisepsia de mãos, toalha de papel não reciclado ou outro sistema adequado de secagem de mãos e coletor de papel acionado sem contato manual<sup>14</sup>.

Em estudo realizado por Peres et al.<sup>15</sup>, foi avaliada a influência do consumidor como potencial veículo do risco de contaminação dos alimentos em restaurantes do tipo *self-service* durante o autosserviço, e verificou-se que o hábito de não lavar as mãos foi o mais presente em todas as unidades (94%), estimando-se que o risco de contaminação pelo usuário represente 25%.

## CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos com este estudo pode-se concluir que é grande o percentual de consumidores que praticam atitudes de risco em restaurantes de autosserviço, evidenciando que não são somente os manipuladores de alimentos que podem contaminar os alimentos.

Vale ressaltar que deve existir uma conscientização por parte dos consumidores sobre suas atitudes no momento do autosserviço para evitar a contaminação das preparações por eles e, assim, o desenvolvimento de doenças transmitidas pelos alimentos.

Outra alternativa viável para o restaurante seria a substituição dos balcões térmicos atuais por equipamentos que possuam barreiras de proteção para prevenir a contaminação por parte dos consumidores, bem como a disponibilização de pias exclusivas para a higiene das mãos aos usuários.

## REFERÊNCIAS

1. Genta TMS, Mikcha JMG, Matioli G. Higiene conditions of the self-service restaurants by evaluating the microbial quality of the mixed-food preparations. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2009;68(1):73-82.
2. Chouman K, Ponsano EHG, Michelin AF. Qualidade microbiológica de alimentos servidos em restaurantes self-service. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2010;69(2):261-6.
3. Zandonadi RP, Botelho RBA, Sávio KEO, Akutsu RC, Araújo WMC. Atitudes de risco do consumidor em restaurantes de autosserviço. *Rev Nutr*. 2007;20(1):19-26.
4. Jevšnik M, Hlebec V, Raspor P. Consumers' awareness of food safety from shopping to eating. *Food Control*. 2008;19(8):737-45.
5. Tondo EC, Bartz S. *Microbiologia e Sistemas de Gestão da Segurança de Alimentos*. 1.ed. Porto Alegre: Sulina; 2011.
6. Bolton DJ, Meally A, Blair IS, McDowell DA, Cowan C. Food safety knowledge of head chefs and catering managers in Ireland. *Food Control*. 2008;19(3):291-300.
7. Passos EC, Mello ARP, Sousa CV, Silva CR, Alonso ACA, Gonzalez E, et al. Provável surto de toxinfecção alimentar em funcionários de uma empresa no litoral da região sudeste do Brasil. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2010;69(1):136-40.
8. Rodrigues TS. *Restaurantes self-service: práticos e perigosos* [monografia de especialização]. Brasília (DF): Universidade de Brasília; 2004.
9. Pereira GM. *Epidemiologia: teoria e prática*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.
10. Mediano ZD. *Módulos instrucionais para medidas e avaliação em educação*. Rio de Janeiro: Francisco Alves; 1977.
11. Banczek HFL, Vaz CR, Monteiro SA. Comportamento dos consumidores em self-service no município de Curitiba. *Rev Bras Tecnol Agroindustr*. 2010;4(1):29-41.
12. Mitchel RE, Fraser AM, Bearon LB. Preventing foodborne illness in food service establishments: broadening the framework for intervention and research on safe food handling behaviors. *Int J Environ Health Res*. 2007;17(1):9-24.
13. Pigott DC. Foodborne illness. *Emerg Med Clin North Am*. 2008;26(2):475-97.
14. Rio Grande do Sul. Secretaria da Saúde. Portaria nº 325, 21 de junho de 2010. Aprova procedimento para prevenir a disseminação do vírus H1N1 na área de exposição do alimento preparado em serviços de alimentação. *Diário Oficial [do] Estado do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (RS)*; 21 jun 2010.
15. Peres AP, Niero DM, Wanderley G, Bastos J, Rat K, Nathan MBM, et al. Análise do risco de contaminação alimentar por usuários em diferentes unidades de alimentação e nutrição de Curitiba, PR. *Hig Aliment*. 2011;25(192/193):43-8.

## Estudo das condições de preparo da merenda escolar em creches

### Study on the conditions for preparing free school meal in nursery schools

RIALA6/1531

Catierine Hirsch WERLE<sup>1</sup>, Ana Paula Maciel PEREIRA<sup>2</sup>, Tânia Maria Vinturim GONÇALVES<sup>1</sup>,  
Fernando Leite HOFFMANN<sup>1</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rua Imperial, 66, apto 501, São José do Rio Preto, SP, CEP: 15015-610. E-mail: catierinewerle@gmail.com

<sup>2</sup>Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT), Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Campus Diamantina

Recebido: 09.02.2012 – Aceito para publicação: 28.12.2012

#### RESUMO

Os alimentos são passíveis de contaminação por diferentes agentes etiológicos que podem levar ao desenvolvimento de doenças desencadeadas por micro-organismos patogênicos ou suas toxinas. O alimento preparado e armazenado de forma inadequada pode ser veículo de doenças. Este estudo avaliou as condições higiênico-sanitárias de preparo da merenda escolar. Para esta avaliação, foi realizada a análise microbiológica das amostras coletadas das mãos dos manipuladores, da água utilizada no preparo e higienização dos alimentos; e um *check-list* foi utilizado para analisar as condições físicas, estruturais e de limpeza das cozinhas. Foram analisadas 31 amostras obtidas de *swab* de mão, 21 amostras de água e as condições das cozinhas foram avaliadas por meio de um questionário. Este estudo aponta a necessidade de realizar treinamento dos manipuladores de alimento e de efetuar implementação de controle mais rigoroso da água utilizada no preparo dos alimentos. A presente investigação mostrou também que as escolas avaliadas mantêm bom padrão quanto à conservação e limpeza das cozinhas.

**Palavras-chave.** escola, merenda escolar, condições microbiológicas.

#### ABSTRACT

Foods are susceptible to be contaminated with several etiologic agents, which can lead to the development of illnesses, triggered by pathogenic microorganisms or their toxins. Food prepared and improperly stored can be the diseases vehicle. This study aimed at evaluating the sanitary conditions in preparing free school meals in the nursery schools, located in a city of the state of São Paulo. This study was conducted by performing microbiological analyses of samples collected from hands of workers responsible for preparing food, and of the water samples used for cleansing and preparing foods. The kitchen physical, structural and cleaning conditions were assessed by means of a checklist. This study analyzed 31 samples from worker hands swab, and 21 samples of water collected from three school kitchens. This study pointed out that the food handlers training should be improved, and a peremptory control of the water used for food preparation purpose should be established. Also, this study showed that the evaluated schools maintain the respective kitchens in a good standard of conservation and cleanliness.

**Keywords.** school, free school meal, microbiological conditions.

## INTRODUÇÃO

A alimentação adequada é um direito fundamental do ser humano reconhecido internacionalmente na Declaração Universal dos Direitos Humanos (art. 25). Segundo o Programa Nacional de Alimentação Escolar (PNAE), os alunos têm direito a uma alimentação segura do ponto de vista nutricional e microbiológico. A insegurança alimentar tem sido documentada em países de toda gama de rendas nacionais, desde aqueles de mais baixa até os de mais alta renda. Nesse sentido, a maioria dos países latino-americanos, incluindo o Brasil, está no meio desse espectro<sup>1</sup>.

Os alimentos são passíveis de contaminação por diferentes agentes etiológicos que podem levar ao desenvolvimento de doenças que afetam a saúde humana, podendo ser desencadeadas por micro-organismos patogênicos ou suas toxinas<sup>2</sup>. Oliveira et al.<sup>3</sup> estimam que as enfermidades causadas por alimentos contaminados constituem um dos problemas mais difundidos mundialmente, sendo as crianças, idosos e imunocomprometidos os mais acometidos.

Uma importante fonte de contaminação dos alimentos é a água, por ser utilizada no preparo e higienização dos alimentos, sendo seu abastecimento adequado pré-requisito para uma vida saudável. Doenças transmitidas por água contaminada constituem a maior causa de morte em muitas partes do mundo, afetando principalmente crianças<sup>4</sup>.

Segundo o Ministério da Saúde<sup>5</sup>, de 1999 a 2009 foram registrados no Brasil 6.349 surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) pela Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), com acometimento de 123.917 pessoas e 70 óbitos. Do total de surtos notificados, 41,1% deles tiveram origem bacteriana, sendo os agentes mais frequentes *Salmonella* spp, *Staphylococcus* spp e *Bacillus cereus*, e 51,3% tiveram sua origem ignorada. De acordo com a SVS, as instituições de ensino ocuparam o terceiro lugar em ocorrências de surtos.

Os manipuladores são a principal via de contaminação dos alimentos<sup>6</sup>. A RDC 216/2004<sup>7</sup> classifica como manipulador de alimentos qualquer pessoa do serviço de alimentação que entra em contato direto ou indireto com o alimento.

O objetivo do trabalho foi avaliar o preparo da merenda escolar através do acompanhamento das escolas de uma cidade do interior do estado de São Paulo por seis meses, realizando coletas periódicas da merenda.

As condições higiênico-sanitárias em que os alimentos são preparados foram avaliadas através da análise microbiológica do *swab* de mãos dos manipuladores, da água utilizada no preparo dos alimentos e as condições das instalações onde estes são preparados, por meio de um *check-list*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Escolas

Foram escolhidas escolas de uma região de fácil acesso ao laboratório de Microbiologia de Alimentos da UNESP. As escolas foram selecionadas aleatoriamente após concordarem com a realização da pesquisa.

### Manipuladores

Foram avaliados *swabs* das mãos dos manipuladores de alimentos de três creches de um município do interior do estado de São Paulo. As amostras de *swab* foram coletadas em pelo menos cinco dias diferentes, em cada escola, para melhor representação dos dados, no período de 18/08/2010 a 14/03/2011, totalizando 31 amostras de seis manipuladores.

Os *swabs* de mão foram realizados após prévia aprovação e parecer do comitê de ética (protocolo 0011.0.229.000.10, parecer 067/10, obtido em 8 de setembro de 2010). Para realização da coleta, os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Para análise das mãos, foi solicitado aos manipuladores que as higienizassem da forma como fariam se fossem manipular os alimentos e as amostras foram coletadas com auxílio de um *swab* estéril, utilizado em toda superfície das mãos dos manipuladores.

Os *swabs* foram transportados ao laboratório em caixas de isopor e gelo, contidos em tubos de ensaio com 10 mL de solução peptonada 0,1% estéril. Foram avaliados *swabs* de ambas as mãos dos manipuladores quanto à presença de *Staphylococcus* coagulase positiva, coliformes totais e termotolerantes e *Escherichia coli*<sup>8</sup>, sendo as análises realizadas no mesmo dia da coleta.

### Água

Foram analisadas 21 amostras de água, sendo pelo menos seis amostras de cada escola, em diferentes datas entre 18/08/2010 e 14/03/2011. Coletou-se em torno de 200 mL de águas utilizadas tanto no preparo quanto na higienização dos alimentos. As amostras

foram cedidas por três escolas de ensino infantil de uma cidade do interior do estado de São Paulo e foram encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Estadual Paulista – UNESP, onde foi realizada a análise da qualidade da água, com investigação de bactérias do grupo coliforme e contagem de bactérias heterotróficas<sup>9</sup>.

Para coleta das amostras, primeiramente a torneira foi submetida à desinfecção com álcool a 70% e, após um fluxo de dois minutos, a água foi coletada em frasco estéril contendo 0,2 mL de uma solução 1,8% de tiosulfato de sódio para inativar o cloro residual, conforme metodologia recomendada por Silva et al.<sup>9</sup>.

### Check-list

Em novembro de 2009 nas escolas I e II e em outubro de 2010 na escola III, foi aplicado questionário para avaliar as Boas Práticas de Fabricação (BPF) nas cozinhas onde a merenda escolar é preparada, definidas na resolução RDC nº 216/2004<sup>7</sup> como sendo procedimentos a serem adotados por serviços de alimentação para garantir a qualidade higiênico-sanitária e a conformidade dos alimentos com a legislação sanitária.

O *check-list* constou de 130 itens, divididos em seis categorias, que abrangeram aspectos gerais de recursos humanos, de condições ambientais, de instalações, edificações e saneamento, de equipamentos, de sanitização e de produção. O *check-list* foi preenchido por meio de observações no próprio local e informações fornecidas pelas diretoras ou responsáveis pela escola.

O questionário foi adaptado para as cozinhas escolares, de acordo com a RDC 275/2002<sup>10</sup>. As opções de resposta para preenchimento foram: “Conforme” (C), quando o estabelecimento atendeu ao item observado; “Não Conforme” (NC), quando o mesmo não atendeu ao definido, e os itens que não eram aplicáveis receberam a denominação “Não se aplica” (NA).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Swab de mãos

Foram analisadas 31 amostras de *swab*, tendo sido detectada presença de coliformes totais em 18, das quais três apresentaram contagens superiores a  $4,6 \times 10^2$  NMP (Número Mais Provável)/mão. Das 18 amostras positivas para coliformes totais, foram detectados coliformes termotolerantes em quatro, em que destas foi confirmada a presença de *E. coli* em duas. Estudo

realizado em Natal<sup>11</sup> encontrou contaminação em 55% das amostras de *swab*, o que demonstra ser este um problema comum.

Com relação à pesquisa de *Staphylococcus* spp, foi observada a presença em 26 das 31 amostras analisadas, das quais 10 apresentaram contagens superiores a  $10^3$  UFC/mão. Foi realizado o teste da coagulase, sendo detectada a presença de cepas coagulase positiva em seis amostras.

Os manipuladores são uma peça importante na segurança alimentar. Podem contribuir para transmissão de doenças, devido à possibilidade de introduzir patógenos durante a produção, processamento, distribuição e manipulação dos alimentos, sendo necessário treinamento constante, inclusive quanto às boas práticas de higiene, para evitar a transmissão de doenças<sup>12</sup>. Entretanto, a grande maioria não recebe treinamento adequado, como aponta os estudos realizados em Natal<sup>11</sup> e em Salvador<sup>13</sup>. Neste estudo, os manipuladores afirmaram receber orientação a cada seis meses, porém os resultados obtidos demonstraram que essa orientação não atingiu seu objetivo, considerando a detecção de coliformes termotolerantes em mais de 10% das amostras, mesmo após higienização.

### Água

Os resultados obtidos na análise da água encontram-se na Tabela 1. Foi utilizado para comparação e determinação da qualidade da água o padrão estabelecido pela Portaria nº 518/2004<sup>14</sup>, a qual estabelece os padrões microbiológicos para água de consumo humano, e que estava vigente em 2010 – período no qual as análises foram realizadas, embora, atualmente, a legislação que está em vigor seja a Portaria nº 1.428.

Tabela 1. Análise microbiológica da água coletada

Micro-organismos	Nº de amostras que atenderam ao padrão	Nº de amostras em desacordo com o padrão	Padrão Federal Brasil, 2004
Heterotróficos	13	8	$5 \times 10^2$ UFC/mL
Coliformes totais	19	2	Ausência em 100 mL
Coliformes termotolerantes	19	2	Ausência em 100 mL
<i>E. coli</i>	19	2	Ausência em 100 mL

Das 21 amostras analisadas, 8 amostras não atenderam aos padrões estabelecidos pela Portaria nº 518/2004 para contagem de bactérias heterotróficas, 2 amostras não atendiam aos padrões estabelecidos para coliformes totais e termotolerantes, sendo portanto consideradas impróprias para consumo humano.

A presença de *Escherichia coli* na água indica possível contaminação fecal nos reservatórios e a necessidade de manutenção para que a água atinja os padrões sanitários ideais de forma a evitar possíveis danos às crianças, como por exemplo, seguir a recomendação de higienização da caixa a cada 06 meses, diminuindo assim a possibilidade de contaminação cruzada dos alimentos que serão consumidos crus.

### Check-list

Os resultados da avaliação pelo *check-list* encontram-se na Tabela 2. Os itens foram avaliados em “Conforme” e “Não conforme”, de acordo com a RDC 275/2002<sup>10</sup>. As escolas estão representadas pelos algarismos romanos I, II e III.

**Tabela 2.** Resultado da avaliação das escolas através do *check-list*

Categoria	Conforme	Não conforme	Total de quesitos avaliados		
Aspectos gerais de recursos humanos	E.I	16	E.I	1	17
	E.II	12	E.II	5	
	E.III	5	E.III	12	
Aspectos gerais de condições ambientais	E.I	2	E.I	0	2
	E.II	2	E.II	0	
	E.III	1	E.III	1	
Aspectos gerais de instalações, edificações e saneamento	E.I	26	E.I	15	41
	E.II	30	E.II	11	
	E.III	25	E.III	16	
Aspectos gerais dos equipamentos	E.I	3	E.I	0	3
	E.II	3	E.II	0	
	E.III	2	E.III	1	
Aspectos gerais de sanitização	E.I	18	E.I	1	19
	E.II	14	E.II	5	
	E.III	13	E.III	6	
Aspectos gerais de produção	E.I	33	E.I	14	47
	E.II	29	E.II	18	
	E.III	32	E.III	15	

Na categoria de aspectos gerais de recursos humanos, foram avaliados 17 quesitos em relação aos manipuladores, sendo observado se recebiam

treinamento, se este era reforçado periodicamente, se apresentavam boa higiene corporal, bom procedimento de higienização, se evitavam comportamentos incorretos (como fumar e tossir sobre os alimentos), se eram realizados exames médicos, se utilizavam uniformes e sua condição de limpeza, condições das luvas térmicas e de borracha e o trânsito de visitantes e manipuladores.

Os resultados indicaram média de conformidade de 65%. Entre as principais inconformidades observadas estava a presença de manipuladores fazendo uso de esmaltes e adornos, sendo esses itens de fácil resolução e que poderiam trazer muitas melhorias na manipulação dos alimentos.

Estudos realizados em escolas nas cidades Salvador<sup>13</sup> e Natal<sup>11</sup> demonstraram que a higiene e o treinamento dos manipuladores de alimentos são deficientes. No Brasil, em 2005, as escolas foram responsáveis por 11,6% dos surtos de doenças transmitidas por alimentos registrados<sup>15</sup>, demonstrando a necessidade de maiores esclarecimentos e treinamento das pessoas envolvidas na produção da merenda escolar.

No item de aspectos gerais de condições ambientais foi observada a parte externa da escola, se esta se encontrava livre de sucatas, fossas e lixo. Nesse item foi encontrada uma média de conformidade de 83%, sugerindo que as escolas mantêm a parte externa em boas condições de higiene.

Em aspectos gerais de instalações, edificações e saneamento foi observado se o *layout* da escola era adequado para evitar ocorrência de contaminação cruzada; o estado das paredes e divisórias; a conservação e o material dos pisos, ralos e canaletas; o estado de conservação dos tetos e forros; a facilidade de limpeza das portas e se estas estavam em bom estado de conservação; a disposição, a limpeza, o estado de conservação das janelas; a iluminação; instalações elétricas; ventilação; existência de pias em quantidade suficiente para higienização e limpeza; a facilidade dos sanitários; os vestiários; o lixo, caixas de gordura e reservatório de água. Nesse quesito, o estudo apontou 66% de conformidade, o que indica que as escolas têm uma posição satisfatória quanto à conservação das cozinhas.

No quesito aspectos gerais de equipamentos foram observados os equipamentos, utensílios e bancadas, se apresentavam superfície lisa, impermeável, resistentes e se estavam em bom estado de conservação. Nesse quesito foi observada uma média de conformidade de 89%, indicando que as escolas mantêm seus equipamentos em bom estado de conservação.

Foram avaliados em aspectos gerais de sanitização os procedimentos de higienização; treinamento dos funcionários; frequência; produtos utilizados; local de armazenamento; programa de controle de pragas e registro do controle de pragas e dos procedimentos de higienização. Nas pesquisas realizadas nas escolas foi encontrada uma média de 79% de conformidade.

O quesito 6 avaliou os aspectos gerais de produção, em que foram observadas as matérias-primas; seu recebimento e armazenamento; o estoque quanto a sua capacidade física; disposição e empilhamento dos produtos; armazenamento de acordo com os gêneros e prazo de validade dos produtos; preparo dos alimentos, sendo observadas as etapas de congelamento e descongelamento; tempo e condições de armazenamento dos produtos prontos e higienização dos alimentos consumidos crus.

Foi encontrada uma média de conformidade de 66%. Um dos pontos críticos observados nas três escolas foi a falta do controle da temperatura, tanto dos equipamentos como dos alimentos, o que pode proporcionar o desenvolvimento de micro-organismos.

Os alimentos nas três escolas são preparados de modo a minimizar as sobras e estas, quando presentes, não são reaproveitadas.

## CONCLUSÃO

Podemos concluir por meio do *check-list* que as escolas avaliadas no presente estudo possuem uma estrutura adequada para o preparo da merenda, porém é sabido que a manipulação imprópria dos alimentos é uma das principais causas de transmissão de doenças, em que a higiene precária das mãos é uma importante fonte de contaminação. Visando uma melhora na qualidade, há a necessidade de maiores investimentos no treinamento dos manipuladores e conscientização destes quanto a sua importância no preparo dos alimentos. Com algumas soluções simples, como a orientação dos manipuladores com relação à correta higienização das mãos, a não utilização de adornos durante o preparo das refeições, através de treinamentos periódicos, e também a conscientização desses profissionais no seu papel na segurança alimentar poderiam melhorar muito a qualidade dos alimentos servidos.

Há ainda a necessidade de uma monitoração periódica das caixas de armazenamento de água, devendo esta ser realizada pelo menos uma vez por ano, sendo o ideal uma limpeza a cada seis meses, pois a caixa estando

contaminada pode contaminar tanto o produto final quanto os manipuladores.

Para o preparo de uma merenda segura é necessário monitorar toda cadeia envolvida na produção de alimentos, desde o recebimento, armazenamento até o preparo dos alimentos, evitando assim a transmissão de doenças para as crianças.

---

## AGRADECIMENTO

À CAPES, pelo apoio financeiro, e às escolas, por cederem seu espaço e pessoal para realização da pesquisa.

---

## REFERÊNCIAS

1. Tulane D. Intervenções para reduzir a insegurança alimentar: uma síntese dos atuais conceitos e abordagens para a América Latina. *Rev Nutr*. 2008;21:159-73.
2. Neto Cunha A, Silva CMG, Stamford TML. *Staphylococcus enterotoxigênicos em alimentos in natura e processados no estado de Pernambuco, Brasil*. *Ciênc Tecnol Alim*. 2002;22(3):263-71.
3. Oliveira ACB, Germano PML, Germano MIS. Avaliação dos alimentos cárneos servidos no programa de alimentação escolar de um município da Grande São Paulo: ênfase nos aspectos de tempo e temperatura. *Hig Alim*. 2004;18(124):24-9.
4. Fawell J, Nieuwenhuijsen MJ. Contaminants in drinking water. *Braz Med Bull*. 2003;68:199-208.
5. Brasil. Portal da Saúde. Doenças Transmitidas por Alimentos – Aspectos epidemiológicos. Disponível em: [[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=31760](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31760)].
6. Mello AG, Gama MP, Marin VA, Colares LGT. Conhecimento dos manipuladores de alimentos sobre boas práticas nos restaurantes públicos populares do Estado do Rio de Janeiro. *Braz J Food Technol*. 2010;13(1):60-8.
7. Brasil. Resolução ANVISA. RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004. Dispõe sobre regulamento técnico de boas práticas para serviços de alimentação. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília (DF)*; 16 set 2004.
8. Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA, Taniwaki MH, Santos RFS, Gomes RA. *Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos*. São Paulo: Varela; 2010.
9. Silva N, Cantusio NR, Amstalden VC, Arruda, NF. *Manual de métodos de análise microbiológica da água*. São Paulo: Varela; 2005.
10. Brasil. Resolução ANVISA. RDC nº 275, de 21 de outubro de 2002. Dispõe sobre o regulamento técnico de procedimentos operacionais padronizados aplicados aos estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos e a lista de verificação das boas práticas de fabricação em estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília (DF)*; 6 nov 2002; Seção 1:4-21.
11. Campos AKC, Cardonha AMS, Pinheiro LBG, Ferreira NR, Azevedo PRM, Stamford TLM. Assessment of personal hygiene and practices of food handlers in municipal public schools of Natal, Brazil. *Food Control*. 2009;20:807-10.

12. Acco M, Ferreira FS, Henriques JAP, Tondo EC. Identification of multiple strains of *Staphylococcus aureus* colonizing nasal mucosa of food handlers. *Food Microbiol*. 2003;20:489-93.
13. Santana NG, Almeida RCC, Ferreira JS, Almeida PF. Microbiological quality and safety of meals served to children and adoption of good manufacturing practices in public school catering in Brazil. *Food Control*. 2009;20:255-61.
14. Brasil. Portaria ANVISA 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, e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília (DF); 26 mar 2004.
15. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de Vigilância Epidemiológica. Série A. Normas e Manuais Técnicos. 6.ed. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2005.

## Histoplasmose: um risco ocupacional entre pesquisadores que realizam trabalho de campo?

### Is the histoplasmosis an occupational hazard between the investigators who perform field work?

RIALA6/1532

Adriana Pardini VICENTINI<sup>1\*</sup>, Angela Noronha PASSOS<sup>1</sup>, Décio Fragata da SILVA<sup>1,2</sup>, Lúcia Cupertino BARRETO<sup>1</sup>, Cezar Mendes de ASSIS<sup>3</sup>, Roseli Santos de FREITAS<sup>4</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses, Centro de Imunologia, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355 11º andar, São Paulo, SP, Brasil. Tel.: (11) 3068-2900, Fax: (11) 3068-2898. E-mail: apardini@ial.sp.gov.br, drcavicentini@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Tiradentes, Campus Farolândia, Aracajú, SE, Brasil

<sup>3</sup>Centro de Parasitologia e Micologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil

<sup>4</sup>Laboratório de Micologia Médica, LIM 53, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

Recebido: 24.07.2012 - Aceito para publicação: 19.10.2012

#### RESUMO

A histoplasmose é micose sistêmica causada por *Histoplasma capsulatum*. A infecção humana ocorre pela inalação de microconídios encontrados em solo contendo excretas de aves e/ou morcegos. Neste estudo foi enfatizado o potencial das atividades profissionais praticadas em cavernas em possibilitar risco de infecção por *Histoplasma*. Utilizando-se questionário semiestruturado, foram obtidas informações sobre o trabalho de campo executado por um grupo de 15 biólogos. A presença de anticorpos séricos anti-*H. capsulatum* foi avaliada em amostras de sangue coletadas desses profissionais. Na entrevista, 87% dos indivíduos relataram frequentes visitas a cavernas, 53% acampamento no interior das grutas; 33% captura de morcegos e 53% de coleta de amostras de solo. A maioria das cavernas situa-se nas regiões sudeste e centro-oeste do Brasil. A detecção de anticorpos por imunodifusão dupla demonstrou que 20% dos soros reagiram com o antígeno de *H. capsulatum*. Por *immunoblotting*, houve 94,1% de reconhecimento específico da fração de 94 kDa, sugerindo-se que os indivíduos entraram em contato com *H. capsulatum*. Este estudo sugere fortemente que a prática da espeleologia propicia a exposição dos indivíduos a espécies fúngicas que habitam saprofiticamente o meio ambiente, especialmente *H. capsulatum*, configurando-se como potencial fator de risco para infecções.

**Palavras-chaves.** *Histoplasma*, histoplasmose, epidemiologia, exposição ambiental, testes imunológicos.

#### ABSTRACT

Histoplasmosis is a systemic mycosis caused by *Histoplasma capsulatum*. Human infection occurs by inhaling the microconidia found in soil contaminated with birds and/or bats excrements. In this study, the potential risk of infection with *Histoplasma* from practicing professional activities in caves was emphasized. Information on the fieldwork conducted by a group of 15 biologists were obtained through a semi-structured questionnaire; and the presence of antibodies anti-*H. capsulatum* was evaluated in their serum samples. The data analysis showed that 87% of subjects reported the frequent cave exploration, 53% camping inside the caves, 33% bats capturing activities, and 53% soil samples collection. The majority of the caves are located in the Southeast and Midwest regions of Brazil. By using double immunodiffusion assay, 20% of sera reacted with *H. capsulatum* antigen. By immunoblotting, it was found 94.1% of specific recognition of 94 kDa fraction, suggesting that the individuals had contact with the fungus. This study strongly suggests that the individuals practicing speleology were prone to fungal species exposure, which inhabit the environment as saprophytes, especially *H. capsulatum*, and it might characterize a potential risk factor for infections.

**Keywords.** *Histoplasma*, histoplasmosis, epidemiology, environmental exposure, immunologic tests.

## INTRODUÇÃO

A histoplasmosse (HP) é micose sistêmica causada pelo fungo termodimórfico *Histoplasma capsulatum*. Enfermidade de ocorrência mundial, tem apresentado elevada incidência nas regiões centrais e sudeste da América do Norte, bem como em certas áreas das Américas Central e do Sul<sup>1</sup>. No Brasil, casos esporádicos da doença e/ou infecção têm sido relatados em todas as regiões, especialmente nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Mato Grosso, Rio Grande do Sul e, recentemente, Ceará<sup>1,2</sup>.

A infecção humana ocorre pela inalação de microconídios encontrados no solo de cavernas, grutas, celeiros, galinheiros e florestas contaminados com excrementos de aves e/ou morcegos que contenham elevado teor de nitrogênio<sup>3</sup>. O risco de infecção está intimamente relacionado ao tipo de atividade desenvolvida pelo indivíduo, ao tempo e à frequência da exposição ao ambiente potencialmente contaminado com partículas infectantes, a carga fúngica, a virulência de *H. capsulatum*, bem como ao estado imunológico e perfil genético do indivíduo<sup>3</sup>. Postula-se que períodos de exposição longos e mais frequentes possam acarretar doença pulmonar de maior gravidade<sup>4</sup>. Atividades como construção, reforma, demolição, espeleologia, turismo ecológico, acampamento e atividades ligadas à agricultura e avicultura podem favorecer a exposição dos indivíduos a esse fungo<sup>3</sup>.

Acredita-se que a infecção primária por *H. capsulatum* seja assintomática em 90-95% dos casos, sendo possível a detecção de anticorpos espécie-específicos em 50 a 80% da população de áreas endêmicas, durante investigação epidemiológica<sup>1</sup>. As manifestações clínicas da HP incluem desde a forma subclínica ou inaparente, pulmonar aguda, pulmonar crônica até infecção extrapulmonar disseminada<sup>3,4</sup>. Tradicionalmente, *H. capsulatum* tem sido descrito como causador de doença disseminada em indivíduos imunocomprometidos e enfermidade respiratória em indivíduos hígidos que possuem como atividade profissional, ou *hobby*, o hábito de visitar cavernas, grutas e matas fechadas<sup>1-3,5</sup>. No presente estudo, procurou-se descrever como atividades profissionais praticadas em cavernas podem representar risco de infecção por *H. capsulatum*. Dessa forma, informações relacionadas ao comportamento de um grupo composto por 15 biólogos durante o trabalho de pesquisa de campo foram obtidas por meio da

avaliação de questionário semiestruturado, e o contato com o agente etiológico da histoplasmosse foi avaliado sorologicamente, por meio da pesquisa de anticorpos séricos anti-*H. capsulatum*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### População de Estudo e Questionário

Foi aplicado questionário semiestruturado, para coleta de dados por meio de entrevistas, em quinze biólogos que atuam na área de zoologia e que realizam coletas de amostras de animais, plantas, rochas e solo em cavernas, situadas em diferentes regiões do Brasil, para o desenvolvimento de suas atividades de pesquisa. Na elaboração do questionário, condução das entrevistas e análise dos dados, o tema abordado foi dividido, didaticamente, em três grupos: 1) questões relacionadas ao planejamento da coleta de informações; 2) questões sobre variáveis que afetam os dados de coleta e futura análise; e 3) questões que se referem ao tratamento e análise de informações advindas de entrevistas<sup>6</sup>.

O questionário foi elaborado de maneira que contemplasse informações relacionadas à identificação do indivíduo (sexo, idade, origem étnica), características do local de residência (muito ou pouco arborizado, presença ou ausência de aves e/ou outros animais domésticos e/ou silvestres), atividades de lazer (visitas a lugares como parques, fazendas e chácaras; práticas com terra, não relacionadas às atividades profissionais), características das cavernas visitadas (localização, presença ou ausência de aves e/ou outros animais silvestres, bem como de coleções hídricas) e atividades e comportamento dos indivíduos no interior das cavernas (realizar ou não coleta, executar ou não escavações, tipo de material coletado, tempo de permanência no interior das mesmas, uso ou não de equipamentos de proteção individual – EPI, entre outros).

### Ética

Os questionários foram submetidos após a obtenção do Consentimento Livre e Esclarecido, sendo a execução do referido estudo aprovada pelo Comitê de Ética do Instituto Adolfo Lutz (Projeto CTC-IAL#06/04), Comissão de Ética para Análise de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Projeto#983/03) e Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (Projeto#10/03).

## Soros

Dez mililitros de sangue total foram coletados por punção venosa para análise da presença ou ausência de anticorpos circulantes anti-*H. capsulatum*.

## Antígeno de *Histoplasma capsulatum*

A obtenção do antígeno bruto de *H. capsulatum* foi realizada segundo metodologia proposta por Kaufman e Standard<sup>7</sup>, com algumas modificações.

Células micelianas da amostra 200 de *H. capsulatum*, mantidas em ágar batata a 27 °C, foram primeiramente adaptadas em ágar Sabouraud-dextrose, com repiques mensais, mantendo-se essa mesma temperatura durante quatro repiques. Após o período de adaptação, realizou-se a expansão das culturas fúngicas em ágar Sabouraud-dextrose, por 33 dias, à temperatura ambiente (25 a 27 °C). Após essa etapa, as culturas foram cobertas com solução de borato-thimerosal a 1:5.000 e deixadas em repouso por 24 h à temperatura ambiente. Em seguida, os sobrenadantes foram coletados, filtrados em papel Whatman® número 03 (Whatman, Brentford, Reino Unido), alíquotados (2,0 mL por frasco), liofilizados e armazenados a -20 °C até o momento do uso. Para a realização das técnicas de imunodifusão dupla e *immunoblotting*, o antígeno liofilizado foi reconstituído em água Milli-Q, obtendo-se antígeno 20 e 10 vezes concentrado, respectivamente.

## Ensaio Sorológicos

A pesquisa de anticorpos séricos circulantes anti-*H. capsulatum* foi realizada empregando-se duas metodologias distintas: o ensaio de imunodifusão dupla (ID) em gel de agarose, desenvolvido segundo metodologia proposta por Ouchterlony<sup>8</sup>, e a reação de *immunoblotting* (IB), segundo protocolo proposto por Towbin et al.<sup>9</sup>.

## RESULTADOS

O grupo estudado foi composto por 53% de biólogos do sexo feminino e 47% do masculino, com faixa etária entre 21 a 46 anos (47% com idade entre 21-30 anos; 40% entre 31-40 anos e 13% acima de 40).

No intuito de avaliar o contato prévio desses indivíduos com propágulos de *H. capsulatum*, questionou-se sobre a existência ou não de aves próximas ao domicílio dos entrevistados, verificando-se que 80% relataram a presença de pássaros nas ruas em

que residiam, devido ao alto índice de arborização das mesmas. Além disso, 67% dos entrevistados relataram manter contato frequente com animais domésticos e/ou silvestres, sendo que 53% relataram o contato com cães, 27% com gatos e 33% com algum tipo de ave. Ao avaliar as atividades de lazer dos indivíduos observou-se que 33% praticavam jardinagem, 40% relataram o hábito de visitar fazendas, 53% chácaras, 60% sítios, 73% parques e 27% zoológicos.

Ao analisar especificamente as atividades desenvolvidas pelos biólogos durante a prática da “espeleologia”, verificou-se que 87% relataram exercer essa atividade com frequência; entretanto, dois indivíduos afirmaram não entrar em nenhuma caverna há mais de um ano. Observou-se que 73% do grupo referiu o hábito de visitar cavernas “virgens” e, ao avaliar o número de vezes que esses indivíduos entraram no interior das mesmas, constatou-se variação entre cinco a mais de 200 vezes, estando essa frequência intimamente relacionada ao tipo de atividade desenvolvida pelos mesmos. Em relação ao tempo de permanência no interior das cavernas, notou-se também grande variabilidade, desde poucas horas (1 a 2 h) até dias. Nesse sentido, oito indivíduos (53%) relataram ter acampado no interior das cavernas em algum momento de suas atividades de pesquisa e a mesma porcentagem cita ter ingerido água diretamente das minas que nascem no interior das grutas.

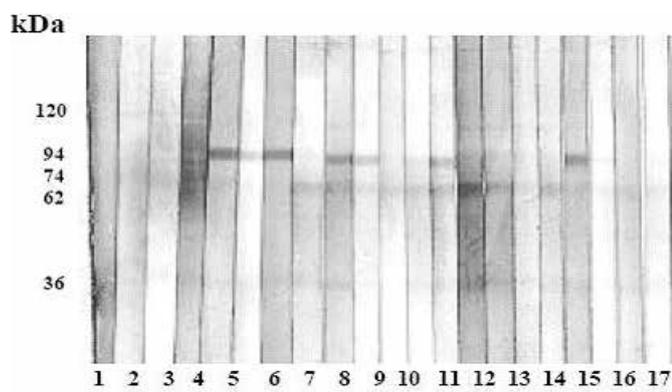
Sobre a existência de animais no interior das cavernas, foi questionado sobre a presença ou não destes e, ainda, se foi realizada captura como parte das atividades de pesquisa. Verificou-se que 80% dos entrevistados relataram encontrar, com frequência, morcegos e excretas de animais no interior das cavernas (Tabela 1). Além disso, 53% do grupo avaliado demonstrou o hábito de coletar amostras de solo, 20% de pedras e 27% de plantas durante as expedições.

**Tabela 1.** Atividades desenvolvidas pelo grupo de biólogos durante as visitas a cavernas

Hábito	Observar		Coletar		
	Presença	n	%	n	%
Aracnídeos		3	20,0	3	20,0
Outros artrópodes		2	13,3	2	13,3
Pássaros		1	6,7	5	33,3
Marsupiais		2	13,3	1	6,7
Morcegos		12	80,0	5	33,3
Outros mamíferos		1	6,7	1	6,7
Excreta de animais		12	80,0	8	53,3

Quanto à localização geográfica das cavernas visitadas, a análise dos questionários revelou que 27% encontravam-se na região sul, 67% na região sudeste, 47% na região centro-oeste, 7% na região nordeste e 7% na região norte. Entre as cavernas mais visitadas, verificou-se que 60% das visitas realizadas aconteceram em cavernas localizadas no Parque Estadual Turístico do Vale do Ribeira, conhecido como Cavernas Petar (SP), 47% nas cavernas do Parque Estadual Intervalles (SP), 33% nas cavernas localizadas na região de Bonito (MS), 27% nas cavernas do Parque Estadual Terra Ronca (GO) e 20% nas cavernas localizadas na Chapada Diamantina (BA). Verificou-se que apenas um indivíduo relatou o emprego de máscara facial como equipamento de proteção individual. Essa medida preventiva aconteceu quando o mesmo realizou visita a uma caverna situada na região amazônica sabidamente conhecida por apresentar *H. capsulatum*.

A pesquisa de anticorpos foi realizada empregando-se duas provas sorológicas distintas: a ID, como prova de precipitação, e o IB, como ensaio imunoenzimático, dirigidos principalmente contra as frações espécie-específicas de 94 kDa (fração M) e 120 kDa (fração H) de *H. capsulatum*. A detecção de anticorpos circulantes anti-*H. capsulatum*, pela ID, demonstrou que 20% (n = 3) dos soros avaliados reagiram frente à fração M de *H. capsulatum*. Entretanto, a análise desses mesmos soros empregando uma técnica mais sensível, como o IB, revelou que das 15 amostras avaliadas, 94,1% apresentaram reatividade frente à fração de 94 kDa (fração M), considerada como evidência presuntiva de contato com *H. capsulatum* (Figura 1).



**Figura 1.** Imunoreatividade dos anticorpos circulantes da classe IgG anti-*H. capsulatum* de soros de indivíduos pertencentes a um grupo de biólogos

A fim de caracterizar melhor este grupo, os soros foram avaliados, por IB, frente a antígenos de *P. brasiliensis* e *A. fumigatus*. Nenhuma das amostras avaliadas apresentou reatividade pela reação de imunodifusão dupla frente às duas preparações antigênicas. Contudo, verificou-se reatividade de fraca intensidade frente à fração de 43 kDa de *P. brasiliensis* em nove amostras de soro (53%) dos indivíduos pertencentes ao grupo dos biólogos. Em relação ao padrão de reatividade frente ao antígeno de *A. fumigatus*, observou-se reatividade para 13 soros (76%) desse grupo.

## DISCUSSÃO

*H. capsulatum* é habitualmente encontrado em regiões de clima tropical ou temperado, com temperatura média anual entre 15 a 22 °C, índice pluviométrico anual de 1.000 mm e umidade relativa do ar entre 67 e 87%. Sua distribuição na natureza associa-se a microambientes fechados, como cavernas ou grutas, construções abandonadas, galinheiros, celeiros e florestas<sup>10-12</sup>. Aspectos epidemiológicos relacionados com as condições nas quais o homem pode adquirir infecção por *H. capsulatum* têm sido descritos e geralmente referem-se a atividades relacionadas à espeleologia e ao meio rural; sejam objetivando trabalho, viagem ou lazer<sup>5,10</sup>. Contudo, não se sabe o momento e as circunstâncias do contato do homem com essa espécie fúngica na natureza. Determinadas características físico-químicas do solo como textura e acidez, associadas ao enriquecimento do mesmo por dejetos de aves e morcegos, que atuam como importante fonte de nitrogênio, favorecem o crescimento, desenvolvimento e disseminação desse patógeno<sup>3</sup>. A entrevista e a aplicação do questionário foram os meios complementares utilizados para obter informações sobre o comportamento dos biólogos durante o desenvolvimento de suas pesquisas em campo e o possível risco de exposição ao agente etiológico da histoplasmose.

A importância dos morcegos dentro da cadeia ecoepidemiológica da HP está bem estudada e estabelecida. No Brasil, o isolamento de *H. capsulatum* a partir de solo de cavernas habitadas por morcegos foi publicado pela primeira vez, em 1973, na cidade de Brasília (DF), por Schmidt et al.<sup>10</sup>, que também isolaram o fungo das vísceras e sangue de morcegos capturados no interior das cavernas. Suzaki et al.<sup>11</sup> descreveram a ocorrência de histoplasmose pulmonar aguda (HPA)

entre turistas japoneses que visitaram cavernas contendo fezes de morcegos. Jülg et al.<sup>12</sup> relataram três casos de pesquisadores que adquiriram histoplasmose, mesmo estando a uma distância mínima de 1 metro da entrada da caverna. Segundo os autores, o voo dos morcegos na região de entrada da caverna foi suficiente para dispersar os conídios fúngicos e causar infecção. A literatura apresenta também o papel de outras espécies de animais na ecoepidemiologia da HP. Silva-Vergara et al.<sup>13</sup> demonstraram o isolamento de *H. capsulatum* no Estado de Minas Gerais, a partir de cultura de vísceras de *Didelphis albiventris*, uma espécie de marsupial encontrado no Brasil. Os autores chamam a atenção para a ampla distribuição geográfica desse mamífero pelo continente, a qual coincide com a distribuição da HP. Nesse trabalho, a maioria dos entrevistados citou a presença de morcegos, marsupiais e/ou aves no interior das cavernas. Além disso, a captura de espécimes de morcegos e outros animais, além da coleta de amostras de solo, foram relatados por diversos indivíduos do grupo avaliado.

Microepidemias de HP após visita a cavernas situadas no continente americano e habitadas por morcegos têm sido descritas por diversos autores<sup>2,5,10,11,14,15</sup>. Panackal et al.<sup>5</sup> descrevem que o processo infeccioso causado por *H. capsulatum* tem sido considerado por diversos pesquisadores como doença recreacional entre espeleólogos, apontando que 60 a 64% dos indivíduos que possuem o hábito de frequentar cavernas e/ou grutas apresentam teste cutâneo positivo à histoplasmina. No presente estudo, observou-se que 94,1% dos indivíduos avaliados apresentaram anticorpos anti-*H. capsulatum*, pela técnica de *immunoblotting*. Erkens et al.<sup>14</sup> descrevem a presença de anticorpos circulantes da classe IgG anti-*H. capsulatum*, empregando a mesma metodologia, em cinco integrantes de um grupo de oito pesquisadores alemães que haviam passado dez dias em Cuba, estudando os hábitos de morcegos. Recentemente, Vicentini-Moreira et al.<sup>15</sup> relataram a presença de anticorpos específicos no soro de 34 pacientes em um grupo de 35, com suspeita de histoplasmose pulmonar aguda (HPA), que visitaram cavernas na região de Arapeí, São Paulo, Brasil.

Estima-se que cerca de 90 a 95% dos indivíduos que se infectam por *H. capsulatum* não desenvolvem a doença (HP infecção) ou apresentam sintomatologia clínica leve, sendo o curso da doença, em geral, autolimitado, com regressão espontânea dos sintomas, quadro conhecido como HPA<sup>2</sup>. Esta última é a forma clínica frequentemente

encontrada no Brasil em indivíduos imunocompetentes, sendo que os sinais clínicos comumente observados são febre, calafrios, tosse seca, dor torácica pleurítica ou subesternal, mal-estar, mialgia e artralgia, e também eritema nodoso e multiforme. A gravidade da doença, em indivíduos imunocompetentes, parece estar relacionada ao número de microaleuroconídios inalados, ou seja, tamanho da carga fúngica e ao tempo de exposição. Períodos curtos, como 20 minutos, proporcionam sintomas leves; enquanto estima-se que uma exposição de 50 a 60 horas pode acarretar no desenvolvimento de doença grave e, por vezes, fatal<sup>3</sup>.

No grupo estudado, apenas um indivíduo relatou ter procurado serviço médico após regressar de uma visita a cavernas em Bonito (MS), Brasil, apresentando febre, dispneia, expectoração amarelada, dor no peito, sinais de fraqueza, episódios de alterações gástricas com náuseas, vômitos e emagrecimento. Panackal et al.<sup>5</sup> relatam casos de HPA em um grupo de quinze estudantes do estado da Geórgia (EUA) após visita à mina de prata localizada na Nicarágua. Três dias após o retorno do grupo para os Estados Unidos, 12 (80%) indivíduos apresentaram sinais clínicos de doença respiratória aguda com picos febris, compatíveis com HPA, confirmada posteriormente por meio de provas sorológicas. Erkens et al.<sup>14</sup> registraram que duas pessoas do grupo de cientistas acompanhados relataram a utilização de máscaras faciais e não apresentaram nenhuma sintomatologia, enfatizando assim, a necessidade e importância do uso de equipamentos de proteção individual para pessoas que visitam cavernas. Observamos que o emprego de EPIs não é prática comum entre os biólogos do grupo avaliado. Durante as entrevistas, apenas um indivíduo relatou ter usado máscara facial quando empreendeu visita a uma caverna sabidamente infestada por *H. capsulatum*.

Historicamente, a identificação de anticorpos circulantes anti-*H. capsulatum* em soros de pacientes com HP tem se revelado de suma importância no diagnóstico confirmatório, bem como no prognóstico da doença<sup>3,4</sup>. A histoplasmina ou filtrado de cultura da fase miceliana de *H. capsulatum* tem sido fonte de antígenos para os ensaios sorológicos, sendo caracterizada por apresentar duas frações antigênicas de particular importância, o antígeno H (120 kDa) e o antígeno M (94 kDa). Ambas são tidas como sendo proteínas espécie-específicas<sup>4</sup>. Segundo Wheat<sup>4</sup>, a histoplasmina tem se mostrado útil na detecção de anticorpos pelas provas de imunodifusão dupla, sendo que mais de 80% dos indivíduos com HPA e HP crônica

apresentam positividade nesse ensaio, podendo ou não estar associados à doença ativa. A reatividade do soro de paciente face ao antígeno M sugere que o indivíduo tenha entrado em contato com *H. capsulatum* ou tenha sido imunizado com histoplasmina<sup>3,4</sup>. A detecção do antígeno H indica HP ativa, podendo ser observada até dois anos após a cura clínica do paciente, raramente ocorre na ausência de M<sup>3,4</sup>. Com base nos resultados obtidos nos testes sorológicos, relacionando com as regiões frequentemente visitadas pelo grupo estudado, foi possível inferir que esses indivíduos certamente frequentaram regiões consideradas reservadas para *H. capsulatum*.

Vale a pena salientar que, no presente estudo, verificou-se por *immunoblotting* que 52,9% dos biólogos reagiram frente à glicoproteína de 43 kDa de *P. brasiliensis* e 76,4% frente as frações proteicas de *A. fumigatus*. Essa observação corrobora que a prática da espeleologia e/ou turismo ecológico propicia a exposição dos indivíduos a outras espécies fúngicas que habitam saprofiticamente o meio ambiente, especialmente, *H. capsulatum*, sugerindo, assim, um possível fator de risco para infecções. O risco da HP, portanto, deve ser levado em consideração pelos indivíduos que buscam o ecoturismo como uma forma de lazer ou trabalho.

Apesar de considerar-se praticamente impossível o controle de acesso dos indivíduos a áreas que apresentam potencial para infecção por *H. capsulatum*, julga-se necessária a conscientização dos mesmos quanto aos riscos envolvidos. Sendo assim, como medidas preventivas, sugere-se que os órgãos de saúde, como os Grupos de Vigilância Epidemiológica, alertem tanto a população como as agências de viagem que organizam atividades voltadas ao ecoturismo ou lazer rural sobre a necessidade do uso de máscara para adentrarem nas cavernas, bem como seja informado que a coleta e transporte de solo, pedras, plantas e animais não são recomendados, uma vez que constituem potenciais fontes de infecção.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Mônica Cândida G. Scola e a Lia Teixeira Bastos da Seção de Coleção de Culturas, pela liofilização dos antígenos utilizados. Agradecemos também ao grupo de biólogos que concordaram em participar deste trabalho. **Suporte Financeiro:** Instituto Adolfo Lutz, Projeto CTC-IAL#06/04.

#### REFERÊNCIAS

1. Guimarães AJ, Nosanchuk JD, Zancopé-Oliveira RM. Diagnosis of histoplasmosis. *Braz J Microbiol*. 2006;37:1-13.
2. Ferreira MS, Borges AS. Histoplasmosis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009;42(2):192-8.
3. Wheat LJ, Kauffman CA. Histoplasmosis. *Infect Dis Clin North Am*. 2003;17(1):1-19.
4. Wheat LJ. Current diagnosis of histoplasmosis. *Trends Microbiol*. 2003;11(10):488-94.
5. Panackal AA, Hajjeh RA, Cetron MS, Warnock DW. Fungal infections among returning travelers. *Clin Infect Dis*. 2002;35(9):1088-95.
6. Manzini EJ. Considerações sobre a elaboração de roteiro para entrevista semiestruturada. *In: Marqueline MC, Almeida MA, Omote S, organizadores. Colóquios sobre pesquisa em Educação Especial*. Londrina: Eduel; 2003. p.11-2.
7. Kaufman ED, Standard P. Fungal exoantigens. *In: Drouhet E, Cole GT, Repentigny L, Latge JP, Dupont B, editors. Fungal antigens. Isolation, purification and detection*. New York and London: Plenum Press; 1988. p.111-2.
8. Ouchterlony, O. Antigen-antibody reactions in gels. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1949;26(4):507-15.
9. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979;76(9):4350-4.
10. Schmidt S, Machado OP, Galvão AB. Microepidemia de histoplasmose em zona rural de Brasília-DF. II Estudo epidemiológico e parasitológico da fonte de infecção. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1973;7:107-15.
11. Suzaki A, Kimura M, Kimura S, Shimada K, Miyaji M, Kaufman L. An outbreak of acute pulmonary histoplasmosis among travelers to a bat-inhabited cave in Brazil. *Kansenshogaku Zasshi*. 1995;69(4):444-9.
12. Jülg B, Elias J, Zahn A, Köppen S, Becker-Gaab C, Bogner JR. Bat-associated histoplasmosis can be transmitted at entrances of bat caves and not only inside the caves. *J Travel Med*. 2008;15(2):133-6.
13. Silva-Vergara ML, Martinez R, Borges-Malta ME, Leite-Maffei CM, Ramirez LE. *Histoplasma capsulatum* isolated from *Didelphis albiventris* (Marsupialia Didelphidae) in the state of Minas Gerais, Brazil. *Rev Iberoam Micol*. 2001;18(4):180-2.
14. Erkens K, Lademann M, Tintelnot K, Lafrenz M, Kaben U, Reisinger EC. Histoplasmosis group disease in bat researchers returning from Cuba. *Dtsch Med Wochenschr*. 2002;127(1-2):21-5.
15. Vicentini-Moreira AP, Kohara VS, Passos AN, Feliciano RS, Barreto LC, Freitas RS, et al. Microepidemia de histoplasmose no município de Arapeí, São Paulo. *BEPA*. 2008;5(58):8-11.

## Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) for identifying *Mycobacterium bovis* isolates from the modified Middlebrook 7H11 agar thin layer technique

Avaliação da técnica de reação de polimerase em cadeia (PCR) para identificação de *Mycobacterium bovis* em microcolônias isoladas em camada delgada de ágar Middlebrook 7H11 modificado

RIALA6/1533

Tatiana Reis do ROSÁRIO<sup>1\*</sup>, Cristina Corsi DIB<sup>2</sup>, Eliana ROXO<sup>2</sup>, Sônia Regina PINHEIRO<sup>1</sup>, Silvio Arruda VASCONCELLOS<sup>1</sup>, Nilson Roberti BENITES<sup>1</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Laboratório de Zoonoses Bacterianas, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, CEP: 05508-270, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: tatianareis@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, São Paulo, SP

Recebido: 28.06.2012 - Aceito para publicação: 22.11.2012

### ABSTRACT

The associated use of the modified Middlebrook 7H11 agar thin layer technique and the Polymerase Chain Reaction (PCR) assay enabled to perform the early identification of microcolonies of *Mycobacterium bovis* from 12<sup>th</sup> to 25<sup>th</sup> day of culture. In order to reduce the time for performing the *Mycobacterium bovis* identification, the combined use of these two techniques was evaluated by analyzing the microcolonies of mycobacteria at the 8<sup>th</sup> day after culturing. Until the last day of analysis, all of the PCR-positive samples already showed the microcolonies. Therefore, the early diagnosis of bovine tuberculosis is feasible, without an apparent macroscopic colonies growth.

**Keywords.** tuberculosis, *Mycobacterium bovis*, diagnostic techniques and procedures, Polymerase Chain Reaction, early diagnosis.

### RESUMO

A associação da técnica de cultivo em camada delgada no meio de ágar Middlebrook 7H11 modificado com a Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) possibilitou a identificação precoce de *Mycobacterium bovis* em colônias macroscópicas entre o 12<sup>o</sup> e o 25<sup>o</sup> dia de crescimento. Com o objetivo de diminuir o tempo necessário para efetuar a identificação de *Mycobacterium bovis*, avaliou-se o uso combinado dessas duas técnicas, em microcolônias de micobactérias, no oitavo dia pós-semeadura. Até o último dia de observação, todas as amostras com positividade no ensaio da PCR já apresentavam crescimento microscópico, possibilitando-se a realização de diagnóstico precoce da tuberculose bovina mesmo sem aparente crescimento macroscópico das colônias.

**Palavras-chave.** tuberculose, *Mycobacterium bovis*, técnicas e procedimentos diagnósticos, PCR, diagnóstico precoce.

## INTRODUCTION

*Mycobacterium bovis* is the causative agent of bovine tuberculosis, a disease responsible for losses to agriculture worldwide that amount to 3 billion dollars, and that has serious repercussions in public and animal health<sup>1</sup>.

Early detection of the causative agent in food-producing animals is important to cull infected animals in a herd, and to adopt adequate measures to locate outbreaks and, consequently, reduce the risk of products of animal origin serving as sources of infection to humans<sup>2</sup>. Infection is confirmed by the isolation and identification of *M. bovis*<sup>3,4</sup>. Isolation of *M. bovis* may be carried out by Petroff's traditional method and culture with egg-based media, such as Stonebrink medium, or agar-based media, such as modified Middlebrook 7H11 medium, both of which have sodium pyruvate as the carbon source. However, identification by biochemical or molecular methods<sup>3</sup> is done only after growth is visible. This occurs after 3 to 5 weeks of incubation, and may take more than 12 weeks in Stonebrink medium, or between 12 to 26 days in modified Middlebrook 7H11 medium<sup>3,5</sup>.

In order to decrease the time to *M. bovis* detection, several molecular methods, such as Polymerase Chain Reaction (PCR), have been employed in the diagnosis of bovine tuberculosis using samples of suspect tuberculosis lesions. This technique, however, has low sensitivity when carried out straight in tissue samples, due to the difficulty in extracting DNA from the samples, the variable amount of bacilli found in the lesions, the presence of PCR inhibitors, contamination with DNA from the host and other microorganism species<sup>3,6-8</sup>, making it necessary to use PCR in colonies obtained by isolation, which is the gold standard for diagnosis.

In an attempt to reduce time to diagnosis, in a previous study modified Middlebrook 7H11 medium thin layer technique was used for the isolation of *M. bovis* in suspect bovine tuberculosis lesions collected from cattle and buffaloes in commercial slaughterhouses, followed by PCR for the identification of the colonies. Thus, the number of days to diagnosis was reduced to 12-25, compared with 42 to 91 days required for visible colonies in Stonebrink medium. As diagnosis confirmation by PCR was carried out after macroscopic growth of the colonies, the present study evaluated the association of modified Middlebrook 7H11 medium thin layer technique and PCR before macroscopic colonies

were visible. Plates were observed for no more than 12 days to achieve the earliest possible diagnosis in samples with lesions suggestive of tuberculosis.

## MATERIAL AND METHODS

A total of 10 samples of bovine tuberculosis suspect lesions. Eight of them were considered positive in a previous study, after processing and culture in Stonebrink medium and modified Middlebrook 7H11 medium thin layer culture<sup>9</sup>, followed by confirmation by PCR (Table 1).

**Table 1.** Growth of colonies in plates with Middlebrook 7H11 and Stonebrink tubes with respective PCR results according to the experimental groups

SAMPLES		PLATES				TUBES			
Number	Identification	A <sup>a</sup>	B	Status	PCR <sup>f</sup>	A	B	Status <sup>g</sup>	PCR
1	12	+ <sup>b</sup>	- <sup>c</sup>	POS <sup>d</sup>	POS	+	+	POS	POS
2	16	+	+	POS	POS	+	+	POS	POS
3	32	+	+	POS	POS	+	+	POS	POS
4	34	+	+	POS	POS	+	+	POS	POS
5	36	-	+	POS	POS	+	+	POS	POS
6	37	+	+	POS	POS	+	+	POS	POS
7	39	+	-	POS	POS	+	+	POS	POS
8	40	+	+	POS	POS	+	-	POS	POS
9	47	-	-	NEG <sup>e</sup>	**	-	-	NEG	NEG
10	49	-	-	NEG	POS	-	-	NEG	NEG

a - plate ou tube A/plate ou tube B; b - presence of colonies in plates or tubes; c - absence of colonies in plates or tubes; d - positive sample; e - negative sample; f - Polimerase Chain Reaction; g - Result of the sample in plates, tubes or PCR; \*\* - Not executed.

The ten samples were decontaminated by Petroff's traditional method<sup>10</sup> and cultured in plates with modified Middlebrook 7H11 medium, in duplicate, in a total of 20 plates. The attempt was to have an earlier perception of the colonies and to identify them by PCR, no matter the macroscopic growth of the colonies.

Readings in optical microscope were carried out on days 5, 8 and 12 after culture. On the 13<sup>th</sup> day, plates were removed from the incubator and opened in a level 3 microbiological safety cabinet. All the content on the surface of the medium was scraped with a disposable loop, and resuspended in 1.5-mL tubes with sterile ultrapure water. Inactivation was carried out by boiling at 100 °C for five minutes, followed by freezing at -20 °C for at least one hour before use<sup>11</sup>.

Thawed samples were submitted to PCR using primers JB-21 (5' TCGTCCGCTGATGCAAGTGC 3') and JB-22 (5' CGTCCGCTGACCTCAAGAAG 3'), described by Rodriguez et al.<sup>12</sup> for the identification of *Mycobacterium bovis*, generating a 500-bp final product.

Amplification with primers JB-21 and JB-22 was carried out in a thermocycler, with initial treatment at 94 °C for two minutes, followed by 35 cycles at three different temperatures: denaturation at 94 °C for 30 seconds, hybridization at 64 °C for 30 seconds, and extension and annealing at 72 °C for 60 seconds. After the last cycle, samples were kept at 72 °C for five minutes, and the amplified product was analyzed in a horizontal electrophoresis system. Agarose gels 1.5% containing 0.01% ethidium bromide were analyzed under ultraviolet light and photographed.

## RESULTS AND DISCUSSION

From the ten samples in modified Middlebrook 7H11 medium thin layer culture, nine were considered positive and submitted to confirmation by PCR. As no macroscopic growth was observed, this stage was interrupted on day 12 after culture. The only sample considered negative in the thin layer plates was also negative in PCR. However, two plates considered positive were not confirmed in PCR

**Table 2.** Results of the observation by optical microscopy of the positivity of the samples on plates containing modified Middlebrook 7H11 thin layer and confirmed by polymerase chain reaction (PCR)

SAMPLES		PLATES			PCR <sup>f</sup>
Number	Identification	A <sup>a</sup>	B	Status <sup>g</sup>	Result
1	12	+ <sup>b</sup>	+	POS <sup>d</sup>	POS
2	16	+	+	POS	POS
3	32	+	+	POS	POS
4	34	+	+	POS	POS
5	36	+	+	POS	POS
6	37	+	+	POS	NEG
7	39	+	+	POS	POS
8	40	+	+	POS	POS
9	47	- <sup>c</sup>	-	NEG <sup>e</sup>	NEG
10	49	+	+	POS	NEG

<sup>a</sup> - = plate ou tube A/plate ou tube B; <sup>b</sup> - presence of colonies in plates or tubes; <sup>c</sup> - absence of colonies in plates or tubes; <sup>d</sup> - positive sample; <sup>e</sup> - negative sample; <sup>f</sup> - Polimerase Chain Reaction; <sup>g</sup> - Result of the sample in plates, tubes or PCR.

Although the nine samples positive in this second stage were also positive in the first one, negative PCR results for samples 37 and 49 may be partially related to the amount of colonies collected from the plates to be used in PCR. Although PCR may detect very small amounts of live and dead bacilli in the sample<sup>13</sup>, as there was no macroscopic growth in the marked areas at the

moment of colony collection, only the location marked during reading in the microscope was considered. Thus, it is possible that, in this case, culture medium collection with the loop was not adequate.

In spite of the fact that the colonies were visually similar to those observed by Marcondes et al.<sup>5</sup> and Dib et al.<sup>14</sup>, at initial stages, they may also be similar to those of other bacteria, leading to negative results in PCR. Bacteria of the genus *Nocardia* may have filamentous and bacillary forms<sup>15</sup>, and may sometimes be mistakenly considered mycobacteria in the initial stages of growth, reinforcing the importance of the association of methods with PCR in the identification of *M. bovis*.

Results for the period of observation for presence or absence of mycobacteria growth in microscopic colonies in modified Middlebrook 7H11 thin layer culture showed seven of the plates with positive results in isolation and PCR. On the 8<sup>th</sup> day after culture, all samples that were confirmed to be positive in PCR had already been considered positive in culture, but observation continued until the 12<sup>th</sup> day because there were expectations for visible macroscopic growth that would confirm microscopic findings.

It is believed that this stage led to greater accuracy in the observation of the colonies due to the visual training carried out in the first stage of the experiment, which enabled the identification of the initial growth stages and the differentiation of cell debris<sup>5</sup>. Thus, at 5 days after culture, it was possible to safely state that the three plates considered positive in the second stage showed initial colony growth.

It was observed that, when reduction of time to reading is prioritized, the absence of macroscopic growth may lead to errors in the technique or insufficient amounts of sample for PCR, increasing the probability of having false positive results. However, the association of PCR for earlier confirmation of the results (12 days instead of the 36 days observed in previous studies) seems to be advantageous, as microscopic findings may be confirmed without the apparent need for observing macroscopic colony growth.

## REFERENCES

- Bermudez HR, Renteria ET, Medina BG, Hori-Oshima S, De La Mora VAV, Lopez VG, et al. Correlation between histopathological, bacteriological and PCR diagnosis of bovine tuberculosis. *J Anim Vet Advances*. 2010;9:2082-8.

2. Hosek J, Svastova P, Moravkova M, Pavlik I, Bartos M. Methods of mycobacterial DNA isolation from different biological material: a review. *Vet Med-Czech*. 2006;51:180-92.
3. OIE. Bovine tuberculosis. In: OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 2009. Chapter 2.4.7. 16p. Available from: [<http://www.oie.int/en/international-standard-settin/terrestrial-manual/access-online>].
4. Stewart LD, McNair J, McCallan L, Thompson S, Kulakov LA, Grant IR. Production and evaluation of antibodies and phage display-derived peptide ligands for immunomagnetic separation of *Mycobacterium bovis*. *J Clin Microbiol*. 2012;50:1598-605.
5. Marcondes AG, Shikama MLM, Vasconcellos SA, Benites NR, Morais ZM, Roxo E, et al. Comparação entre a técnica de cultivo em camada delgada de ágar Middlebrook 7 H11 e meio de Stonebrink para isolamento de *Mycobacterium bovis* em amostras de campo. *Braz J Vet Res Ani Sci*. 2006;43:362-9.
6. Stewart LD, McNair J, McCallan L, Gordon A, Grant IR. Improved detection of *Mycobacterium bovis* infection in bovine lymph node tissue using immunomagnetic separation (IMS) – based methods. *Plos One*. 2013;8:e58374.
7. Collins DM, Radford AJ, de Lisle GW, Billman-Jacobe H. Diagnosis and epidemiology of bovine tuberculosis using molecular biological approaches. *Vet Microbiol*. 1994;40:83-94.
8. Roxo E, Ikuno AA, Ferreira VCA, Harakava R, Ruggiero APM, Vialta A. Avaliação de diferentes protocolos de extração de DNA de *Mycobacterium bovis* a partir de leite. *Arq Inst Biol*. 2002;69 Supl:46.
9. Universidad de las Naciones Unidas. Nuevas tecnologías para el diagnóstico y pruebas de susceptibilidad a drogas de *M. tuberculosis* para países en vias de desarrollo. In: Programa de Biotecnología para Latinoamérica y el Caribe – BIOLAC. Red Latinoamericana y del Caribe de tuberculosis – RELACTB. La Paz (Bolivia); 1998:18-21.
10. De Kantor IN. Organización Panamericana de la Salud. Centro Panamericano de Zoonosis. Bacteriología de la tuberculosis humana y animal. Série de Monografías Científicas y Técnicas. 1998;11(1):63.
11. Bemer-Melchior P, Drugeon HB. Inactivation of *Mycobacterium tuberculosis* for DNA Typing Analysis. *J Clin Microbiol*. 1999;37:2350-1.
12. Rodriguez JG, Mejia GI, del Portillo P, Patarroyo ME, Murillo LA. Species-specific identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. *Microbiology*. 1995;141:2131-8.
13. Beige J, Lokies J, Schaberg T, Finckh U, Fischer M, Mauch H, et al. Clinical evaluation of a *Mycobacterium tuberculosis* PCR assay. *J Clin Microbiol*. 1995;33:90-5.
14. Dib CC, Morais ZM, Souza GO, Amaku M, Benites NR, Pinheiro SR. Utilização de uma técnica rápida para o diagnóstico de *Mycobacterium bovis* em amostras de leite experimentalmente inoculadas. *Arq Inst Biol*. 2006;73:149-55.
15. Trabuasi LR, Alterthum F. *Microbiologia*. 5.ed. São Paulo: Atheneu; 2008.

## Avaliação do grau de efeito toxicológico do diclorvós, após exposição inalatória em ambiente sem ventilação

### Evaluation of the toxicological effect grade of dichlorvos after its exposure in environment without ventilation

RIALA6/1534

---

Emerson Sanches NARCISO\*

\*Endereço para correspondência: Laboratório de Toxicologia, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Proteção Ambiental, Instituto Biológico, Av. Conselheiro Rodrigues Alves, 1252, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 04014-002. Tel.: (11) 5087-1757. E-mail: emerson@biologico.sp.gov.br

Recebido: 27.04.2012 – Aceito para publicação: 11.10.2012

---

#### RESUMO

Os inseticidas de uso domissanitário são utilizados para proteger o ambiente urbano. Porém, esses produtos propiciam risco à saúde. Neste experimento preliminar foi avaliado o grau de efeito tóxico em ratos, após a exposição inalatória ao diclorvós, um inseticida de uso domissanitário, em ambiente sem ventilação. O inseticida foi pulverizado no interior de uma câmara de vidro e os ratos foram expostos durante 6 e 24 h. A atividade da colinesterase plasmática foi analisada antes e após a exposição. O efeito da exposição inalatória refletiu-se sobre a depressão enzimática em até 37%. A permanência em ambiente sem ventilação ou arejamento por maior tempo acarretou maior grau de intoxicação.

**Palavras-chave.** diclorvós, exposição inalatória, efeito tóxico.

#### ABSTRACT

Household insecticides are used for protecting the urban environment. However, these product might cause health risk. This preliminary study aimed at evaluating the toxic effects of an insecticide for household use (dichlorvos) in rats by inhalation exposure in an unventilated environment. The insecticide was sprayed inside a glass chamber and the rats were exposed for 6 and 24 hours. The plasma cholinesterase activity was analyzed before and after the exposure. The effect of inhalation was reflected on the enzyme depression in association with the exposure length of time. The permanence in the environment without ventilation, for longer time, resulted in higher degree of intoxication.

**Keywords.** dichlorvos, inhalation exposure, toxic effect.

## INTRODUÇÃO

Os inseticidas são substâncias ou mistura de substâncias, formuladas, visando matar, reduzir, repelir, ou interromper o ciclo reprodutivo de determinados insetos considerados pragas. Seu uso como saneante desinfestante no controle de pragas sinantrópicas em áreas urbanizadas é uma prática comum, sendo aplicados em ambientes internos e externos para a proteção dos habitantes e das edificações.

A presença de inseticida no ambiente das edificações das áreas urbanizadas favorece a ocorrência de exposição não ocupacional ou intradomiciliar involuntária da população ao resíduo inseticida, após a aplicação. Esse resíduo poderá ser absorvido através das múltiplas vias expostas (oral, dérmica, inalatória). Em vista disso, o risco de ocorrerem efeitos adversos, mesmo que subclínicos, após a exposição existe e é representativo principalmente nas populações suscetíveis, tais como crianças, idosos, gestantes, pessoas adoentadas<sup>1-3</sup>.

Portanto, o ar interno e os elementos que compõem o ambiente das edificações urbanas são importantes fontes de informações referentes à contaminação e à exposição, particularmente daquelas substâncias de aplicação direta, como são os inseticidas<sup>1-3</sup>.

De modo geral, é maior a preocupação em relação ao uso de pesticidas na produção de alimentos, ou quanto à exposição ocupacional, do que na utilização urbana dos pesticidas, ou quanto à exposição não ocupacional. Embora amplamente utilizados, pouco se sabe a respeito das exposições não ocupacionais, do nível de concentração residual após a aplicação, ou se conhece medições quantitativas feitas para ambientes urbanos<sup>3</sup>. Na literatura internacional, estudos com enfoque nessa linha têm gerado informações a respeito do risco envolvido após a utilização desses produtos no ambiente das edificações urbanas. Considerando os prováveis efeitos adversos a partir de exposições involuntárias aos saneantes desinfestantes do tipo inseticida, cresce a necessidade de estudar as variáveis que influenciam a relação de causa e efeito na diversidade de cenários do ambiente urbano.

O ambiente urbano comporta uma população que passa grande parte da vida no interior das edificações, onde o uso de pesticidas é recorrente. Em média, um adulto gasta 87% de seu tempo nesse tipo de ambiente<sup>2</sup>. Com efeito, a exposição inalatória não ocupacional à inseticida de uso doméstico pode ocorrer num espaço de tempo dentro desse período.

A via inalatória é uma via de acesso para diferentes substâncias suspensas no ar: partículas, vapores e/ou gases. No caso dos inseticidas, o diclorvós possui pressão de vapor relativamente alta, portanto, essa via seria a rota mais provável de intoxicação acidental.

Dentro do grupo dos saneantes desinfestantes, o diclorvós, pertencente à classe dos organofosforados, expressa sua toxicidade inibindo a colinesterase. Existem dois tipos de colinesterase: a butirilcolinesterase, presente no plasma, fígado e outros tecidos; e a acetilcolinesterase, encontrada nos eritrócitos e sistema nervoso. Uma vez inibida, distúrbios de ordem colinérgica poderão se manifestar. Através da determinação do nível de inibição dessas enzimas, é possível detectar a ocorrência de exposição e determinar o grau de intoxicação após a exposição a organofosforados e carbamatos<sup>4,5</sup>.

Partindo dessa concepção, o objetivo deste experimento preliminar foi avaliar o grau de efeito tóxico da exposição inalatória em um modelo animal durante 6h e 24 h, em ambiente sem ventilação ou arejamento, após a pulverização do inseticida de uso domissanitário diclorvós.

## MATERIAL E MÉTODOS

Ratos (*Rattus norvegicus*) machos da linhagem *Wistar*, pesando aproximadamente  $250 \pm 50$  g foram acondicionados em gaiolas de polipropileno, sem restrição de água ou alimento e mantidos em biotério de experimentação na condição de temperatura ambiente, umidade relativa entre 50 e 70% e ciclo de fotoperíodo.

Dezoito animais foram distribuídos ao acaso em seis grupos de três e sorteados para a exposição inalatória em dois diferentes períodos: grupos 1, 2 e 3 para o período de 6 h; grupos 4, 5 e 6 para o período de 24 h. O experimento foi realizado em dias alternados com a exposição ao inseticida de um grupo por dia. No intervalo de um dia entre cada repetição, a câmara foi lavada com água e sabão (pH neutro) e seca. A remoção de possíveis resíduos remanescentes da pulverização foi feita com álcool etílico 95% borrifado no vidro da câmara e removido com papel toalha.

A avaliação do efeito tóxico do diclorvós foi feita através da determinação da atividade da colinesterase plasmática. Na pré-exposição, foram colhidos 2 mL de sangue por punção do plexo retroorbital de cada animal, em tubos heparinizados. O plasma foi separado por centrifugação a 2000 rpm por 10 min, e a atividade da colinesterase plasmática de cada animal foi determinada

em triplicata pelo método espectrofotométrico de Ellman et al.<sup>4</sup> modificado por Wilhelm<sup>5</sup>, em comprimento de onda de 430 nm. Para tanto, pipetou-se 2,75 mL de tampão fosfato pH 7,4, 100 µL de ácido (5,5' ditiobis) 2-nitrobenzoico (DTNB), 50 µL de plasma e 50 µL de acetiltiocolina (substrato).

Para o fim proposto, cada grupo foi disposto ao centro, no interior de uma câmara de vidro com 4,0 m<sup>3</sup> e a 1 m de altura do piso (zona de respiração). Em seguida, da altura de 25 cm, foi pulverizado o formulado comercial concentrado emulsionável (CE) do diclorvós (2,2-diclorovinil dimetil fosfato) (CAS number 62-73-7), na concentração de 1,0 g.mL<sup>-1</sup> de ingrediente ativo (i.a.), equivalendo a 50 mL.m<sup>-2</sup> em uma área de 2 m<sup>2</sup>, e, para tanto, foi utilizado um pulverizador de compressão prévia. Após a pulverização a porta da câmara foi fechada e assim permaneceu até o final de cada período de exposição. Ao final de cada período, cada grupo foi retirado do interior da câmara de vidro e eutanaziado, para coleta de sangue e determinação da atividade da colinesterase plasmática.

A porcentagem de inibição da colinesterase foi estimada a partir da média dos valores registrados na pré e pós-exposição de cada rato. Os valores da pós-exposição dos dois períodos foram comparados estatisticamente, através do Teste *t* de Student, comparação entre médias de amostras independentes (unilateral), com  $\alpha = 0,05$ .

Os procedimentos experimentais utilizando animais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto Biológico (CETEA-IB nº 71/08).

## RESULTADOS

Os resultados da colinesterase plasmática obtidos dos animais dos grupos 1, 2 e 3 expostos por 6 h revelaram comprometimento da atividade da enzima estimada em 26% (Tabela 1). Não foi identificado nenhum sinal clínico de intoxicação provocado pela exposição ao inseticida nos animais desses grupos.

Os resultados encontrados nos grupos 4, 5 e 6, expostos por 24 h, evidenciaram uma inibição na atividade da enzima estimada em 37% (Tabela 1). Nesses animais foi possível observar sinais clínicos de intoxicação de intensidade leve, do tipo fasciculação e irritabilidade.

A diferença de 11% entre os dois períodos de exposição é estatisticamente significativa (*p* valor =

0,03), demonstrando que a atividade da colinesterase plasmática foi inibida em maior proporção nos grupos expostos por 24 h do que naqueles que permaneceram expostos por 6 h.

**Tabela 1.** Médias ( $\pm$  DP) da atividade da colinesterase plasmática e inibição

Período (h)	Atividade da colinesterase plasmática ( $\Delta E.mL^{-1}.min^{-1}$ )		Inibição (%)
	Pré-exposição	Pós-exposição	
6	1,01 $\pm$ 0,15	0,75 $\pm$ 0,17	25,7
24	0,97 $\pm$ 0,12	0,61 $\pm$ 0,11	37,1

## DISCUSSÃO

Apesar da ampla utilização de inseticidas nos ambientes das edificações urbanas, pouco se discute a respeito das exposições não ocupacionais ou involuntárias da população, do nível de concentração residual do inseticida após sua aplicação e do risco envolvido nesse cenário.

Com a câmara de vidro, pretendeu-se simular um ambiente intradomiciliar pequeno, sem ventilação ou arejamento, a fim de conhecer o efeito do diclorvós nesse cenário de exposição.

Após a pulverização, o resíduo gerado favorece a exposição involuntária da população por múltiplas vias e esse fato amplia o nível de exposição<sup>1-3</sup>. Dentro desse contexto, este experimento foi configurado para evitar a possibilidade de exposição por múltiplas vias e favorecer a via inalatória.

Sendo assim, as magnitudes da contaminação e da exposição estão relacionadas a fatores que envolvem a volatilidade do ingrediente ativo, tipo de aplicação, característica do ambiente, concentração do inseticida no ambiente, período de exposição e suscetibilidade da população. Toxicologicamente, os efeitos adversos estão associados à toxicidade do inseticida, à via exposta e à dose absorvida<sup>1,2</sup>.

Na condição sem ventilação ou arejamento, a concentração do diclorvós na câmara provavelmente se dissipou pouco. Dados obtidos a partir do monitoramento do diclorvós em ambiente sem ventilação, indicam que ele dissipa pouco no ar interno de edificações, atingindo menor nível de concentração após 18 h da aplicação. Em contrapartida, em ambiente ventilado registrou-se redução na concentração 10 h após a aplicação<sup>6</sup>. Fenômeno semelhante foi observado por Fenske et al.<sup>7</sup>,

que quantificaram em diferentes períodos os vapores do inseticida clorpirifós em ambiente doméstico sem ventilação e com ventilação. No ambiente sem ventilação, constataram que a concentração do inseticida no ar ambiente se elevou imediatamente após a aplicação, atingindo um pico após 7 h que declinou até 24 h.

Ainda que se considere a possibilidade de declínio da concentração do diclorvós somado à sua baixa atividade residual, não foi possível saber através da exposição contínua dos ratos qual era o período de maior concentração dos vapores do inseticida. Entretanto, foi a exposição constante que indicou qual período ofereceu maior risco. Portanto, o nível de inibição da enzima caracterizou a duração da exposição como determinante para o efeito medido, pois a quantidade do inseticida presente no ar da câmara estava em nível suficiente para comprometer a atividade normal da colinesterase plasmática dos grupos expostos nos períodos de 6 e 24 h. Assim sendo, o efeito registrado como resultado da exposição inalatória mostrou que a maior possibilidade de intoxicação foi pertinente ao período de 24 h, no qual os grupos expostos (4, 5 e 6) manifestaram visíveis sinais clínicos de intoxicação.

Logo, esse ambiente experimental mostrou-se insalubre, acarretando efeito adverso no organismo exposto. Por conseguinte, em qualquer ambiente sem ventilação ou arejamento, após a pulverização do diclorvós, poderá apresentar risco ao indivíduo exposto. E quanto maior for o período de exposição nesse ambiente maior será o risco.

Contudo, a inibição da atividade enzimática correlacionada com a intensidade e duração da exposição, embora tenha causado certo grau de intoxicação nos animais expostos, não foi considerada de extrema gravidade, pois a porcentagem de inibição não alcançou um valor significativo, mesmo para o maior período de exposição. A expectativa era de que o nível de inibição da colinesterase plasmática alcançasse no mínimo 50%. Assim, seria provável supor um maior comprometimento da acetilcolinesterase<sup>8</sup>, resultando num quadro de intoxicação mais acentuado, devido a maior importância fisiológica da acetilcolinesterase no sistema nervoso<sup>9</sup>.

O diclorvós, embora seja um inseticida altamente tóxico, inibidor direto da colinesterase, aplicado em ambiente sem ventilação, com inalação imediata e continua durante 6 ou 24 h por uma população sensível, não causou um impacto severo

sobre a saúde dos ratos. O grau de efeito tóxico indicou um cenário de importância toxicológica relativa, que possivelmente regrediria quando interrompida a exposição. Com efeito, num ambiente ventilado ou arejado a intoxicação provavelmente seria menor, fenômeno favorecido pela característica do diclorvós, um inibidor reversível da colinesterase e rapidamente degradado, *in vivo*<sup>8</sup>.

Assim sendo, o resultado da avaliação do grau do efeito tóxico após a exposição inalatória dos animais na câmara sem ventilação ou arejamento mostrou significativa diferença no nível de exposição entre os períodos, dando a conhecer maior risco de intoxicação pertinente ao período mais prolongado de exposição, o de 24 h. Portanto, o grau de efeito tóxico caracterizou a causa e o efeito da exposição no mesmo tipo de ambiente.

O potencial risco à saúde e a escassez de discussão quanto ao uso de pesticidas nos ambientes internos ou externos das edificações urbanas justificam estudos com o propósito de gerar informações a respeito da contingência da exposição não ocupacional a esses produtos, auxiliando no esclarecimento a respeito dos riscos envolvidos.

---

#### APOIO

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo: 2008/05987-0).

---

#### REFERÊNCIAS

1. Krieger RI, Bernard CE, Dinoff TM, Ross JH, Williams RL. Biomonitoring of persons exposed to insecticides used in residences. *Ann Occup Hyg*. 2001;45(1001):S143-S153. Disponível em: [[http://annhyg.oxfordjournals.org/content/45/suppl\\_1/S143.full.pdf+html](http://annhyg.oxfordjournals.org/content/45/suppl_1/S143.full.pdf+html)].
2. Butte W. Sources and impacts of pesticides in indoor environments. *In: Indoor air pollution. Handbook Environm Chem*. 2004;4(F):89-116. Disponível em: [[http://faculty.ksu.edu.sa/Almutaz/Documents/Enviro\\_courses/ENVS-522/Indoor\\_Air\\_Pollution.pdf#page=93](http://faculty.ksu.edu.sa/Almutaz/Documents/Enviro_courses/ENVS-522/Indoor_Air_Pollution.pdf#page=93)].
3. Hahn S, Schneider K, Gartiser S, Heger W, Mangelsdorf I. Consumer exposure to biocides - identification of relevant sources and evaluation of possible health effects. *Environ Health*. 2010;9(7):2-11. Disponível em: [<http://www.ehjournal.net/content/9/1/7>].
4. Ellman GL, Courtney KD, Andres VJr, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*. 1961;7:88-95.
5. Wilhelm K. Determination of human plasma cholinesterase activity by adapted Ellman method. *Arh Hig Rad*. 1968;19:199-207.
6. IPCS. International Programme on Chemical Safety. Environmental health criteria for dichlorvos. 1988;79. [acesso 2012 set 17]. Disponível em: [<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc79.htm>].

7. Fenske RA, Black G, Elkner KP, Lee C, Methner MM, Soto R. Potential exposure health risks of infants following indoor residential pesticide applications. *Am J Public Health*. 1990;80(6):689-93. Disponível em: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1404741/pdf/amjph00219-0041.pdf].
8. Taylor JT, Davis E, Dabisch P, Horsmon M, Matson K, Crouse C, et al. Acute toxic effects of inhaled dichlorvos vapor on respiratory mechanics and blood cholinesterase activity in guinea pigs. *Inhal Toxicol*. 2008;20(5):465-72. Disponível em: [http://link.periodicos.capes.gov.br/sfxIcl41?url\_ver=Z39.88-2004&url\_ctx\_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:ctx&ctx\_enc=info:ofi/enc:UTF-8&ctx\_ver=Z39.88-2004&rft\_id=info:sid/sfxit.com:azlist&sfx.ignore\_date\_threshold=1&rft.object\_id=954925271384&svc.fulltext=yes].
9. Maroni M, Colosio C, Feriolo A, Fait A. Biological monitoring of pesticide exposure: a review. *Introduction. Toxicology*. 2000;143(1):9-37. Disponível em: [http://acs-cdn.com/S0300483X99001523/1-s2.0-S0300483X99001523main.pdf?\_tid=149a2810-f694-11e1-bad3-00000aab0f02&acdnat=1346765345\_b2448bb470025860f9bfbf5459ef9da3].

## Pericardite bacteriana com subsequente desenvolvimento de endocardite mural por levedura do complexo *Candida parapsilosis*

Bacterial pericarditis with subsequent development of mural endocarditis caused by *Candida parapsilosis* complex yeast

RIALA6/1535

Luiz Carlos Tesini CONSOLO<sup>1\*</sup>, Marilene Rodrigues CHANG<sup>2</sup>, Deborah Ledesma TAIRA<sup>2</sup>, Fernanda Luiza Espinosa SPOSITTO<sup>2</sup>, Lourdes Zélia ZANONI<sup>1</sup>, Yvone Maia BRUSTOLONI<sup>1</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Hospital Universitário, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Cidade Universitária, Campo Grande, MS, Brasil, CEP: 79080-190. Tel.: (67) 3345-7223. E-mail: tesini\_consolo@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Departamento de Farmácia e Bioquímica, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil

Recebido: 17.05.2012- Aceito para publicação: 05.11.2012

### RESUMO

A infecção primária do pericárdio e do endocárdio é rara. Este estudo descreve a evolução de uma criança com cardite reumática aguda, complicada com pericardite infecciosa bacteriana, secundária a abscessos de pele e endocardite fúngica. O tempo prolongado de internação, o uso de cateter venoso central e a antibioticoterapia de amplo espectro foram os fatores que provavelmente favoreceram a colonização, a candidíase invasiva e o desenvolvimento da endocardite por levedura do complexo *Candida parapsilosis*.

**Palavras-chave.** candidemia, endocardite, complexo *Candida parapsilosis*, pericardite.

### ABSTRACT

The primary infection of pericardium and endocardium rarely occurs. This study reports the evolution of a child with acute rheumatic carditis with subsequent pericardial bacterial infection, due to cutaneous abscess and fungal endocarditis. Probably, the long hospital stay, the usage of central venous catheter and the broad-spectrum antibiotics enhanced the colonization, the invasive candidiasis induction and the development of fungal endocarditis by *Candida parapsilosis* complex yeast.

**Keywords.** candidemia, endocarditis, *Candida parapsilosis* complex, pericarditis.

## INTRODUÇÃO

A pericardite bacteriana mais comumente encontrada é consequência de uma infecção adjacente ou decorrente de disseminação hematogênica de uma infecção à distância<sup>1</sup>.

A endocardite de etiologia fúngica é uma infecção com baixa incidência, representando de 1,3%-6% dos casos de endocardite infecciosa<sup>2</sup>. Raramente afeta o coração normal, ocorrendo predominantemente em pacientes com uso prolongado de cateter venoso central, antibioticoterapia, entre outros. Embora a *Candida albicans* seja a etiologia mais frequente, relatos recentes indicam um aumento da prevalência de outras espécies, em particular *C. Parapsilosis*<sup>2</sup>.

## RELATO DE CASO

Paciente em idade pré-escolar, feminino, branca, 4 anos, internada com queixa de dor na panturrilha durante 15 dias e uma semana com febre, dor e edema em joelho esquerdo. Durante três dias apresentou dispneia, dor torácica, abdominal e gemência. Histórico clínico revelou abscessos em nádegas e região periungueal por 20 dias. O exame físico apresentou as seguintes características:

- Frequência cardíaca (FC) = 118 bpm; frequência respiratória (FR) = 60 ipm; pressão arterial (PA) = 120x70 mmHg; temperatura axilar (Tax) = 36 °C; saturação não invasiva de oxigênio (SpO<sub>2</sub>) 92% em máscara de Venturi a 50%;
- Aspectos gerais: mau estado geral, obnubilada, gemente, toxemiada, dispneica, com retrações torácicas e estertores finos em bases pulmonares, turgência jugular, bulhas hipofonéticas (+), sopro sistólico +++/6+ em foco mitral, ritmo de galope;
- O fígado apresentou diâmetro de 6 cm do rebordo costal direito (RCD), doloroso à palpação;
- Pulsos simétricos, perfusão periférica de 3 s;
- Presença de pequeno abscesso no antebraço esquerdo.

Os exames laboratoriais detectaram:

- Hemoglobina (Hb) = 8,6 g/dl, hematócrito (Ht) = 27%, leucócitos = 17.000/mm<sup>3</sup>, bastões = 12%, neutrófilos = 71%, velocidade de

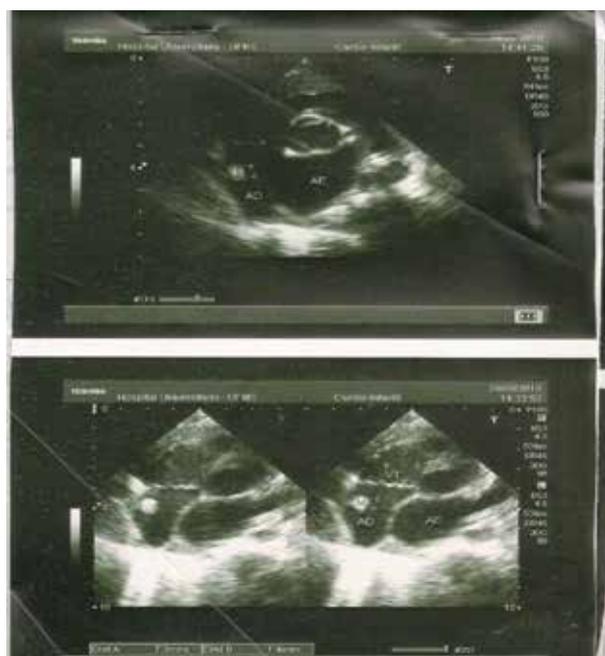
hemossedimentação (VHS) = 77 mm (1ª hora), mucoproteína = 19,2 mg/dl (tirosina), proteína-C-reativa (pCr) = 163 mg/l, imunoglobulinas normais e sorologia para HIV negativa.

Os exames de imagem apresentaram:

- Ecocardiografia inicial; hipoccontratilidade difusa; derrame pericárdico de moderado a importante; cardiomegalia ao RX.

As hipóteses diagnósticas iniciais foram febre reumática, insuficiência cardíaca congestiva e pericardite bacteriana.

Internada na Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica (UTI), a paciente foi submetida à drenagem pericárdica com retirada de 150 ml de líquido purulento. Após 3 dias foi submetida à drenagem do abscesso do antebraço e, após 5 dias, evoluiu com pneumonia e derrame pleural, necessitando de drenagem cirúrgica. A paciente permaneceu em ventilação mecânica por 9 dias. As culturas do líquido pericárdico, pleural e do abscesso evidenciaram *Staphylococcus aureus* (sensível à oxacilina, clindamicina e vancomicina). Pesquisa e cultura de BAAR foram negativas. Tratada com os antibióticos vancomicina e cefotaxima evoluiu com melhora inicial, no entanto manteve episódios diários de febre.



**Figura 1.** Ecocardiograma demonstrando imagem hiperecogênica, pediculada, aderida na parede do átrio direito, medindo 7,3 x 7,4 mm

Após 20 dias da internação, a ecocardiografia de controle evidenciou a presença de imagem hiperecogênica, aderida na parede do átrio direito, medindo 7,3 x 7,4 mm (Figura 1). Foram observadas fração de ejeção (FE) = 83%, encurtamento sistólico 50%, pericárdio espessado com discreto derrame e refluxo mitral significativo.

Na hemocultura realizada para investigação da etiologia da febre, houve crescimento de levedura identificada, fenotipicamente, como sendo do complexo *Candida parapsilosis*. A paciente recebeu anfotericina B desoxicolato por 43 dias, tendo sido suspensa após duas hemoculturas negativas para fungos. A opção pelo tratamento clínico da endocardite mural foi devido ao alto risco cirúrgico, pericardite bacteriana em resolução e ao quadro hemodinâmico desfavorável da grave insuficiência mitral. A ecocardiografia de controle evidenciou insuficiência mitral moderada a importante e ausência de vegetações. A paciente recebeu alta com tratamento para febre reumática.

## DISCUSSÃO

As infecções bacterianas, fúngicas e virais<sup>1-3</sup> podem acometer o pericárdio, porém, dentre esses agentes etiológicos, o vírus é o mais comum. Já entre as de etiologia bacteriana, *S. aureus* é a causa mais comumente relacionada à pericardite em crianças, ocorrendo em 40-80% dos casos<sup>1,4</sup>.

A partir de focos a distância, o estafilococo pode disseminar por via hematogênica causando infecções em outros órgãos e tecidos. A capacidade de produzir enzimas proteolíticas poderá facilitar este processo<sup>5</sup>.

As leveduras do complexo *Candida parapsilosis* são atualmente causa frequente de candidemia. Essa espécie é capaz de produzir biofilme como fator de virulência nos dispositivos intravenosos e colonizar a pele dos profissionais de saúde. Ela é responsável por 7%-15% dos episódios de candidemia nos Estados Unidos, e nos países da América Latina ocupa o segundo lugar<sup>6</sup>.

Dentre os fatores de risco mais frequentemente implicados na ocorrência de candidemia estão à utilização de antibióticos de largo espectro, imunossupressores, cateter venoso central e nutrição parenteral<sup>7-9</sup>. Essa paciente apresentava vários fatores de risco para o desenvolvimento da candidíase invasiva.

Este relato de caso alerta para a possibilidade da associação de agentes etiológicos múltiplos,

principalmente em pacientes críticos, com vários fatores que aumentam a chance de colonização e candidemia. Neste caso, mesmo sendo a paciente imunocompetente, o tecido cardíaco globalmente inflamado pelos processos da febre reumática propiciou as condições para a instalação de infecção pericárdica e endocárdica. A pericardite estafilocócica ocorreu como consequência da bacteremia proveniente dos abscessos e a endocardite fúngica secundária aos procedimentos invasivos necessários no manuseio do paciente grave. No tratamento da endocardite fúngica está indicado anfotericina B lipossomal ou associação de azólicos e equinocandinas<sup>10-12</sup>. Outro ponto a ser destacado foi a resposta favorável à monoterapia antifúngica, sem a necessidade da clássica intervenção cirúrgica<sup>12</sup>. O relato presente é relevante, uma vez que aborda a necessidade de atenção dos clínicos para uma infecção grave em paciente de risco.

## AGRADECIMENTOS

À FUNDECT- MS e ao CNPq, pelo suporte financeiro. Este estudo tem vinculação com o Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste – UFMS, MS.

## REFERÊNCIAS

1. Valente AM, Jain R, Scheurer M, Fowler VG Jr, Corey GR, Bengur AR, et al. Frequency of infective endocarditis among infants and children with *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Pediatrics*. 2005;115(1):15-9.
2. Garzoni C, Nobre VA, Garbino J. *Candida parapsilosis* endocarditis: a comparative review of the literature. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2007;26(12):915-26.
3. Cardoso JN, Ochiai ME, Oliveira Jr MT, Morgado P, Munhoz R, Andretto FE, et al. Endocardite infecciosa causada por *Eikenella corrodens*. *Arq Bras Cardiol*. 2005;85(1):63-4.
4. Ratnapalan S, Brown K, Benson L. Children presenting with acute pericarditis to the emergency department. *Pediatr Emerg Care*. 2011;27(7):581-5.
5. Jenkins TC, Sabel AL, Sarcone EE, Price CS, Mehler PS, Burman WJ. Skin and soft-tissue infections requiring hospitalization at an academic medical center: opportunities for antimicrobial stewardship. *Clin Infect Dis*. 2010;51(8):895-903.
6. Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouér SA, Arthington-Skaggs B, Matta DA, et al. Epidemiology of Candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol*. 2006;44(8):2816-23.
7. Tortorano AM, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Kibbler CC, Faure O, et al. Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology

- (ECMM) hospital-based surveillance study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004;23(4):317-22.
8. Pappas PG, Rex JH, Lee J, Hamill RJ, Larsen RA, Powderly W, et al. A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Clin Infect Dis*. 2003;37(5):634-43.
  9. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis*. 2004;39(3):309-17.
  10. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK, Calandra TF, Edwards JE, et al. Clinical practice guidelines for the management of Candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2009;48:503-35.
  11. López-Ciudad V, Castro-Orjales MJ, León C, Sanz-Rodríguez C, de la Torre-Fernández MJ, Pérez de Juan-Romero MA, et al. Successful treatment of *Candida parapsilosis* mural endocarditis with combined caspofungin and voriconazole. *BMC Infect Dis*. 2006;11(6):73.
  12. Colombo AL, Guimarães T, Camargo LFA, Richtmann R, Queiroz-Telles F, Salles MJC, et al. Tratamento das principais infecções causadas por *Candida spp.*: relato de reunião conjunta de três sociedades médicas (Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia, Sociedade Brasileira de Medicina Tropical). *Braz J Infect Dis*. 2012;16 Supl 1:1-43.

## ■ COLABORADORES

### Agradecimentos aos relatores

O Corpo Editorial agradece a todos os relatores abaixo relacionados que, com seu trabalho voluntário e anônimo ao longo de 2012, contribuíram para o bom andamento das atividades e elevação do nível dos artigos publicados pela Revista.

- **Adriana Palma de Almeida** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Contaminantes. São Paulo, SP
- **Adriana Torres Silva e Alves** Instituto de Tecnologia de Alimentos, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Laticínios. Campinas, SP
- **Adriano Gomes da Cruz** Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Tecnologia de Alimentos. Campinas, SP
- **Afonso de Liguori Oliveira** Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Departamento de Tecnologia e Inspeção. Belo Horizonte, MG
- **Alba Lucia Andrade Coelho Nisida** Instituto de Tecnologia de Alimentos, Centro de Tecnologia de Hortifrutícolas. Campinas, SP
- **Alberto Keidi Kurebayashi** Protocolo Consultoria em Personal e Health Care. São Paulo, SP
- **Alceu Afonso Jordão Junior** Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Clínica Médica. Ribeirão Preto, SP
- **Alexandre da Trindade Alfaro** Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus de Francisco Beltrão. Francisco Beltrão, PR
- **Alexandre Tourino Mendonça** Universidade Vale do Rio Verde. Três Corações, MG
- **Alice Momoyo Ata Sakuma** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Materiais de Referência. São Paulo, SP
- **Alicia de Francisco** Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos. Florianópolis, SC
- **Amanda de Souza da Motta** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia. Porto Alegre, RS
- **Amanda Latércia Tranchez Dias** Universidade Federal de Alfenas, Instituto de Ciências Biomédicas, Laboratório de Microbiologia. Alfenas, MG
- **Ana Carolina Ritter** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Ciência dos Alimentos, Laboratório de Toxicologia Ambiental. Porto Alegre, RS
- **Ana Célia Ruggiero** Universidade Metodista de Piracicaba, Faculdade de Ciências Exatas e da Natureza, Piracicaba, SP
- **Ana Flávia Santos Coelho** Fundação Universidade Federal do Tocantins, Engenharia de Alimentos, Laboratório de Microbiologia de Alimentos. Palmas, TO
- **Ana Lucia Barretto Penna** Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos. São José do Rio Preto, SP
- **Ana Lúcia da Costa Darini** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular. Ribeirão Preto, SP
- **Ana Lúcia da Silva Corrêa Lemos** Instituto de Tecnologia de Alimentos, Centro de Tecnologia de Carnes. Campinas, SP
- **Ana Maria Centola Vidal Martins** Centro Universitário de Rio Preto. São José do Rio Preto, SP
- **Ana Paula Lança Bento** Centro Universitário Claretiano de Batatais. Batatais, SP
- **Anderlise Borsoi** Universidade Tuiuti do Paraná. Curitiba, PR
- **Anderson Junger Teodoro** Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Departamento de Tecnologia de Alimentos. Rio de Janeiro, RJ
- **Anderson Marliere Navarro** Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Clínica Médica. Ribeirão Preto, SP
- **André Kipnis** Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Departamento de Microbiologia. Goiânia, GO
- **Andrea Troller Pinto** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva. Porto Alegre, RS
- **Andreimar Martins Soares** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas. Ribeirão Preto, SP
- **Anete Sevciovic Grumach** Fundação Universitária do ABC, Faculdade de Medicina. São Paulo, SP
- **Ângela Correa de Freitas Almeida** Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia. Rio de Janeiro, RJ
- **Antonio Hugo José Fróes Campos** Fundação Antonio Prudente, Hospital do Câncer AC Camargo, Departamento de Anatomia Patológica. São Paulo, SP
- **Ariene Gimenes Fernandes Van Dender** Instituto de Tecnologia de Alimentos. Campinas, SP
- **Aroldo Arévalo Pinedo** Fundação Universidade Federal do Tocantins, Engenharia de Alimentos. Palmas, TO
- **Áurea Silveira Cruz** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Procedimentos Interdisciplinares, Núcleo de Cultura de Células. São Paulo, SP
- **Aurélia Santos Faraoni** Universidade Federal de Sergipe. São Cristóvão, SE
- **Beatriz Thie Iamanaka** Instituto de Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos. Campinas, SP
- **Bruno Cogliati** Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Patologia. São Paulo, SP
- **Carina Martins Moraes** Universidade Federal do Pará, Faculdade de Medicina Veterinária. Castanhal, PA
- **Carla Léa de Camargo Vianna Cruz** Instituto de Tecnologia de Alimentos, Cereal/Chocotec. Campinas, SP
- **Carla Rosane Barboza Mendonça** Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Ciências Domésticas, Departamento de Ciência dos Alimentos. Pelotas, RS
- **Carlos Cordeiro** Universidade Federal do Pará, Faculdade de Engenharia de Pesca, Laboratório de Tecnologia do Pescado. Bragança, PA
- **Carlos Eugenio Daudt** Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Santa Maria, RS
- **Carlos Termignoni** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia. Porto Alegre, RS
- **Carlos Wanderlei Piler Carvalho** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos. Rio de Janeiro, RJ

- **Carmem Lygia Burgos Ambrósio** Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória. Vitória de Santo Antão, PE
- **Carmen Etsuko Kataoka Higaskino** Instituto de Tecnologia do Paraná, Departamento de Soluções Tecnológicas, Laboratório de Microbiologia. Curitiba, PR
- **Carolina Joy Steel** Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Tecnologia de Alimentos. Campinas, SP
- **Caroline Dellinghausen Borges** Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Ciências Domésticas, Departamento de Ciência dos Alimentos. Pelotas, RS
- **Célia Hitomi Yamamoto** Universidade de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica, Departamento de Farmácia, Laboratório de Controle de Qualidade. Juiz de Fora, MG
- **Célia Lopes da Costa** Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Centro Biomédico, Instituto de Nutrição. Rio de Janeiro, RJ
- **Célia Maria Carvalho Pereira Araujo Romão** Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Departamento de Microbiologia. Rio de Janeiro, RJ
- **Celso Spada** Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas. Florianópolis, SC
- **Christiane Maciel Vasconcellos Barros De Rensis** Universidade Norte do Paraná. Londrina, PR
- **Cibele Cristina Osawa** Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Rio de Janeiro, RJ
- **Cintia Guarienti** Instituto Federal Farroupilha. Santo Augusto, RS
- **Clarice Pinto Máximo Espíndola** Instituto Butantan, Divisão de Desenvolvimento Científico, Seção de Parasitologia/Entomologia. São Paulo, SP
- **Clarice Queico Fujimura Leite** Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Departamento de Ciências Biológicas. Araraquara, SP
- **Clarissa Damiani** Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia, Departamento de Tecnologia de Alimentos. Goiânia, GO
- **Claudia Maria Antunes Uchôa Souto Maior** Universidade Federal Fluminense, Instituto Biomédico, Departamento de Microbiologia e Parasitologia. Niterói, RJ
- **Claudio Dias Timm** Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, Departamento de Veterinária Preventiva. Pelotas, RS
- **Clayton Bernardinelli Gitti** Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Veterinária, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública. Rio de Janeiro, RJ
- **Clícia Maria de Jesus Benevides** Universidade do Estado da Bahia, Centro de Ciências da Saúde e dos Alimentos, Departamento de Ciências da Vida. Salvador, BA
- **Cristiane Gattini Sbampato** Universidade Vale do Rio Verde. Três Corações, MG
- **Cynthia Maria Kyaw** Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Celular. Brasília, DF
- **Daniel Granato** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Materiais de Referência, Núcleo de Análise e Tratamento de Dados. São Paulo, SP
- **Darlila Aparecida Gallina** Instituto de Tecnologia de Alimentos, Centro de Tecnologia de Laticínios. Campinas, SP
- **Denise Rocco de Sena** Instituto Federal de Educação, Ciência, e Tecnologia do Espírito Santo. Vitória, ES
- **Dermânio Tadeu Lima Ferreira** Faculdade Assis Gurgacz. Cascavel, PR
- **Deusdélia Teixeira Almeida** Universidade Federal da Bahia, Escola de Nutrição, Departamento de Ciência dos Alimentos. Salvador, BA
- **Edeltrudes Oliveira** Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas. João Pessoa, PB
- **Elane Schwinden Prudêncio** Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Florianópolis, SC
- **Eliana Badiale Furlong** Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química e Alimentos, Laboratório de Ciência de Alimentos. Rio Grande, RS
- **Elizabeth A. Accioly** Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição “Josué de Castro”, Departamento de Nutrição e Dietética. Rio de Janeiro, RJ
- **Elza Iouko Ida** Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Londrina, PR
- **Ernesto Hofer** Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Zoonoses Bacterianas. Rio de Janeiro, RJ
- **Fabio Correia Sampaio** Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Odontologia Clínica e Social, Laboratório de Biologia Bucal. João Pessoa, PB
- **Felipe Faccini dos Santos** Universidade Federal Fluminense. Niterói, RJ
- **Felipe Rabello Lourenço** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia. São Paulo, SP
- **Fernanda Vanessa Gomes da Silva** Universidade Federal da Paraíba, Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional, Departamento de Tecnologia de Alimentos. João Pessoa, PB
- **Flávio Alves da Silva** Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia. Goiânia, GO
- **Gina Maria Bueno Quirino Cardozo** Instituto de Tecnologia de Alimentos. Campinas, SP
- **Gisely Cristiny Lopes** Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Farmácia, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Maringá, PR
- **Giuliano Elias Pereira** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agropecuária do Trópico Semi-Árido. Petrolina, PE
- **Gizele Scotti do Canto** Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia Industrial. Santa Maria, RS
- **Graciele da Silva Campelo Borges** Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC
- **Hans Fröder** Centro Universitário Univates. Lageado, RS
- **Helena Rodrigues Lopes** Universidade Federal Fluminense, Instituto Biomédico, Centro de Ciências Médicas. Niterói, RJ
- **Heloisa Werneck de Macedo** Universidade Federal Fluminense, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia. Niterói, RJ
- **Iracema de Albuquerque Kimura** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Contaminantes, Núcleo de Contaminantes Orgânicos. São Paulo, SP
- **Irene Satiko Kikuchi** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia, Laboratório de Controle Biológico de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos. São Paulo, SP
- **Jacinto da Costa Silva Neto** Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Histologia e Embriologia. Recife, PE
- **Janaina Marques Rodrigues Caixeiro** Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, Diretoria de Metrologia Científica e Industrial, Divisão

- de Metrologia Química. Duque de Caxias, RJ
- **Jane Gonçalves Menegaldo** Snow Embrapa Meio Norte, Teresina, PI
  - **Jane Mara Block** Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Florianópolis, SC
  - **Jane Martha Graton Mikcha** Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências de Saúde, Departamento de Análises Clínicas. Maringá, PR
  - **Jean Pierre Rosier** Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, Estação Experimental de Videira. Videira, SC
  - **Jefferson Malveira Cavalcante** Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, CE
  - **Jerusa de Souza Andrade** Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, CE
  - **João Andrade da Silva** Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Nutrição, Laboratório de nutrição Experimental. João Pessoa, PB
  - **João Carlos de Oliveira Tortora** Universidade Gama Filho, Centro de Ciências Biomédicas, Rio de Janeiro, RJ
  - **João Evangelista Fiorini** Universidade José do Rosário Vellano, Instituto de Farmácia e Nutrição, Departamento de Biologia, Laboratório de Biologia e Fisiologia de Micro-organismos. Alfenas, MG
  - **Joelma Pereira** Universidade Federal de Lavras, Departamento de Ciência dos Alimentos, Laboratório de Grãos, Raízes e Tubérculos. Lavras, MG
  - **José Almiro da Paixão** Universidade Federal de Pernambuco. Recife, PE
  - **José Realino de Paula** Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Farmácia. Goiânia, GO
  - **Juliana Evangelista da Silva Rocha** Embrapa Caprinos e Ovinos. Sobral, CE
  - **Karina Braga Gomes Borges** Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Belo Horizonte, MG
  - **Karla Danielly da Silva Ribeiro Rodrigues** Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Saúde Coletiva e Nutrição. Natal, RN
  - **Kesia Diego Quintaes** Universidade Federal de Ouro Preto, Escola de Nutrição. Ouro Preto, MG
  - **Larissa Canhadas Bertan** Universidade Federal da Fronteira Sul. Laranjeiras do Sul, PR
  - **Leadir Lucy Martins Fries** Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Laboratório de Microbiologia de Alimentos. Santa Maria, RS
  - **Leila Carvalho Campos** Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Departamento de Bacteriologia. Rio de Janeiro, RJ
  - **Leonor Almeida de Souza Soares** Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande, RS
  - **Lilian Viana Teixeira** Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Departamento de Tecnologia e Inspeção. Belo Horizonte, MG
  - **Liria Hiromi Okuda** Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Laboratório de Vírus de Bovídeos. São Paulo, SP
  - **Lúcia Maria Lopes de Almeida Guedes Diefenbach** Divisão de Análise de Produtos, Laboratório Central de Saúde Pública, Seção de Microscopia e Triagem. Porto Alegre, RS
  - **Luciana Albuquerque Caldeira Rocha** Universidade Estadual de Montes Claros, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas. Janauba, MG
  - **Luciana Azevedo** Universidade Federal de Alfenas, Departamento de Ciências Biológicas, Setor de Nutrição. Alfenas, MG
  - **Luciana Cadioli Panchoni** Universidade Estadual do Norte do Paraná, Faculdade Luiz Meneghel. Bandeirantes, PR
  - **Luciana Maria Ramires Esper** Universidade Federal Fluminense, Faculdade de Farmácia, Departamento de Bromatologia, Laboratório de Controle Microbiológico de Alimentos. Niterói, RJ
  - **Luciano José Quintão Teixeira** Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Engenharia Rural. Alegre, ES
  - **Luis Roberto Batista** Universidade Federal de Lavras, Departamento de Ciência dos Alimentos, Laboratório de Microbiologia de Alimentos. Lavras, MG
  - **Luisa Patrícia Fogarolli de Carvalho** Universidade José do Rosário Vellano, Faculdade de Ciências Médicas, Hospital Universitário Alzira Velano. Alfenas, MG
  - **Luiz Carlos Severo** Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Laboratório de Micologia. Porto Alegre, RS
  - **Luiz Francisco Zafalon** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa de Pecuária do Sudeste, São Carlos, SP
  - **Luiz Simeão do Carmo** Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia. Belo Horizonte, MG
  - **Luz Elena Cano Restrepo** Universidad de Antioquia, Escuela de Microbiología, Unidad de Micología Medica Experimental. Medellín, Colômbia
  - **Marcelo Fabiano Gomes Boriollo** Universidade José do Rosário Vellano. Alfenas, MG
  - **Marcelo Henrique Otenio** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Gado de Leite. Juiz de Fora, MG
  - **Márcia de Aguiar Ferreira** Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Brasília, DF
  - **Márcia de Mello Luvielmo** Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Ciência dos Alimentos. Pelotas, RS
  - **Márcia Elena Zanutto** Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde. Vitória da Conquista, BA
  - **Márcia Helena de Rizzo da Matta** Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Departamento de Química. Campo Grande, MS
  - **Marcia Regina Beux** Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas. Curitiba, PR
  - **Marcos Franke Pinto** Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária, Departamento de Apoio a Produção e Saúde Animal. Araçatuba, SP
  - **Marcos Vinicius da Silva** Instituto de Infectologia Emílio Ribas, São Paulo, SP
  - **Margarete Teresa Gottardo de Almeida** Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Departamento de Doenças Infecto Contagiosas. São José do Rio Preto, SP
  - **Maria Claret Costa Monteiro Hadler** Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Nutrição, Faculdade de Nutrição. Goiânia, GO
  - **Maria Claudia Dantas Porfírio Borges** Universidade federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Departamento de Microbiologia. Goiânia, GO
  - **Maria Cristina Zborowski de Paula** Pontifícia Universidade Católica do Paraná. São José dos Pinhais, PR
  - **Maria da P Spinola Miranda** Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Departamento de Análises Bromatológicas. Salvador, BA
  - **Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha** Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Departamento de Microbiologia e Imunologia. Botucatu, SP

- **Maria do Carmo Fontes de Oliveira** Universidade Federal de Viçosa, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Nutrição e Saúde. Viçosa, MG
- **Maria Esther Jurfest Rivero Ceccon** Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Instituto da Criança, UTI Neonatal. São Paulo, SP
- **Maria Gabriela Bello Koblitz** Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Departamento de Tecnologia de Alimentos. Rio de Janeiro, RJ
- **Maria Ivone Martins Jacintho Barbosa** Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos. Seropédica, RJ
- **Maria José Moreira Batatinha** Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária, Departamento de Patologia e Clínicas. Salvador, BA
- **Maria Lucia Masson** Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, Departamento de Engenharia Química, Setor de Tecnologia. Curitiba, PR
- **Maria Luiza Bazzo** Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas, Laboratório de Biologia Molecular e Micobactérias. Florianópolis, SC
- **Maria Helene Giovanetti Canteri** Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, PR
- **Marilena dos Anjos Martins** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Parasitologia e Micologia, Núcleo de Micologia. São Paulo, SP
- **Marilena Oshiro** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Patologia, Núcleo de Hematologia e Bioquímica. São Paulo, SP
- **Marilene Rodrigues Chang** Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Farmácia e Bioquímica. Campo Grande, MS
- **Marília Caixeta Franco Ariosa** Universidade Federal de Alfenas, Departamento de Ciências Biomédicas, Alfenas, MG
- **Mário Tavares** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Laboratório Regional de Santos. Santos, SP
- **Marta Fonseca Martins Guimarães** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite. Juiz de Fora, MG
- **Martha Zavariz de Miranda** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Trigo. Passo Fundo, RS
- **Mauricio Morishi Ogusku** Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Coordenação de Pesquisas em Ciências da Saúde, Laboratório de Micobacteriologia. Manaus, AM
- **Melicia Cintia Galdeano** Embrapa, Embrapa Agroindústria de Alimentos, Laboratório de Cereais. Rio de Janeiro, RJ
- **Miguel Machinski Junior** Universidade Estadual de Maringá, Laboratório de Toxicologia. Maringá, PR
- **Miracy Muniz de Albuquerque** Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos. Recife, PE
- **Moacir Evandro Lage** Universidade Federal de Goiás, Departamento de Medicina Veterinária, Centro de Pesquisas em Alimentos. Goiânia, GO
- **Nádia Cristiane Steinmacher** Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Medianeira, PR
- **Nairo Massakazu Sumita** Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Serviço de Bioquímica Clínica, Hospital das Clínicas. São Paulo, SP
- **Nancy da Rós** Instituto Butantan, Divisão de Desenvolvimento Tecnológico e Produção. São Paulo, SP
- **Nancy dos Santos Dorna** Universidade Federal do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ
- **Natacha Deboni Cereser** Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, Laboratório de Produtos de Origem Animal. Capão do Leão, RS
- **Nelma de Mello Silva Oliveira** Universidade José do Rosário Vellano, Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismo, Alfenas MG
- **Neura Bragagnolo** Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas, SP
- **Nilcimelly Rodrigues Donato** Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Educação e Saúde. Cuité, PB
- **Nilson Evelázio de Souza** Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Exatas, Departamento de Química. Maringá, PR
- **Obdulio Gomes Miguel** Universidade Federal do Paraná, Departamento de Farmácia, Setor de Ciências da Saúde. Curitiba, PR
- **Olga Lucia Mondragon Bernal** Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG
- **Olga Luisa Tavano** Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG
- **Patricia Haas** Universidade Federal de Santa Catarina. Araranguá, SC
- **Patricia Sartorelli** Universidade Federal de São Paulo. Diadema, SP
- **Paula Dias Bevilacqua** Universidade Federal de Viçosa, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Veterinária. Viçosa, MG
- **Paulo Afonso Lopes** Instituto Militar de Engenharia, Seção de Engenharia de Construção. Rio de Janeiro, RJ
- **Paulo Cesar Stringheta** Universidade Federal de Viçosa, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Departamento de Tecnologia de Alimentos. Viçosa, MG
- **Paulo Paschoal Borges** Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, Diretoria de Metrologia Científica e Industrial, Divisão de Metrologia Química. Duque de Caxias, RJ
- **Raimundo Antônio Gomes de Oliveira** Universidade Federal do Maranhão, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia. São Luis, MA
- **Raquel Gouvea** Universidade Federal Fluminense, Centro de Ciências Médicas, Departamento de Tecnologia de Alimentos. Niterói, RJ
- **Regilda Saraiva dos Reis Moreira Araujo** Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Nutrição. Teresina, PI
- **Regina Baptista dos Reis** Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Nutrição, Departamento de Alimentos e Nutrição. Cuiabá, MT
- **Regina Coeli de Oliveira Torres** Laboratório Central de Saúde Pública, Divisão de Produtos e Meio Ambiente. Florianópolis, SC
- **Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira** Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Engenharia de Pesca. Fortaleza, CE
- **Renata Alexandra Moreira Neves** Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Saúde Coletiva e Nutrição. Natal, RN
- **Renata Brum Martucci** Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição. Rio de Janeiro, RJ
- **Renata Katsuko Takayama Kobayashi** Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia. Londrina, PR
- **Renato Souza Cruz** Universidade Estadual de Feira de Santana, Departamento de Tecnologia. Feira de Santana, BA
- **Ricardo Felipe Alves Moreira** Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Instituto Biomédico, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Saúde Coletiva. Rio de Janeiro
- **Ricardo Seitti Yamatogi** Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública. Botucatu, SP

- **Ricardo Targino Moreira** Universidade Federal da Paraíba, Centro de Tecnologia, Departamento de Tecnologia Química e de Alimentos. João Pessoa, PB
- **Rinaldini Coralini Philippo Tancredi** Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Escola de Nutrição. Rio de Janeiro, RJ
- **Rinaldo Cardoso dos Santos** Universidade Federal de Ouro Preto, Escola de Nutrição, Departamento de Alimentos. Ouro Preto, MG
- **Rita de Cássia Bergamasco** Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Engenharia Química/Engenharia de Alimentos. Maringá, PR
- **Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga** Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Nutrição, Laboratório de Bromatologia. João Pessoa, PB
- **Rita Goreti Amaral** Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Farmácia, Departamento de Análises Clínicas Toxicológicas e Bromatológicas. Goiânia, GO
- **Roberta Hilsdorf Piccoli** Universidade Federal de Lavras, Departamento de Ciência dos Alimentos. Lavras, MG
- **Roberto Pontarolo** Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia. Curitiba, PR
- **Ronaldo Zucатели Mendonça** Instituto Butantan, Laboratório de Parasitologia e Entomologia. São Paulo, SP
- **Rosane da Silva Rodrigues** Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Ciências Domésticas, Departamento de Ciências dos Alimentos. Pelotas, RS
- **Rosângela Andréa Van Laere Borioli** ZorgSaam de Honte Zeeuws Vlaanderen, Klinisch Laboratorium, Terneuzen, Holanda
- **Rosemeri Maurici da Silva** Universidade do Sul de Santa Catarina, Departamento de Ciências Biológica e da Saúde e de Ciências Soc. Aplicadas. Tubarão, SC
- **Rupércio Alvares Cançado** Greensky Consultoria e Assessoria Alimentícia. Curitiba, PR
- **Ryzia de Cássia Vieira Cardoso** Universidade Federal da Bahia, Escola de Nutrição, Departamento de Ciência dos Alimentos. Salvador, BA
- **Sabria Aued Pimentel** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Alimentos, Núcleo de Química, Física e Sensorial. São Paulo, SP
- **Sandra Maria Ottati de Oliveira Nitrini** Universidade São Francisco. Bragança Paulista, SP
- **Sidinéia Cordeiro de Freitas** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos. Rio de Janeiro, RJ
- **Sila Mary Rodrigues Ferreira** Universidade Federal do Paraná, Departamento de Nutrição. Curitiba, PR
- **Silvana Gonçalves Brito de Arruda** Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, Núcleo de Nutrição. Vitória de Santo Antão, PE
- **Silvana Magalhães Salgado** Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Nutrição. Recife, PE
- **Silvia Conceição Reis Pereira Mello** Centro Universitário Augusto Motta. Rio de Janeiro, RJ
- **Silvia Yuko Eguchi** Laboratório Química Orgânica e Inorgânica. Campinas, SP
- **Simone Cristina Marques** Universidade Federal de Lavras, Departamento de Biologia. Lavras, MG
- **Simone Gasparin Verza** Universidade Feevale. Novo Hamburgo, RS
- **Sonia Machado Rocha Ribeiro** Universidade Federal de Viçosa, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Nutrição e Saúde. Viçosa, MG
- **Soraia Vilela Borges** Universidade Federal de Lavras, Departamento de Ciência dos Alimentos. Lavras, MG
- **Suzana Caetano da Silva Lannes** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. São Paulo, SP
- **Suzana Maria Della Lucia** Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias. Alegre, ES
- **Taciana Fernandes Souza Barbosa** Instituto Evandro Chagas. Ananindeua, PA
- **Tânia Sueli Andrade** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Procedimentos Interdisciplinares, Núcleo de Coleção de Micro-organismos. São Paulo, SP
- **Tatiana Pacheco Nunes** Universidade Federal de Sergipe, Departamento de Tecnologia de Alimentos. São Cristóvão, SE
- **Tatiana Saldanha** Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos. Seropédica, RJ
- **Tatiana Valesca Rodriguez Alicio** Universidade Federal de Pelotas, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos. Pelotas, RS
- **Terezinha de Jesus Andreoli Pinto** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia. São Paulo, SP
- **Terezinha do Menino Jesus Silva Leitão** Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Saúde Comunitária. Fortaleza, CE
- **Uelinton Manoel Pinto** Universidade Federal de Ouro Preto, Escola de Nutrição, Departamento de Alimentos. Ouro Preto, MG
- **Valdeni Terezinha Zani** Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Porto Alegre, RS
- **Vanessa Kava Cordeiro** Universidade Federal do Paraná, Departamento de Genética, Laboratório de Genética de Microrganismos, Setor de Ciências Biológicas. Curitiba, PR
- **Vera Akiko Maihara** Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Comissão Nacional de Energia Nuclear. São Paulo, SP
- **Vera Lucia Arroxelas Galvão de Lima** Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Ciências Domésticas. Pernambuco, PE
- **Verônica Ortiz Alvarenga** Universidade Federal de Rondônia. Ariquemes, RO
- **Victor Eduardo Arrúa Arias** Centro de Referência da Saúde da Mulher Hospital Pérola Byington, Núcleo de Patologia. São Paulo, SP

Agradecimento especial pela revisão do inglês

Dra. Mirthes Ueda

## INSTRUÇÕES AOS AUTORES

A Revista do Instituto Adolfo Lutz (RIAL), iniciada em 1941, é uma publicação trimestral com a missão de divulgar resultados de investigações científicas relacionadas às ações de promoção à saúde, prevenção e controle de agravos e doenças de interesse em saúde pública, além de incentivar a produção de artigos científicos nas áreas de vigilância epidemiológica e sanitária e de proporcionar a atualização e aprimoramento de profissionais da área em âmbito nacional e internacional.

A RIAL é inter e multidisciplinar, arbitrada, aberta a contribuições de autores nacionais e estrangeiros. Publica prioritariamente pesquisas originais com contribuições relevantes na área laboratorial em saúde pública, realizadas com rigor científico e que possam ser replicadas e generalizadas.

### POLÍTICA EDITORIAL

Editada nos formatos impresso e eletrônico, a RIAL tem interesse por trabalhos originais em todas as áreas laboratoriais em saúde pública. São também publicadas outras contribuições inéditas, desde que sobre temas atuais e importantes – revisões de literatura, comunicações breves e notas científicas – além de resumos de teses e dissertações.

Os manuscritos devem destinar-se exclusivamente à RIAL, não sendo permitida sua apresentação simultânea a outro periódico. As contribuições podem ser apresentadas em português ou inglês.

Os manuscritos submetidos são analisados inicialmente pelos editores quanto ao atendimento aos padrões da RIAL e às normas para o envio dos originais. Aqueles manuscritos selecionados são encaminhados para avaliação por pares externos de área pertinente, sempre de instituições distintas àquela da origem do manuscrito, sendo garantido o anonimato e a confidencialidade durante todo o processo de avaliação. Após receber os pareceres, o Corpo Editorial, que detém a decisão final sobre a publicação ou não do texto, avalia a aceitação do texto sem modificações, a recusa ou a devolução ao autor com as sugestões apontadas pelos relatores.

Os manuscritos submetidos devem atender à política editorial da RIAL e às Instruções aos Autores, que seguem os *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication* (<http://www.icmje.org>).

Os critérios éticos da pesquisa devem ser respeitados. Os autores devem explicitar em MÉTODOS que a pesquisa foi conduzida dentro dos padrões exigidos pela Declaração de Helsink e aprovada por comissão de ética (CEP) reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) – vinculada ao Conselho Nacional de Saúde (CNS) – bem como registro dos estudos de ensaios clínicos em base de dados, conforme recomendação aos editores da Lilacs e Scielo, disponível em: <http://bvsmodelo.bvsalud.org/site/lilacs/homepage.htm>. O nome da base de dados, sigla e/ou número do ensaio clínico, assim como o número do processo e o nome da comissão de ética que aprovou o projeto, deverão ser colocados ao final do RESUMO. Nos casos de ensaios envolvendo animais, estes deverão atender a Lei Federal 9.605 contra crimes ambientais, a Lei Federal 6.638/76 e a Lei 11.794/08, que normatiza a utilização de animais em pesquisa científica. Os autores deverão ter em seu poder todos os documentos referentes a este procedimento, que poderão ser solicitados em qualquer momento pelos editores.

Os autores serão responsáveis por reconhecer e revelar conflitos financeiros, de interesse comercial e/ou associativo, relacionados ao material de trabalho ou outros que possam influenciá-los, apresentando uma declaração sobre a existência ou não de tais conflitos. Os relatores também devem revelar aos editores qualquer conflito que possa influir ou impedir as suas avaliações.

Os manuscritos publicados são de propriedade da RIAL. A transferência de direitos autorais será solicitada após a aprovação do manuscrito para publicação.

### INFORMAÇÕES GERAIS

Os manuscritos submetidos à publicação na RIAL devem ser apresentados de acordo com as Instruções aos Autores.

São aceitos manuscritos nos idiomas: português e inglês.

O manuscrito deve ser encaminhado em formato eletrônico (e-mail) ou impresso, aos cuidados do editor-chefe da RIAL, no seguinte endereço:

Revista do Instituto Adolfo Lutz (RIAL)

Núcleo de Acervo

Av. Dr. Arnaldo, 355 - Cerqueira César - São Paulo - SP - Brasil - CEP: 01246-902

Ou por meio eletrônico em [rial@saude.sp.gov.br](mailto:rial@saude.sp.gov.br)

Pormenores sobre os itens exigidos para apresentação do manuscrito estão descritos a seguir.

### 1. CATEGORIA DE ARTIGOS

**1.1 ARTIGOS ORIGINAIS:** Incluem estudos relacionados à prevenção e controle de agravos e à promoção à saúde. Devem ser baseados em novos dados ou perspectivas relevantes para saúde pública. Cada artigo deve conter objetivos e hipóteses claras, desenho e métodos utilizados, resultados, discussão e conclusões.

#### INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES:

- Devem ter até 20 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 05 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.

▪ As referências bibliográficas, limitadas a 40, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.

▪ Os resumos em português e em inglês (*abstract*) devem ter até 200 palavras, com a indicação de 3 a 6 palavras-chave (*keywords*).

A estrutura dos artigos originais de pesquisa é a convencional: Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão e Conclusão, embora outros formatos possam ser aceitos, mas respeitando a lógica da estrutura de artigos científicos.

**1.2 ARTIGOS DE REVISÃO:** Dedicados à apresentação e à discussão de temas de interesse científico e de relevância para a saúde pública. Devem apresentar formulação clara de um objeto científico de interesse, argumentação lógica, crítica teórico-metodológica dos trabalhos consultados e síntese conclusiva. Devem ser elaborados por pesquisadores com experiência no campo em questão ou por especialistas de reconhecido saber.

### Informações complementares:

▪ Devem ter até 25 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.

▪ As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 03 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.

▪ As referências bibliográficas, limitadas a 50, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.

▪ Os resumos em português e em inglês (*abstract*) devem ter até 200 palavras, com a indicação de 3 a 6 palavras-chave (*keywords*).

**1.3 COMUNICAÇÕES BREVES:** São relatos sucintos destinados à rápida divulgação de eventos significativos no campo da pesquisa de interesse em saúde pública e que não comportam uma análise mais abrangente.

### Informações complementares:

▪ Devem ter até 10 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.

▪ As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 02 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.

▪ As referências bibliográficas, limitadas a 15, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.

▪ Os resumos em português e em inglês (*abstract*) devem ter até 200 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (*keywords*).

▪ Sua apresentação deve acompanhar as mesmas normas exigidas para artigos originais.

**1.4 NOTAS CIENTÍFICAS:** São relatos sucintos destinados à rápida divulgação de eventos relevantes de uma pesquisa experimental que justifique a publicação de resultados parciais.

### Informações complementares:

▪ Devem ter até 06 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.

▪ As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 02 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.

▪ As referências bibliográficas, limitadas a 10, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.

▪ Os resumos em português e em inglês (*abstract*) devem ter até 200 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (*keywords*).

▪ Sua apresentação deve acompanhar as mesmas normas exigidas para artigos originais, porém na forma de texto único.

**1.5 RELATOS DE CASO:** São textos que contemplam principalmente a área médica, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada.

### Informações complementares:

▪ Devem ter até 03 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.

▪ As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 02 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.

▪ As referências bibliográficas, limitadas a 10, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.

- Os resumos em português e em inglês (*abstract*) devem ter até 200 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (*keywords*).
- Devem apresentar Introdução, Relato de caso, Discussão e Conclusão, na forma de texto único.

**1.6 RESUMOS DE TESES E DISSERTAÇÕES:** São aceitos resumos de teses e dissertações até um ano após a defesa.

**Informações complementares:**

- Devem ter até 400 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (*keywords*).
- Sua apresentação deve conter o nome do autor e do orientador, título do trabalho em português e em inglês, nome da instituição em que foi apresentado, área de concentração e ano da defesa.

**2. APRESENTAÇÃO DO MANUSCRITO:** Os textos devem ser redigidos em processador de texto *Word for Windows* 2003 ou compatível, no formato A4, espaço duplo, fonte *Times New Roman*, tamanho 12. Devem ser evitados arquivos compactados. A estrutura do manuscrito deve estar em conformidade com as normas do Sistema Vancouver – Título; Autores e Instituições; Resumo e Abstract; Introdução; Material e Métodos; Resultados; Discussão; Conclusão; Agradecimentos; Referências; Tabelas; Figuras e Fotografias.

**2.1 PÁGINA DE IDENTIFICAÇÃO:** Deve constar:

**Título em português e em inglês:** O título deve ser conciso, completo e conter informações. Se o manuscrito for submetido em inglês, deve ser fornecido um título em português.

**Autores:** De acordo com o *International Committee of Medical Journal Editors* (ICMJE), são considerados autores aqueles que contribuíram substancialmente para a concepção e planejamento, ou análise e interpretação dos dados; contribuíram significativamente na elaboração do rascunho ou na revisão crítica do conteúdo e participaram da aprovação da versão final do mesmo. Somente a aquisição de financiamento, a coleta de dados ou supervisão geral de grupos de pesquisa não justificam autoria – maiores esclarecimentos sobre autoria podem ser encontrados na página do ICMJE (<http://www.icjme.org>). Deve constar o nome completo, sem abreviações e com último sobrenome em caixa alta (exemplo: Ana Maria Camargo da SILVA) e o e-mail do autor responsável. O autor responsável para troca de correspondência deve estar assinalado com asterisco (\*) e apresentar também o endereço completo.

**Afiliação:** Deve ser indicada a instituição à qual cada autor está afiliado, na seguinte ordem de hierarquias institucionais de afiliação: laboratório, setor, seção, serviço, divisão, departamento, instituto, faculdade e universidade.

**Financiamento da pesquisa:** Se a pesquisa foi subvencionada, indicar o tipo de auxílio, o nome da agência financiadora e o respectivo número do processo.

**Apresentação prévia:** Quando baseado em tese ou dissertação, indicar o nome do autor, título, ano, nome do programa de pós-graduação e instituição onde foi apresentada. Quando apresentado em evento científico, indicar o nome do evento, local e ano da realização.

**2.2 PREPARO DO MANUSCRITO:**

**Resumo/Abstract:** Todos os textos deverão ter resumos em português e inglês, dimensionados para ter até 200 palavras. Como regra geral, o resumo deve incluir objetivos do estudo, principais procedimentos metodológicos, principais resultados e conclusões.

**Palavras-chave/keywords:** Devem ser indicados entre 3 a 6 descritores do conteúdo, extraídos do vocabulário Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) da Bireme (disponível em <http://www.bireme.br>) nos idiomas português e inglês. Em inglês, com base no *Medical Subject Headings* (MeSH). Caso não sejam encontrados descritores adequados para a temática do manuscrito, poderão ser indicados termos não existentes nos conjuntos citados.

**Estrutura do texto:**

**A) Introdução:** Deve ser breve, relatando o contexto e a justificativa do estudo, apoiados em referências pertinentes ao objetivo do manuscrito, sintetizando a importância e destacando as lacunas do conhecimento abordadas. Não deve incluir dados ou conclusões do estudo em referência

**B) Material e Métodos:** Os procedimentos adotados devem ser descritos claramente, bem como as variáveis analisadas, com a respectiva definição, quando necessária, e a hipótese a ser testada. Devem ser descritas a população e a amostra, instrumentos de medida, com a apresentação, se possível, de medidas de validade e conter informações sobre a coleta e processamento de dados. Deve ser incluída a devida referência para os métodos e técnicas empregados, inclusive os métodos estatísticos; métodos novos ou substancialmente modificados devem ser descritos, justificando as razões para seu uso e mencionando suas limitações. Os critérios éticos da pesquisa devem ser respeitados; os autores devem explicitar que a pesquisa foi conduzida dentro de padrões éticos e foi aprovada por comitê de ética, indicando o nome do comitê de ética, número e data do registro.

**C) Resultados:** Devem ser apresentados em uma sequência lógica, iniciando-se com a descrição dos dados mais importantes. Tabelas e figuras devem ser restritas àquelas necessárias para argumentação e a descrição dos dados no texto deve ser restrita aos mais importantes. Os gráficos devem ser utilizados para destacar os resultados mais relevantes e resumir relações complexas. Dados em gráficos e tabelas não devem ser duplicados nem repetidos no texto. Os resultados numéricos devem especificar os métodos estatísticos utilizados na análise.

**D) Discussão:** A partir dos dados obtidos e resultados alcançados, os novos e importantes aspectos observados devem ser interpretados à luz da literatura científica e das teorias existentes no campo. Argumentos e provas baseadas em comunicação de caráter pessoal ou divulgadas em documentos restritos não podem servir de apoio às argumentações do autor. Tanto as limitações do trabalho quanto suas implicações para futuras pesquisas devem ser esclarecidas. Incluir somente hipóteses e generalizações baseadas nos dados do trabalho. As conclusões podem finalizar esta parte, retomando o objetivo do trabalho ou serem apresentadas em item separado.

**E) Agradecimentos:** Este item é opcional e pode ser utilizado para mencionar os nomes de pessoas que, embora não preencham os requisitos de autoria, prestaram colaboração ao trabalho. Será preciso explicitar o motivo do agradecimento, por exemplo, consultoria científica, revisão crítica do manuscrito, coleta de dados etc. Deve haver permissão expressa dos nomeados e o autor responsável deve anexar a Declaração de Responsabilidade pelos Agradecimentos. Também pode constar desta parte apoio logístico de instituições.

**2.3 CITAÇÃO NO TEXTO:** A exatidão das referências é de responsabilidade dos autores. Devem ser indicadas pelo seu número na listagem, na forma de **expoente**, sem uso de parênteses, colchetes e similares. Nos casos em que há citação do nome do autor, o número da referência deve ser colocado a seguir do nome do autor. Trabalhos com dois autores devem fazer referência aos dois autores ligados por “e”. Nos outros casos apresentar apenas o primeiro autor (seguido de et al, em caso de autoria múltipla).

**Exemplos:** Nos Estados Unidos e Canadá, a obrigatoriedade da declaração dos nutrientes no rótulo do alimento é mais antiga e foram desenvolvidos métodos hidrolíticos, como o AOAC 996.06<sup>1</sup>, de extração e determinação da GT por cálculo a partir dos AG obtidos por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC/DIC)<sup>2,3</sup>.

Segundo Chang et al<sup>31</sup>, o aumento do tamanho das partículas resulta numa redução da área de superfície conferindo uma melhora na retenção e estabilidade das mesmas.

**2.4 REFERÊNCIAS:** Listadas ao final do texto, devem respeitar a quantidade definida para cada categoria de artigos aceitos pela RIAL. As referências devem ser normalizadas de acordo com o estilo *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication*, numeradas consecutivamente na ordem em que foram mencionadas a primeira vez no texto.

Os títulos de periódicos devem ser referidos de forma abreviada, de acordo com o *Medline*, disponível no endereço <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=journals>. Para consultar periódicos nacionais e latino-americanos: <http://portal.revistas.bvs.br/main.php?home=true&lang=pt>.

No caso de publicações com até seis autores, citam-se todos; acima de seis, citam-se os seis primeiros, seguidos da expressão latina “et al”. Referências de um mesmo autor devem ser organizadas em ordem cronológica crescente.

### **Exemplos:**

#### **Artigos de periódicos:**

Aued-Pimentel S, Zenebon O. Lipídios totais e ácidos graxos na informação nutricional do rótulo dos alimentos embalados: aspectos sobre legislação e quantificação. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2009;68(2):121-6.

Weihrauch JL, Posati LP, Anderson BA, Exler J. Lipid conversion factors for calculating fatty acids contents of foods. *J Am Oil Chem Soc*. 1977;54:36-40.

Hennington EA. Acolhimento como prática interdisciplinar num programa de extensão. *Cad Saude Coletiva* [Internet]. 2005;21(1):256-65. Disponível em: [<http://www.scielo.br/pdf/csp/v21n1/28.pdf>].

#### **Livros:**

Ringsven MK, Bond D. *Gerontology and leadership skills for nurses*. 2ª ed. Albany (NY):Delmar Publishers;1996.

Lopez D, organizador. *Estudos epidemiológicos qualitativos*. São Paulo: James Martim; 2009.

Institute of Medicine (US). *Looking at the future of the Medicaid program*. Washington (DC): The Institute; 1992.

Foley KM, Gelband H, editors. *Improving palliative care for cancer*. Washington: National Academy Press 2001 [acesso 2003 Jul 13]. Disponível em: [[http://www.nap.edu/catalog.php?record\\_id=10149](http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=10149)].

#### **Capítulos de livro:**

Wirdh L. História da Epidemiologia. *In*: Lopez D, organizador. *Estudos epidemiológicos qualitativos*. São Paulo: James Martim; 2009.p.64-76.

**Dissertações, teses e monografias:**

Santos EP. Estabilidade química da manteiga da terra [dissertação de mestrado]. Bananeiras (PB): Universidade Federal da Paraíba;1995.  
Moreschi ECP. Desenvolvimento e validação de métodos cromatográficos e avaliação da estabilidade de vitaminas hidrossolúveis em alimentos [tese de doutorado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2006.

**Trabalhos de congressos, simpósios, encontros, seminários e outros:**

Barboza et al. Descentralização das políticas públicas em DST/AIDS no Estado de São Paulo. III Encontro do Programa de Pós-Graduação em Infecções e Saúde Pública; agosto de 2004; São Paulo: Rev Inst Adolfo Lutz. p. 34 [resumo 32-SC].

**Dados eletrônicos:**

Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo – SABESP. O que fazemos/Qualidade da água. [acesso 2008 Set 17]. Disponível em: [http://www.sabesp.com.br/CalandraWeb/CalandraRedirect/?temp=4&proj=sabesp&pub=T&db=&doc].

**Legislação:**

Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil. Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1, nº7-E. p.45-53.

**Autoria institucional:**

Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - Brasil). Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4ª ed. [1ª ed. digital]. São Paulo (SP): Instituto Adolfo Lutz; 2008. Disponível em: [http://www.ial.sp.gov.br/index.php?option=com\_remository&Itemid=7&func=select&orderby=1&Itemid=7].

Organización Mundial de la Salud – OMS. Como investigar el uso de medicamentos em los servicios de salud. Indicadores seleccionados del uso de medicamentos. Ginebra; 1993. (DAP. 93.1).

**Patente:**

Larsen CE, Trip R, Johnson CR, inventors: Novoste Corporation, assignee. Methods for procedures related to eletrophysiology of the heart. US patent 5,529,067. 1995 Jun 25.

Casos não contemplados nesta instrução devem ser citados conforme indicação do *Committee of Medical Journals Editors (Grupo Vancouver)*, disponível em: <http://www.cmje.org>.

Referências a documentos não indexados na literatura científica mundial, em geral de divulgação circunscrita a uma instituição ou a um evento (teses, relatórios de pesquisa, comunicações em eventos, dentre outros) e informações extraídas de documentos eletrônicos, não mantidas permanentemente em sites, se relevantes, devem figurar no rodapé das páginas do texto onde foram citadas.

**2.5 NÚMEROS DE FIGURAS E TABELAS:** A quantidade de figuras e tabelas de cada manuscrito deve respeitar a quantidade definida para cada categoria de artigos aceitos pela RIAL. Todos os elementos gráficos ou tabulares apresentados serão identificados como *figura* ou *tabela*, e numerados sequencialmente a partir de um, e não como *quadros*, *gráficos* etc.

**A) Tabelas:** Devem ser redigidas em processador de texto *Word for Windows* 2003 ou compatível e serem apresentadas em arquivos separados, numeradas consecutivamente com algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto. A cada uma deve-se atribuir um título breve, não se utilizando traços internos horizontais ou verticais. As notas explicativas devem ser limitadas ao menor número possível e colocadas no rodapé das tabelas e não no cabeçalho ou título. Se houver tabela extraída de outro trabalho, previamente publicado, os autores devem solicitar formalmente autorização da revista que a publicou, para sua reprodução.

**B) Figuras:** As ilustrações (fotografias, desenhos, gráficos etc.) devem ser citadas como Figuras, apresentadas em arquivos separados e numeradas consecutivamente com algarismos arábicos na ordem em que foram citadas no texto. Devem conter título e legenda apresentados na parte inferior da figura. Só serão admitidas para publicação figuras suficientemente claras e com qualidade digital que permitam sua impressão, preferencialmente no formato vetorial. No formato JPEG, a resolução mínima deve ser de 300 dpi. Figuras em cores serão publicadas quando for necessária à clareza da informação e os custos deverão ser cobertos pelos autores. Se houver figura extraída de outro trabalho, previamente publicado, os autores devem solicitar autorização, por escrito, para sua reprodução.

**3. DECLARAÇÕES E DOCUMENTOS SOLICITADOS:** Em conformidade com as diretrizes do *International Committee of Medical Journal Editors*, são solicitados alguns documentos e declarações do(s) autor(es) para a avaliação de seu manuscrito. Observe a relação dos documentos abaixo e, nos casos em que se aplique, anexe o documento ao processo. O momento em que tais documentos serão solicitados é variável:

Documento/declaração	Quem assina	Quando anexar
Carta de Apresentação	Todos	Submissão
Responsabilidade pelos Agradecimentos	Autor responsável	Aprovação
Transferência de Direitos Autorais	Todos	Aprovação

A carta de Apresentação do manuscrito, assinada por todos os autores, deve conter:

- Um parágrafo declarando a responsabilidade de cada autor: ter contribuído substancialmente para a concepção e planejamento ou análise e interpretação dos dados; ter contribuído significativamente na elaboração do rascunho ou na revisão crítica do conteúdo; e ter participado da aprovação da versão final do manuscrito. Para maiores informações sobre critérios de autoria, consulte a página do ICMJE (<http://www.icjme.org>).
- Um parágrafo contendo a declaração de potenciais conflitos de interesses dos autores.
- Um parágrafo contendo a declaração que o trabalho não foi publicado, parcial ou integralmente, em outro periódico. Todos os autores devem ler, assinar e enviar documento transferindo os direitos autorais. O artigo só será liberado para publicação quando esse documento estiver de posse da RIAL .

#### 4. VERIFICAÇÃO DOS ITENS EXIGIDOS NA SUBMISSÃO:

1. Nome e instituição de afiliação de cada autor, incluindo e-mail e telefone do autor responsável.
2. Título do manuscrito, em português e inglês.
3. Texto apresentado em letras *Times New Roman*, corpo 12, em formato *Word* ou similar (doc, txt, rtf).
4. Resumos em dois idiomas, um deles obrigatoriamente em inglês.
5. Carta de Apresentação assinada por todos os autores.
6. Nome da agência financiadora e número(s) do processo(s).
7. No caso de artigo baseado em tese/dissertação, indicar o nome da instituição/Programa, grau e o ano de defesa.
8. Referências normalizadas segundo estilo Vancouver, ordenadas pela citação no texto e numeradas, e se todas estão citadas no texto.
9. Tabelas numeradas sequencialmente, com título e notas, e no máximo com 12 colunas, em formato *Word* ou similar (doc, txt, rtf).
10. Figura no formato vetorial ou em pdf, ou tif, ou jpeg ou bmp, com resolução mínima 300 dpi.

**5. REVISÃO DA REDAÇÃO CIENTÍFICA:** Para ser publicado, o manuscrito aprovado é submetido à revisão da redação científica, gramatical e de estilo. A RIAL se reserva o direito de introduzir alterações nos originais, visando a manutenção da homogeneidade e qualidade da publicação, respeitando, porém, o estilo e as opiniões dos autores. Inclusive a versão em inglês do artigo terá esta etapa de revisão.

**6. PROVAS:** Após sua aprovação pelos editores, o manuscrito será revisado quanto à redação científica. O autor responsável pela correspondência receberá as provas gráficas para revisão por correio eletrônico em formato pdf (*portable document format*). O prazo máximo para a revisão da prova é de dois dias. É importante cumprir os prazos de revisão para garantir a publicação no fascículo programado. Atrasos nesta fase poderão resultar em remanejamento do artigo para fascículos subsequentes.

**7. PUBLICAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO:** Os artigos serão publicados em ordem cronológica de aprovação. As datas de recebimento e de aprovação do artigo constarão obrigatoriamente no mesmo.

É permitida a reprodução, no todo ou em parte, de artigos publicados na RIAL, desde que sejam indicados a origem e o nome do autor, de conformidade com a legislação sobre os direitos autorais.

A Revista do Instituto Adolfo Lutz é distribuída gratuitamente a entidades governamentais, culturais ou em permuta de periódicos nacionais ou estrangeiros.

Assessoria Editorial:

**TIKINET**

[www.tiki.net.br/tiki](http://www.tiki.net.br/tiki)





Instituto Adolfo Lutz



SECRETARIA  
DA SAÚDE



ISSN 0073-9855

