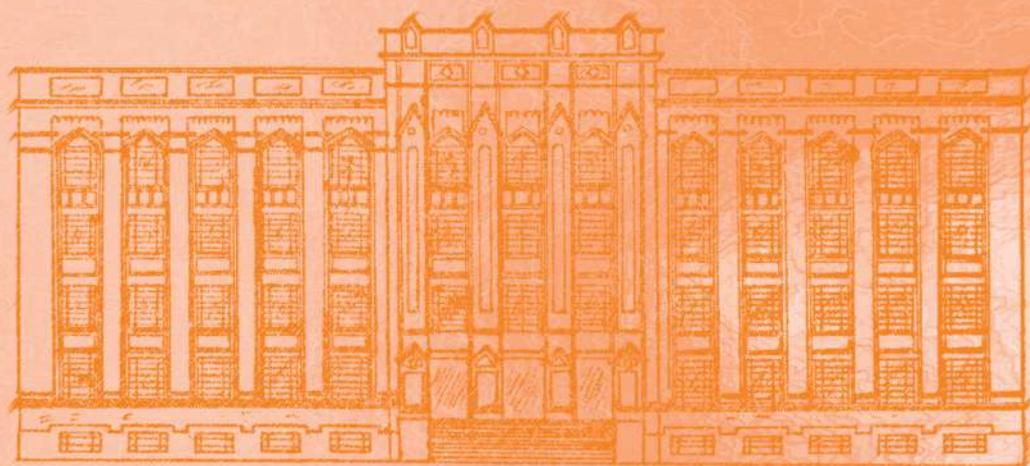


# REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

ISSN 0073-9855  
RIALA6



Volume 65 número 2, 2006



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO  
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO  
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE  
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS  
INSTITUTO ADOLFO LUTZ

**REVISTA  
DO  
INSTITUTO ADOLFO LUTZ**

**Publicação quadrimestral/ Quadri-annual publication**  
Solicita-se permuta/ Exchange desired

**Volume 65 número 2, 2006**

**ISSN 0073-9855**

**Maio - Agosto - 2006**

# INSTITUTO ADOLFO LUTZ

---

## Diretor Responsável

Carlos Adalberto de Camargo Sannazzaro  
Diretor Geral do Instituto Adolfo Lutz

## Comissão de Redação

Thaís Valéria Milanez, Presidente  
Adriana Bugno, Secretária  
Ângela Cristina Rodrigues Ghilardi  
Cecília Cristina Marques dos Santos  
Cristina Takami Kanamura  
Luzia Setuko Umeda Yamamoto  
Raquel dos Anjos Fazioli  
Sabria Aued Pimentel  
Cristina Adelaide Figueiredo, Membro Convidado  
Janete Alaburda, Membro Convidado  
Claydes de Quadros Zamboni, Membro Emérito

## Setor de Publicações

Rocely Aparecida de Souza Bueno

---



REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ  
(Secretaria de Estado de Saúde)  
São Paulo, SP – Brasil, 1941

1941-2005,  
2006, 65 (2)

ISSN 0073-9855  
RIALA 6

CDD<sub>18</sub> 614.07205

(\*) ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE BIBLIOTECÁRIOS. Grupo de Bibliotecários Biomédicos.  
Normas para catalogação de publicações seriadas especializadas, São Paulo, Ed. Polígono, 1072.

Os artigos publicados na REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ são indexados por Abstracts on Hygiene and Communicable Diseases, AGRINDEX., 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, Virology Abstracts e outros.

Acesso on line / on line access. Texto integral / full text. <http://www.ial.sp.gov.br>

Endereço / Address

Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz  
Av. Dr. Arnaldo, 355 – São Paulo / SP - Brasil  
01246-902  
Tel/Fax: (11) 3082-9939  
Email: [rial@saude.sp.gov.br](mailto:rial@saude.sp.gov.br)

A REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ tem por finalidade a divulgação de trabalhos relacionados com as atividades laboratoriais em Saúde Pública.

### 1. Missão da Revista do Instituto Adolfo Lutz

Esta revista tem como missão divulgar resultados de investigações científicas tanto básicas como aplicadas inclusive tecnológicas, abrangendo as diversas áreas de interesse em saúde pública, na forma de artigos originais, artigos de revisão, relatórios técnicos, comunicações e notas científicas, relatos de caso, resumos de teses e dissertações.

### 2. Normas para Publicação

O trabalho submetido à publicação deve ser inédito, não sendo permitida a sua apresentação simultânea em outro periódico, conforme declaração a ser assinada pelos autores. Os autores deverão informar na carta de encaminhamento em qual categoria o trabalho se enquadra. Os trabalhos redigidos em língua portuguesa ou inglesa, deverão ser enviados para o Setor de Publicações do Instituto Adolfo Lutz, em três cópias impressas, sendo uma completa e as outras duas omitindo os nomes dos autores e respectivas instituições, tanto na página de rosto como nos resumos em português e inglês. Após aprovação do trabalho, será solicitado aos autores o envio do artigo completo em disquete 3 ½ acompanhado de uma cópia impressa.

### 3. Processo de Julgamento dos Manuscritos

Os trabalhos serão aceitos para publicação após avaliação por pareceristas indicados pela Comissão de Redação. A lista de pareceristas que colaboraram em cada volume é publicada no último fascículo do ano. A publicação de artigos na Revista está condicionada à aprovação da Comissão de Redação de Publicações Oficiais do Instituto Adolfo Lutz, que poderá sugerir ao autor alterações no original. Os manuscritos revisados serão devolvidos aos autores para as devidas correções. O novo texto deverá retornar à Comissão que notificará a aceitação ou recusa do trabalho.

### 4. Ética

Os trabalhos de pesquisa envolvendo seres humanos e/ou animais deverão ser encaminhados com a cópia da aprovação do Comitê de Ética, e no item Material e Métodos deverá constar o número do processo e o nome do Comitê que o aprovou.

### 5. Categorias

Os seguintes tipos de trabalhos serão aceitos para publicação na Revista do Instituto Adolfo Lutz.

#### 5.1. Artigo original

Relato completo de pesquisa original ainda não publicada. Deve apresentar no máximo 20 páginas impressas, incluindo figuras, tabelas e referências.

#### 5.2. Comunicação breve

É um artigo curto, com objetivo limitado ou cujos resultados sejam provenientes de estudos com metodologia de pequena complexidade ou rotineira, de relevância para a área de saúde pública. Deve apresentar o mesmo formato do artigo científico, contendo no máximo duas tabelas ou duas figuras ou uma tabela e uma figura, até 15 referências e 10 páginas.

#### 5.3. Nota científica

É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental dignos de publicação, embora insuficientes ou inconsistentes para constituírem um artigo original. Deve ser relevante e que mereça rápida divulgação. Deve apresentar no máximo duas tabelas ou duas figuras ou uma tabela e uma figura e até 15 referências. O texto deve conter todos os tópicos de um artigo científico, porém sem as divisões.

#### 5.4. Relato de caso

Contempla principalmente a área médica, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada. Inclui novas técnicas, terapias, diagnóstico, patologias, materiais e soluções inovadoras para problemas especiais, fenômenos anatômicos e fisiológicos. Deve conter os tópicos: título e resumo em português e inglês, introdução, relato do caso, discussão, conclusões, referências e apresentar no máximo três páginas incluindo figuras e tabelas e até dez referências.

#### 5.5. Artigo de revisão

Avaliação da literatura sobre determinado assunto, cuja divulgação possa contribuir para melhorar o conhecimento da área em questão. Deve ser subdividido em tópicos, conter resumos em inglês e português. O artigo deve conter um sumário e apresentar no máximo 15 páginas.

### 5.6. Resumos de teses e dissertações

Serão aceitos para publicação os resumos de teses e dissertações até um ano após a defesa. Deverão conter o nome do autor e seu endereço eletrônico, o nome do orientador, título da obra (em português e em inglês), nome da instituição em que foi apresentado o trabalho e ano de defesa. O resumo poderá ser publicado em língua portuguesa ou inglesa, sendo de total responsabilidade do autor o conteúdo do mesmo e também a sua revisão ortográfica e gramatical.

### 6. Preparação do manuscrito ou artigo

#### Geral

Os textos devem ser redigidos em processador de texto Word for Windows 6.0 ou compatível, no formato A4, espaço duplo, fonte Times New Roman, tamanho 12. Se usar versão superior, enviar o arquivo em Rich Text Format (.rtf). Devem ser evitados arquivos compactados.

#### Estrutura:

**Página de rosto:** a) título do artigo; b) nome do(s) autor(es): nome seguido do último sobrenome por extenso e em caixa alta (ex.: Ana Maria C. D. da SILVA); c) local de trabalho indicado por número sobrescrito. O autor responsável e o seu endereço deverão estar assinalados com asterisco (\*) para encaminhamento da correspondência.

**Resumo:** deve ser redigido em português, ser claro e conciso num único parágrafo, contendo objetivo, metodologias, resultados e conclusões. Não exceder 200 palavras.

**Palavras-chave:** podem ser utilizados até seis descritores que identifiquem o conteúdo do artigo, se possível baseados no DECS (Descritores em Ciências da Saúde), disponível no [www.bireme.br](http://www.bireme.br) terminologia em saúde e consulta ao DECS.

**Introdução:** deve iniciar em página nova e deve conter os objetivos da pesquisa, justificativa de sua importância, apresentação das principais variáveis, definições necessárias e discussão do problema de acordo com a literatura pertinente.

**Material e Métodos:** o método deve estar claramente descrito e validado, de modo a possibilitar a sua reprodução. Qualquer modificação, em métodos já publicados, deve ser devidamente explicitada.

**Resultados:** devem ser claros e concisos e podem apresentar tabelas e figuras quando necessárias, que devem ser auto explicativas.

**Discussão:** deve fornecer a interpretação dos resultados em função das informações apresentadas. Este item pode ser incluído em resultados, não havendo necessidade de repeti-lo em item a parte.

**Conclusão:** deve ser clara, concisa podendo, em alguns casos, ser incluída no item discussão não havendo a necessidade de repeti-la em item a parte.

**Agradecimentos:** é opcional e deve vir após a discussão/conclusão.

**Title, Abstract e Key Words:** devem ser redigidos em inglês e seguir as recomendações apresentadas para a página de rosto, do resumo e das palavras-chave.

**Referências:** as referências devem ser citadas seguindo os "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" produzidos pelo International Committee of Medical Journal Editors, também conhecidos como Vancouver Style. Os autores devem seguir as diretrizes da quinta edição (Annals of Internal Medicine 1997; 126: 36-47 ou na página (website) <http://acponline.org/journals/resource/unifreq/htm>.

As referências devem ser numeradas consecutivamente na ordem em que foram mencionadas a primeira vez no texto. Identifique as referências no texto, tabelas e legendas de ilustrações por numerais arábicos sobrescritos. As referências citadas em tabelas ou em legendas devem ser numeradas de acordo com a seqüência estabelecida pela sua primeira identificação no texto. Segundo o Sistema Vancouver, deve-se evitar a utilização de resumos bem como as "observações inéditas" e as "comunicações pessoais" como referências, mas as comunicações escritas (não verbais) podem ser inseridas entre parênteses no texto. Os artigos aceitos para publicação, porém, ainda não publicados, podem ser incluídos na relação das referências, bastando indicar a revista e citar entre parêntesis "no prelo". Informações extraídas de manuscritos submetidos, porém ainda não aceitos, devem ser citados no texto como "observações inéditas" (entre parêntesis).

Os títulos das revistas devem ser abreviados de acordo com o Index Medicus seja pela List of Journals Indexed in Index Medicus ou no “website” <http://www.nlm.nih.gov> ou pelo Chemical Abstracts, ISI Science Citation Index, World List of Periodicals (publicado por Butterworks, Londres).

Exemplos

#### Artigos em revistas

- **Periódicos.** Liste os primeiros seis autores seguidos por et al. Telles MAS, Mosca A. Avaliação da técnica de microdiluição em placa para determinação de concentração inibitória mínima de isoniazida em cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. Rev Inst Adolfo Lutz. 2000; 59 (1/2): 15-9.

- **Número com suplemento**

Payne DK, Sullivan MD, Massie MJ. Women’s psychological reactions to breast cancer. Semin Oncol. 1996; 23 (1 Suppl 2): 89-97.

- **Volume com suplemento**

Maio FD. Determinação de chumbo sanguíneo: a importância de programas interlaboratoriais na avaliação da qualidade analítica laboratorial. Rev Inst Adolfo Lutz. 2002; 61 (Suppl 1): 3.

- **Instituição como autor**

The Cardiac Society of Australia and New Zealand. Clinical exercise stress testing. Safety and performance guidelines. Med J Aust. 1996; 164: 282-4.

- **No prelo (forthcoming)**

Leshner AI. Molecular mechanisms of cocaine addiction. N Engl J Med. No prelo 1996.

#### Livros e outras monografias

- **Indivíduo como autor**

Ringsven MK, Bond D. Gerontology and leadership skills for nurses. 2<sup>nd</sup> ed. Albany (NY): Delmar Publishers; 1996.

- **Editor(es), compilador(es) como autor(es)**

Norman IJ, Redfern SJ, editors. Mental health care for elderly people. New York: Churchill Livingstone; 1996.

- **Instituição como autor e editor**

Institute of Medicine (US). Looking at the future of the Medicaid program. Washington (DC): The Institute; 1992.

- **Capítulo num livro**

Franco DBG, Landgraf M. Microorganismos patogênicos de importância em alimentos. In: Franco DBG, Landgraf, M, editores. Microbiologia dos Alimentos 2<sup>nd</sup> ed. São Paulo: Ed Atheneu; 1996. p. 55-60.

- **Resumo/Trabalho de congresso publicado**

DuPont B. Bone marrow transplantation in severe combined immunodeficiency with an unrelated MLC compatible donor. In: White HJ, Smith R, editors. Proceedings of the 3<sup>rd</sup> Annual Meeting of the International Society for Experimental Hematology. Houston: International Society for Experimental Hematology, 1974: 44-6.

- **Dissertação/Tese**

Cairns RB. Infrared spectroscopic studies of solid oxygen [Tese de doutorado]. Berkeley, California: University of California, 1965. 156 pp.

#### Material legal

Quanto à legislação, a forma proposta por Vancouver não se aplica à realidade brasileira, para tanto recomenda-se adotar as normas a seguir:

Os elementos essenciais são: competência (país, estado ou cidade ou nome da entidade ou órgão no caso de se tratar de normas), título (especificação da legislação, número e data), ementa e título da publicação oficial, local da publicação oficial (cidade), data (dia, mês abreviado e ano), seção e paginação. Exemplos:

Brasil. Portaria n° 695 de 1998 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 30 mar. 1998. Seção 1, n° 60-E, p. 5-6.

Brasil. Resolução n° 16, de 13 de dez. 1984 do Conselho Federal de Educação. Dispõe sobre reajustamento de taxas, ... e altera a redação do artigo 5 da Resolução n.1 de 14/1/83. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 13 dez. 1984. Seção 1, p. 190-1.

Associação Brasileira de Normas Técnicas [ABNT]. NBR 7024, de 1989: veículos rodoviários automotores leves: medição do consumo de combustível. Rio de Janeiro; 1990. p. 29.

Conselho Nacional do Meio Ambiente [CONAMA]. Resolução n. 315, de 29 out 2002: dispõe sobre as novas etapas do Programa de controle da poluição do ar por veículos automotores (Proconve). Brasília (DF); Diário Oficial da União; 15 mar 2002.

#### Material Eletrônico

- **Artigo de revista em formato eletrônico**

Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. Emerg Infect Dis [serial online] 1995 Jan-Mar [cited 1996 Jun 5]; 1(1):[24 screens]. Available from: URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>

- **Monografia em formato eletrônico**

CDI, Clinical Dermatology Illustrated [monograph on CD-ROM], Reeves JRT, Maibach H. CME Multimedia Group, producers. 2nd ed. Version 2.0. San Diego: CME; 1995.

- **Arquivo de computador**

Hemodynamics III: the ups and downs of hemodynamics [computer program]. Version 2.2. Orlando (FL): Computerized Educacional Systems; 1993.

#### Patente

Larsen CE, Trip R, Johnson CR, inventors; Novoste Corporation, assignee. Methods for procedures related to the electrophysiology of the heart. US patent 5,529,067. 1995 Jun 25.

**Abreviaturas:** devem ser evitadas ou usadas apenas as oficiais.

**Unidades de medida e seus símbolos:** utilizar as legais do Sistema Internacional de Metrologia.

**Tabelas:** as tabelas devem ser encaminhadas em folhas separadas e designadas no texto como “Tabelas”. A sua localização aproximada deve ser indicada no texto. Serão numeradas consecutivamente, com números arábicos e encabeçadas pelos respectivos títulos, que devem ser breves e indicar claramente o conteúdo. Os dados apresentados em tabela não devem ser repetidos em gráficos.

**Ilustrações** (fotografias, gráficos, desenhos, mapas etc.): as ilustrações devem ser encaminhadas em folhas separadas e designadas no texto como “Figuras”: terão numeração única e seqüencial, em algarismos arábicos e devem apresentar na sua parte inferior e fora da área de reprodução, informações breves e claras que esclareçam o conteúdo da mesma. As suas localizações aproximadas devem ser indicadas no texto. Todas as ilustrações devem ser tão claras que permitam sua reprodução com redução de 6,5 cm no sentido da largura, sem perda de nitidez ou legibilidade. As ilustrações coloridas estão sujeitas à confirmação. Se as ilustrações enviadas já tiverem sido publicadas, mencionar a fonte e a permissão para a reprodução.

#### Da Publicação

1. Os trabalhos destinados à publicação na **Revista do Instituto Adolfo Lutz** deverão ser encaminhados à Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz, Setor de Publicações, Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira César, São Paulo/SP, 01246-902, a/c: Rocely Bueno.

2. Todo trabalho entregue para publicação deverá ser assinado pelo autor e trazer endereço para correspondência ou endereço eletrônico. No caso de mais de um autor, deverá ser expressamente indicado o responsável pela publicação.

3. Os trabalhos serão publicados em ordem cronológica de aprovação, salvo o caso especial de comunicação e nota científica, que terá prioridade.

4. A data de recebimento e a de aprovação do artigo constarão obrigatoriamente no mesmo.

5. As provas tipográficas serão revisadas pela Comissão de Redação de Publicações Oficiais do Instituto Adolfo Lutz. Essa Comissão se reserva o direito de introduzir alterações nos originais, visando a manutenção da homogeneidade e a qualidade da publicação, respeitando, porém, o estilo e as opiniões dos autores.

6. É permitida a reprodução, no todo ou em parte, de artigos publicados na Revista do Instituto Adolfo Lutz, desde que sejam indicados a origem e o nome do autor, de conformidade com a legislação sobre direitos autorais.

#### Da Distribuição

A Revista Adolfo Lutz é distribuída gratuitamente a entidades governamentais, culturais, ou em permuta de periódicos nacionais ou estrangeiros.

SUMÁRIO/CONTENTS

Artigo de Revisão/ Review

- 1067 Rotavírus em comunidades indígenas sul-americanas.**  
Rotavirus in south-americans indians communities.  
Fernanda Faria COSTA, Adriana LUCHS, Audrey CILLI, Simone Guadagnucci MORILLO, Rita de Cássia Compagnoli CARMONA, Maria do Carmo Sampaio Tavares TIMENETSKY ..... 73-77
- 1068 Perfil dos principais componentes em bebidas energéticas: cafeína, taurina, guaraná e glucoronolactona.**  
Major compounds profiles in energetic drinks: caffeine, taurine, guarana, and glucoronolactone.  
Joelia Marques de CARVALHO, Geraldo Arraes MAIA, Paulo H.M. de SOUSA, Sueli RODRIGUES ..... 78-85

Artigos Originais/ Original Articles

- 1069 Influência da lecitina sobre os níveis de retinol do leite materno.**  
Influence of lecithin on retinol concentration in human milk.  
Fernanda B. SOARES, Karla Danielly da S. RIBEIRO, Roberto DIMENSTEIN ..... 86-88
- 1070 Avaliação de critérios estatísticos utilizados em programas interlaboratoriais para pesquisa de chumbo em sangue.**  
Evaluation of statistical criteria applicable to interlaboratory comparisons for lead in blood.  
Franca Durante de MAIO, Odair ZENEBO, Paulo TIGLEA, Roberta I. S. OKURA, Alice M. SAKUMA ..... 89-93
- 1071 Perfil de ácidos graxos da pele e músculo de *Balistes capriscus* e *Menticirrhus litoralis*, pescados na região sul do Brasil.**  
Fatty acids profile in muscle and skin of *Balistes capriscus* and *Menticirrhus litoralis* fished in southern region of Brazil.  
Ademir, L. BASTOS, Ana Luiza M. BAISH, Rosilene M. CLEMENTIN, Leonor A. de SOUZA-SOARES, Eliana B. FURLONG ..... 94-99
- 1072 Determinação espectrofotométrica de ciclamato de sódio em alimentos e bebidas dietéticas e de baixas calorias.**  
Sodium cyclamate determination in dietetics and low calories foods and beverages by spectrophotometry.  
Mônica C. R. de CAMARGO, Maria Cecília F. TOLEDO ..... 100-105

- 1073 Monitoramento da qualidade da água de poços rasos de escolas públicas da zona rural do Município de Ibiúna/SP: parâmetros microbiológicos, físico- químicos e fatores de risco ambiental.**  
Monitoring the quality of water from groundwater located in the rural public schools of the Ibiúna municipality/ SP: microbiological and physicochemical parameters, and factors for environmental risk.  
Francisco R. M. SOTO, Yara S. K. FONSECA, Marcia R. RISSETO, Sérgio Santos de AZEVEDO, Maria de Lourdes B. ARINI, Maria Aparecida RIBAS, Cristiane R. V. MOURA, Daniel S. MARCHETTE ..... 106-111
- 1074 Susceptibilidade antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp. isoladas de alimentos envolvidos em surtos de doenças bacterianas transmitidas por alimentos, ocorridos na região noroeste do Estado de São Paulo, no período de abril de 1990 a dezembro de 2003.**  
Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. strains isolated from foods involved in foodborne bacterial disease outbreaks in the north western region of the State of São Paulo, Brazil, between April 1990 and December 2003.  
Jacqueline Tanury Macruz PERESI, Ivete Aparecida Zago Castanheira de ALMEIDA, Elisabete Alves CARDIGA, Denise Fusco MARQUES, Fátima Aparecida CARNICEL, Fernando Leite HOFFMANN ..... 112-117
- 1075 Estudo comparativo entre os métodos *in vivo* e *in vitro* na análise toxicológica de produtos de higiene e sua avaliação microbiológica.**  
Comparative study between *in vivo* and *in vitro* toxicological methods and microbiological quality assessment in disposable hygienic products.  
Lígia L. MIYAMARU, Maria C. SANTA BÁRBARA, Áurea S. CRUZ, Tamiko I. IKEDA, Harumi SAKUMA, Odair ZENEBON ..... 118-122
- 1076 Avaliação microbiológica de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.).**  
Microbiological evaluation of yerba-maté (*Ilex paraguariensis* St. Hil.).  
Liane M. V. BARBOZA, Nina WASZCZYNSKYJ, Renato J. S. de FREITAS ..... 123-126
- 1077 Detecção de *Vibrio cholerae* O1 em ostras utilizando anticorpo monoclonal em ensaio de aglutinação.**  
Use of monoclonal antibody for detecting *Vibrio cholerae* O1 in oysters by means of agglutination test.  
Christiane Asturiano RISTORI, Ruth Estela Gravato ROWLANDS, Miyoko JAKABI, Dilma Scala GELLI, Mônica CG SCOLA, Elizabeth N de GASPARI ..... 127-132
- 1078 Soroprevalência de HIV, sífilis, hepatite B e C em mulheres do Centro de Ressocialização Feminino, Rio Claro, São Paulo.**  
Seroprevalence of HIV, syphilis, and hepatitis B and C among women confined at Centro de Ressocialização Feminino of Rio Claro, São Paulo.  
José Antonio Pistarín Berra, Liliana Brancacio Bacetti, Alcione Alves Buzo ..... 133-136
- 1079 Distribuição dos genótipos do HCV em pacientes das regiões de Botucatu, Bauru e Assis, SP, Brasil.**  
HCV genotypes distribution in patients from Botucatu, Bauru and Assis, São Paulo State, Brazil.  
Sílvia M. CORVINO, Rita M.S. HENRIQUES, Rejane M.T. GROTO, Maria Inês de M.C. PARDINI .... 137-140
- 1080 Uterine cytopathology in a public health laboratory: impact from 20 years data (1984-2003).**  
Citopatologia uterina em laboratório de saúde pública: impacto dos dados de 20 anos (1984-2003).  
Luzia Setuko Umeda YAMAMOTO, Simone SAITO, Sonia Maria Miranda PEREIRA, Maria Lucia UTAGAWA, Adhemar LONGATTO-FILHO ..... 141-145

# Rotavírus em comunidades indígenas sul-americanas

## Rotavirus in south-americans indians communities

RIALA6/1067

Fernanda Faria COSTA, Adriana LUCHS, Audrey CILLI, Simone Guadagnucci MORILLO, Rita de Cássia Compagnoli CARMONA, Maria do Carmo Sampaio Tavares TIMENETSKY\*

\* Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz, Departamento de Virologia, Laboratório de Vírus Entéricos, Avenida Dr. Arnaldo, nº 355, São Paulo, 01246-902, fax: (11)3088-3753; fone: (11)3068-2909, e-mail: mtimenetsky@ial.sp.gov.br e/ou faria.fer@gmail.com, São Paulo, SP, Brasil.

Recebido: 30/11/2005 – Aceito para publicação: 17/03/2006

### RESUMO

Rotavírus são os agentes etiológicos mais importantes das gastroenterites em crianças menores de cinco anos, responsáveis por vários surtos de diarreia em países desenvolvidos e em desenvolvimento. As doenças diarreicas agudas são os principais problemas de saúde dentro das comunidades indígenas. Vigilâncias sorológicas em índios brasileiros demonstraram 17% a 74% de soropositividade para rotavírus. A investigação de surtos entre essas populações são raras, principalmente na região sudeste do Brasil. A identificação da fonte original de tais surtos é importante para a prevenção de casos futuros, além de contribuir para o estabelecimento de um perfil epidemiológico. As precárias condições sanitárias e de práticas de higiene, assim como a possibilidade de contato dos índios com reservatórios selvagens, levam a dispersão de enteropatógenos dentro das comunidades indígenas. Atenções especiais devem ser adotadas em relação ao monitoramento de diarreia entre Ameríndios, especialmente os sul-americanos.

**Palavras-Chave.** rotavírus, índios sul-americanos, surto de diarreia, genótipo G9.

### ABSTRACT

Rotaviruses are the most important etiologic agents of acute gastroenteritis in children under five years old. These viruses are responsible for several diarrhea outbreaks in both developed and developing countries. Acute diarrhea diseases are the foremost health problem in Indians communities. Serological survey among Brazilian Indians demonstrated seropositivity for rotavirus ranged from 17% to 74%. Outbreaks investigations among these populations are extremely rare, especially in Brazilian southwestern region, standing out the importance in identifying the source of ongoing outbreaks, and for preventing the hereafter -and/or most severe cases. The poor sanitation conditions and hygiene practices, as well as the possibility of native contact with wild virus reservoirs, account for enteropathogens spreading within Indian communities. Special precautions should currently be taken with respect to diarrhea monitoring among Amerindians, especially in the South American populations.

**Key Words.** rotaviruses, South American Indians, genotype G9, diarrhea outbreak.

### SUMÁRIO

Introdução .....	74
Rotavírus no Brasil .....	74
Saúde indígena .....	74
Infecções por rotavírus em comunidades indígenas no mundo .....	75
Infecções por rotavírus em comunidades indígenas no Brasil .....	75
Considerações finais .....	76
Referências .....	76

## INTRODUÇÃO

Os rotavírus são reconhecidamente os agentes virais mais importantes associados a doenças diarreicas agudas, atingindo humanos e várias espécies de mamíferos e aves<sup>1</sup>. Os episódios de diarreia podem variar de um quadro leve, com diarreia líquida e duração limitada, a quadros graves com febre, vômitos e desidratação. As conseqüências da infecção estão relacionadas à idade. Apesar da doença diarreica ocorrer primariamente em crianças na faixa etária de 6 meses a 2 anos, também é comum em jovens e adultos, associada a surtos esporádicos de diarreia em espaços fechados como escolas, creches, ambientes de trabalho e hospitais<sup>2,3,4</sup>.

Os rotavírus são eliminados em grande concentração em fezes infectadas, sendo transmitidos pela via fecal-oral, por água, alimentos e objetos contaminados, e pessoa a pessoa<sup>5</sup>.

O rotavírus pertence à família *Reoviridae*. A partícula viral completa é composta por triplo capsídeo protéico contendo o genoma de RNA de fita dupla segmentado, que codifica proteínas estruturais e não estruturais. As principais proteínas estruturais - VP4, VP6 e VP7 - atuam como antígenos na indução de anticorpos neutralizantes, provocando resposta imune protetora, e formam a base da classificação atual dos rotavírus divididos em grupos A-H (VP6), e em genótipos/sorotipos P (VP4) e G (VP7)<sup>6</sup>. Os genótipos são determinados por métodos moleculares, enquanto os sorotipos, por métodos imunológicos. A detecção dos rotavírus do grupo A pode ser realizada por meio de reações imunoenzimáticas, em ensaios de captura de antígeno diretamente do material fecal, empregando-se vários *kits* comerciais desenvolvidos para o diagnóstico rápido<sup>7</sup>.

Até o momento, foram identificados 10 G (VP7) e 13 P (VP4) tipos de rotavírus humanos. Os tipos G1 a G4 são os mais comuns e para os quais estão sendo desenvolvidas vacinas; os tipos G8 e G12 são raramente encontrados<sup>1,8</sup>. Os rotavírus tipos G6 e G10, que eram exclusivamente patógenos bovinos, mas foram detectados em crianças com diarreia<sup>9</sup>. O tipo G9 é prevalente na Índia, sendo reconhecido como o genótipo emergente em todo o mundo a partir do final da década de 90<sup>13,17-30</sup>, considerado atualmente como o quinto G tipo de importância clínica em todo o mundo<sup>10-16</sup>.

Foram detectados tipos incomuns de rotavírus em amostras humanas, como rotavírus G5, P[3] e misturas de tipos de rotavírus em uma mesma amostra. A presença de múltiplos tipos G e/ou P nas amostras, consistente com infecções com mais do que um tipo de rotavírus aumenta a chance de rearranjos genéticos durante infecções naturais<sup>7,31</sup>.

### Rotavírus no Brasil

No Brasil a sazonalidade é variável, com aumento na incidência dos rotavírus nos meses mais frios ou no período de seca, entre maio e setembro, nos Estados das regiões Central e Sudeste. Por outro lado, no Norte e Nordeste a ocorrência de rotavírus se distribui durante todo o ano<sup>32</sup>.

Estudos realizados nos últimos dez anos no país demonstraram a circulação dos tipos mais comuns de rotavírus (G1, G2, G3, G4 e P[4], P[6] e P[8]), observando-se maior incidência de rotavírus tipo G1P[8]<sup>7,33,34</sup> e a emergência do tipo G9<sup>5,16,26,35,36</sup>. O tipo G5, reconhecido como patógeno em suínos em vários países também foi encontrado no Brasil<sup>7,33,34,37,38</sup>.

No Brasil foi relatado um surto de diarreia em crianças hospitalizadas no Rio de Janeiro entre janeiro de 1997 e dezembro de 1998, sendo o genótipo G9 responsável por 13% dos isolados<sup>11</sup>. Recentemente, Santos et al<sup>35</sup> relatou a predominância deste mesmo genótipo na cidade de Salvador durante os anos de 1999, 2000 e 2002 entre crianças hospitalizadas, representando 89,2% das cepas de rotavírus detectadas em 1999, 85,3% em 2000 e 74,5% em 2002. No Estado de São Paulo o genótipo G9 é o mais prevalente nesses dois últimos anos<sup>5,26,36</sup>.

Morillo et al<sup>39</sup> relataram surtos de rotavírus em creches, identificando como agente etiológico o genótipo G9 em 54,6% das amostras. Entre fevereiro de 2004 a janeiro de 2005, Timenetsky et al<sup>26</sup> demonstraram alta incidência para o genótipo G9 (58,6%), seguido pelos genótipos G1 (29%), G3 (8,5%), G4 (0,7%) e G2 (0,3%), em pesquisa realizada em 2 municípios do Estado de São Paulo. Infecções mistas de G1+G9 também foram detectadas em 1% das amostras de fezes.

### Saúde Indígena

O complexo quadro de saúde indígena está diretamente relacionado a processos históricos de mudanças sociais, econômicas e ambientais atreladas à expansão de frentes demográficas e econômicas nas diversas regiões do país ao longo do tempo<sup>40</sup>.

A enorme sociodiversidade deve ser considerada quando é discutido o processo saúde/doença dos povos indígenas no Brasil. São aproximadamente 200 diferentes etnias, que falam em torno de 170 línguas distintas e que têm as mais diversas experiências de interação com a sociedade nacional. Há, desde alguns poucos grupos (ou remanescentes de) vivendo ainda relativamente isolados na Amazônia, até outros com significativas parcelas de suas populações vivendo em zonas urbanas. A depender da fonte, o total do contingente indígena no Brasil varia entre 280.000 e 320.000 pessoas, que vivem em milhares de comunidades de norte a sul do país<sup>41</sup>.

São praticamente desconhecidos os mais básicos aspectos da dinâmica demográfica dos povos indígenas. Estatísticas vitais, tais como coeficiente de mortalidade infantil, expectativa de vida ao nascer e taxas brutas de natalidade e mortalidade, essenciais para monitorar o perfil de saúde/doença e planejar ações de saúde e educação, não são disponíveis para a ampla maioria dos grupos<sup>40</sup>. A entrada de profissionais de saúde numa comunidade indígena para a coleta de dados e de amostras clínicas é bastante difícil.

O perfil epidemiológico dos povos indígenas do Brasil é pouco conhecido, o que se deve a escassez de investigações, à ausência de censos e de outros inquéritos regulares e à precariedade dos sistemas de registros de informações sobre morbidade, mortalidade e cobertura vacinal, entre outros fatores <sup>40</sup>.

Um dos maiores problemas na obtenção de dados sobre morbidade em indígenas diz respeito à falta de sistematização na coleta e no armazenamento dos registros, dificultando análises epidemiológicas. A dificuldade começa na própria definição do diagnóstico, pois na maioria dos casos, os diagnósticos não são confirmados com base em exames laboratoriais que permitam a confirmação etiológica. Os diagnósticos constantes dos registros podem ter sido feitos tanto por profissionais de saúde com nível superior (médico ou enfermeiro) como agentes indígenas de saúde na aldeia <sup>42</sup>.

A concentração de domicílios, o sedentarismo e a convivência direta com animais domésticos, aliados a falta de infra-estruturas criam um ambiente propício para a propagação de enteropatógenos de veiculação hídrica e alimentar <sup>42-44</sup>.

Diversos estudos têm demonstrado uma íntima relação entre amamentação e introdução de novos alimentos, acarretando variações nos graus de proteção e exposição a patógenos intestinais e, conseqüentemente, na incidência de doenças diarreicas em crianças. Nos primeiros meses de vida, crianças indígenas geralmente são mantidas exclusivamente com amamentação, o que lhes oferece maior proteção. Ao iniciar o processo de desmame e a introdução de novos alimentos, o grau de exposição a enteropatógenos aumenta consideravelmente. Os rotavírus figuram entre os principais agentes que ocasionam diarreia entre os indígenas <sup>45</sup>.

### **Infecções por Rotavírus em Comunidades Indígenas no Mundo**

A fim de se observar padrões de infecção, morbidade e crescimento de descendentes de índios Maias da Guatemala, foi realizado um estudo com 45 crianças de 0-3 anos. Foram analisadas 5.891 amostras fecais (mantidas congeladas de 1964 a 1969), identificando-se rotavírus em 10% das amostras <sup>46</sup>.

Durante o outono de 1980, foi realizado estudo para patógenos entéricos, virais e bacterianos, na Reserva Apache San Carlos, Arizona, USA. Foram analisados 19 pacientes e 12 controles com idade inferior a 2 anos. Onze (58%) pacientes e 2 (17%) controles foram positivos para rotavírus, sendo 10 (91%) de 11 rotavírus positivos em pacientes com menos de 1 ano de idade <sup>47</sup>.

Diarreia entre neonatos foi estudada em 98 famílias residentes em Winnipeg, Manitoba, em 31 famílias de índios nativos e em 15 famílias Inuit (esquimó), residentes em regiões isoladas no norte do Canadá. A taxa de infecção por rotavírus em neonatos foi significativamente maior, ocorrendo com maior freqüência nos 6 primeiros meses de

vida na comunidade do norte (0,36% em Winnipeg, e 1,07% em esquimó) <sup>48</sup>.

Durante uma epidemia ocorrida em Abril de 1981 numa população indígena em White Mountain Apache Indians foram detectados rotavírus em 169 (73%) de 233 amostras <sup>49</sup>.

Estudo realizado em reserva indígena no Fort Apache Indian Reservation Whiteriver, Arizona, USA, durante 1981 a 1985, demonstrou que rotavírus, *Escherichia coli*, e *Shigella* foram os agentes etiológicos mais comuns, com padrão similar ao encontrado em países em desenvolvimento <sup>50</sup>.

### **Infecções por Rotavírus em Comunidades Indígenas no Brasil**

Apesar da reconhecida importância sanitária das diarreias entre populações indígenas brasileiras, são poucos os estudos que investigaram a ocorrência de microorganismos enteropatógenos entre tais populações <sup>44</sup>.

Os rotavírus figuram entre os principais agentes que ocasionam diarreias entre os indígenas. Dentre os casos melhor documentados, podem ser mencionadas as investigações epidemiológicas realizadas entre os Tiriyo no Norte do Pará <sup>43</sup>, entre os Suruí e Karitiana de Rondônia e de diversas outras comunidades Amazônicas <sup>44</sup>.

O rotavírus foi o agente responsável por um surto epidêmico ocorrido em julho-agosto de 1977 entre os índios da aldeia Tiriyo (PA), onde se detectaram 25,6% de soroconversões, com base no exame de 127 amostras pareadas de soro <sup>2,43</sup>.

Anticorpos contra rotavírus foram detectados pela técnica de ELISA em 711 (54,7%) de 1.099 amostras de soro, coletadas de índios de 13 comunidades relativamente isoladas da região amazônica. Os Índios Parakanas Novos apresentaram prevalência de imunidade de 17,9% para ELISA e 10,7% para Imunofluorescência (IF). As outras tribos com exceção dos Ianomâmis, Tucanos e Xicrins, possuem porcentagens de positividade maiores que 50% para ambas as técnicas. Altas porcentagens de positividade também foram observadas entre os Apalás (56-74%) <sup>51</sup>.

Estudo realizado por Santos et al <sup>44</sup>, indicou porcentagens de soropositividade elevadas para anticorpos anti-rotavírus em tribos da região de Rondônia: 67,8% para os Suruí e 77,4% para os Karitiana, através da técnica de ELISA, e 45,5% para os Suruí e 56,7% para os Karitiana através de Imunofluorescência direta.

### **Considerações Finais**

A maior parte dos estudos epidemiológicos envolvendo gastroenterites agudas em comunidades indígenas são realizados em tribos da região norte do Brasil. Nas demais regiões do país não há registro literário, ressaltando a importância na elaboração e realização de projetos que visem a vigilância epidemiológica e sanitária dessas populações.

Devido à importância epidemiológica dos rotavírus nas diarreias graves, inúmeros esforços têm sido realizados na elaboração de uma vacina eficaz para o combate à doença, tendo

como meta prevenir a diarreia grave, que pode levar à desidratação, reduzindo a morbidade e a mortalidade infantil.

Ressaltamos ainda, a importância da adição do genótipo G9 na vacina contra rotavírus, devida sua alta incidência nos últimos anos. As vacinas recentemente lançadas em alguns países como, Rotarix™ (GlaxoSmithKline) e Rotateq (Merk) não contemplam este genótipo em sua formulação. Estudos recentes de uma vacina que será produzida no Brasil pelo Instituto Butantan em parceria com National Institutes of Health (NIH)<sup>52</sup> prevê a adição desse genótipo.

## REFERÊNCIAS

- Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RM. Rotaviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et al. editors. *Fields Virology* 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott William and Williams; 2001. p. 1787-1833.
- Linhares AC, Pinheiro FP, Freitas RB, Gabbay YB, Shirley JA, Beards GM. An outbreak of Rotavirus diarrhea among a nonimmune, isolated South American Indian community. *Am J Epidemiol* 1981; 113: 703-10.
- Castro L, Rodrigues DP, Flauzino R, Moura M, Leite JP. An outbreak of diarrhoea associated with rotavirus serotype 1 in a day care nurse in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst Oswaldo Cruz* 1994; 89: 5-9.
- Timenetsky MCST, Gouvea V, Santos N, Alge ME, Kisiellius JJ, Carmona RCC. Outbreak of severe gastroenteritis in adults and children associated with type G2 rotavirus. *J Diarrhoeal Dis Res* 1996; 14: 71-4.
- Timenetsky MCST, Carmona RCC, Morillo SG, Costa FF, Cilli A, Borges DB et al. Surto de Diarreia por Rotavírus. *Bol Epidem Paulista [Serial on line]* 2004 Out [cited 2005 Abr 01]; 10 (1). Available from: URL: <http://www.cve.saude.sp.gov.br>.
- Hoshino Y, Kapikian AZ. Rotavirus antigens. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994; 185: 179-227.
- Timenetsky MCST, Santos N, Gouvea V. Survey of rotavirus G and P types associates with human gastroenteritis in São Paulo, Brazil, from 1986 to 1992. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2622-4.
- Kirkwood CD, Butteny J. Rotavirus vaccine and update. *Expert Opin Biol Ther* 2003; 3: 97-105.
- Gentsch JR, Woods PA, Ramachandran M, Das BK, Leite JP, Alfieri A et al. Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: implications for vaccine development. *J Infect Dis* 1996; 174: 30-6.
- Ramachandran M, Gentsch JR, Parashar UD, Jin S, Woods PA, Colmes JL et al. Detection and characterization of novel rotavirus strains in the United States. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3223-9.
- Araújo IT, Ferreira MSR, Fialho AM, Assis RM, Cruz CM, Rocha M. Rotavirus genotypes P[4]G9, P[6]G9, and P[8]G9 in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* 2001; 39:1999-2001.
- Bok K, Palacios G, Sijvarger K, Matson D, Gomez J. Emergence of G9P[6] human rotavirus in Argentina: phylogenetic relationship among G9 strains. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 4020-5.
- Cunliffe NA, Dove W, Bunn JEG. Expanding global distribution of rotavirus serotype G9: detection in Libya, Kenya and Cuba. *Emergence Infect Dis* 2002; 7: 890-2.
- Laird AR, Gentsch JR, Nakagomi T, Nakagomi O, Glass RI. Characterization of serotype G9 rotavirus strains isolated in The United States and India from 1993 to 2001. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3100-1.
- Martella V, Terio V, Del Gaudio G. Detection of the emerging rotavirus G9 serotype at high frequency in Itália. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3960-3.
- Santos N, Volotão EM, Soares CC, Campos GS, Sardi SI, Hoshino Y. Rotavirus strains bearing genotype G9 or P[9] recovered from Brazilian children with diarrhea from 1997 to 1999. *J Clin Microbiol* 2001; 37:2734-6.
- Banyai K, Gentsch JR, Schipp R, Schipp R, Meleg E, Mihaly I et al. Dominating prevalence of P[8], G1 and P[8], G9 rotavirus strains among children admitted to hospital between 2000 and 2003 in Budapest, Hungary. *J Med Virol* 2005; 7: 414-23.
- Cataloluk O, Iturriza M, Gray J. Molecular characterization of rotavirus circulating in the population in Turkey. *Epidemiol Infect* 2005; 133: 673-8.
- Chen KT, Chen PY, Tang RB, Huang YF, Lee JY, Chen HY et al. Sentinel hospital surveillance for rotavirus diarrhea in Taiwan, 2001-2003. *J Infect Dis* 2005; 192: 44-8.
- Jiraphongsa C, Bresee JS, Pongsuwanna Y, Kluabwang P, Poonawaagul U, Arpornit P et al. Epidemiology and burden of rotavirus diarrhea in Thailand: results of sentinel surveillance. *J Infect Dis* 2005; 192: 87-93.
- Kang G, Kelkar SD, Chitambar SD, Ray P, Naik T. Epidemiological profile of rotaviral infections in India: challenges for the 21st century. *J Infect Dis* 2005; 192: 120-6.
- Kang JO, Kilgore P, Kim JS, Nyambat B, Kim J, Suh HS et al. Molecular epidemiological profile of rotavirus in South Korea, July 2002 through June 2003: emergence of G4P[6] and G9[8] strains. *J Infect Dis* 2005; 192: 57-63.
- Rahman M, Matthijnsens J, Goegebuer T, De Leener K, Vanderwegen L, van der Donk I et al. Predominance of rotavirus G9 genotype in children hospitalized for rotavirus gastroenteritis in Belgium during 1999-2003. *J Clin Virol* 2005; 33:1-6.
- Rubilar-Abreu E, Hedlund KO, Svensson L, Mittelholzer C. Serotype G9 rotavirus infections in adults in Sweden. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 1374-6.
- Steyer A, Poljsak-Prijatelj M, Barlic-Maranja D, Bufon T, Marin J. The emergence of rotavirus genotype G9 in hospitalized children in Slovenia. *J Clin Virol* 2005; 33:7-11.
- Timenetsky MCST, Carmona RCC, Morillo SG et al. Incidence of rotavirus G and P in children in Southern Brazil: Emergence of genotype G9. In: *Joint Meeting of the 3 divisions of the International Union of Microbiological Societies* 2005. San Francisco: International Union of Microbiological Societies, 2005: 125.
- Zhou Y, Li L, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. Distribution of human Rotaviruses, especially G9 strain, in Japan from 1996 to 2000. *Microbiol Immunol* 2003; 47:591-9.
- Fang ZY, Yang H, Qi J, Zhang J, Sun LW, Tang JY et al. Diversity of rotavirus strains among children with acute diarrhea in China: 1998-2000 surveillance study. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1875-8.
- Jain V, Bima LK, Maharaj KB, Roger IG, Jon RG. Great diversity of group A Rotavirus strains and high prevalence of mixed Rotavirus infections in India. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3524-39.
- Ramachandran M, Kirwood CD, Unicomb L, Cunliffe NA, Ward RL, Bhan MK et al. Molecular characterization of serotype G9 rotavirus strains from a global collection. *Virology* 2000; 278:436-44.
- Timenetsky MCST, Gouvea V, Santos N, Carmona RCC, Hoshino Y. A novel human rotavirus serotype with dual G5-G11 specificity. *J Gen Virol* 1997; 78: 1373-8.
- Pereira HG, Linhares AC, Candeias JAN, Glass RI. National Laboratory surveillance of viral agents of gastroenteritis in Brazil. *Bull Pan Am Health Organ* 1993; 27: 224-33.
- Carmona RCC, Timenetsky MCST, Silva FF, Granato CFH. Characterization of rotavirus strains from hospitalized and Outpatient children with acute diarrhoea in São Paulo, Brazil. *J Med Virol* 2004; 74: 166-72.
- Leite JPG, Alfieri AA, Woods PA, Glass RI, Gentsch JR. Rotavirus G and P Typing circulating in Brazil: Characteration by RT-PCR, probe hybridization, and sequence analysis. *Arch of Virol* 1996; 141: 2365-74.
- Santos N, Volotão EM, Soares CC, Campos GS, Sardi SI, Hoshino Y. Predominance of rotavirus genotype G9 during the 1999, 2000 and 2002, seasons among hospitalized children in the city of Salvador, Bahia, Brazil: implications for future vaccine strategies. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 4064-9.
- Carmona RCC, Timenetsky MCST, Morillo SG, Richtzenhain LJ. Human rotavirus serotype G9, Sao Paulo, Brazil, 1996-2003. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 963-8.

37. Mascarenhas JDP, Linhares AC, Gabbay YB, Leite JP. Detection and characterization of rotavirus G and P types from children participating in a rotavirus vaccine trial in Belém, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97: 113-7.
38. Gouvea V, Castro L, Timenetsky MCST, Greenberg H, Santos N. Rotavirus Serotype G5 Associated with Diarrhea in Brazilian Children. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1408-9.
39. Morillo SG, Borges DB, Cilli A, Costa FF, Carmona RCC, Timenetsky MCST. Outbreak of gastroenteritis in day care center. In: XV National Meeting of Virology: São Pedro: Virus Reviews & Research, 2004; 9: 95.
40. Coimbra Jr CEA, Flowers NM, Salzano FN, Santos RV. The Xavante in transition: health, ecology and bioantropology in Central Brazil. Michigan: University of Michigan Press; 2002
41. Ricardo CA. A sociodiversidade nativa contemporânea no Brasil. In: Povos Indígenas no Brasil 1991/1995. São Paulo: Instituto Socioambiental; 1996.
42. Haverroth M, Escobar AL, Coimbra Jr CEA. Infecções intestinais em populações indígenas de Rondônia (Distrito Sanitário Especial Indígena Porto Velho). Porto Velho: Centro de Estudos em Saúde do Índio de Rondônia (CESIR); 2003.
43. Linhares AC. Epidemiologia das infecções diarreicas entre populações indígenas da Amazônia. *Cad Saúde Publ* 1992; 8:121-8.
44. Santos R, Linhares AC, Coimbra Jr CEA. Estudos epidemiológicos entre grupos indígenas de Rondônia. IV. Inquérito sorológico para Rotavírus entre os Suruí e Karitiana. *Rev Saúde Publ* 1991, 25: 230-2.
45. Linhares AC. Rotavirus infection in Brazil: epidemiology, immunity and potencial vaccination. *Braz J Infec Dis* 1997; 1: 283-4.
46. Mata L, Simhon A, Urrutia JJ, Kronmal RA, Fernandez R, Garcia B. Epidemiology of rotaviruses in a cohort of 45 Guatemala Mayan Indian children observed from birth to the age of three years. *J Infect Dis* 1983; 148: 52-61.
47. Engleberg NC, Holburt EN, Barret TJ, Gary Jr GW, Trujillo MH, Feldman RA et al. Epidemiology of diarrhea due to rotavirus on an Indian reservation: risk factors in the home environment. *J Infect Dis* 1982; 145: 894-8.
48. Gurwith M, Wenman W, Gurwith D, Brunton J, Feltham S, Greenberg H. Diarrhea among infantis and young children in Canada: a longitudinal study in three northern communities. *J Infect Dis* 1983; 147: 685-92.
49. Santosham M, Yolken RH, Wyatt RG, Bertrando R, Black RE, Spira WN et al. Epidemiology of rotavirus diarrhea in a prospectively monitored American Indian Population. *J Infect Dis* 1985; 152: 778-83.
50. Sack RB, Santosham M, Reid R, Black R, Croll J, Yolken R et al. Diarrhoeal diseases in the white Mountain Apaches: clinical studies. *J Diarrhoeal Dis Res* 1995; 13: 12-7.
51. Linhares AC, Salbe EV, Gabbay YB, Rees N. Prevalence of Rotavirus antibody among isolated South American Indian communities. *M J Epidemiol* 1986; 123: 699-709.
52. Kapikian AZ, Simonsen L, Vesikari T, Hocino Y, Morens DM, Chanock RM et al. A hexavalent human rotavirus-bovine rotavirus (UK) reassortant vaccine designed for use in developing countries and delivered in a schedule with the potential to eliminate the risk of intussusception. *J Infect Dis* 2005; 192: 22-9.

# Perfil dos principais componentes em bebidas energéticas: cafeína, taurina, guaraná e glucoronolactona

## Major compounds profiles in energetic drinks: caffeine, taurine, guarana, and glucoronolactone

RIALA6/1068

Joelia Marques de CARVALHO<sup>1</sup>, Geraldo Arraes MAIA\*<sup>1</sup>, Paulo H.M. de SOUSA<sup>2</sup>, Sueli RODRIGUES<sup>1</sup>

\* Endereço para correspondência: <sup>1</sup> Universidade Federal do Ceará, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Caixa Postal 12168, CEP 60356-000, Fortaleza, Ceará, fone/fax: (85) 3366-9752.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Viçosa

Recebido: 17/06/2005 – Aceito para publicação: 20/03/2006

### RESUMO

As chamadas bebidas energéticas tiveram um grande crescimento no mercado nacional e internacional, principalmente entre os jovens e praticantes de atividades esportivas, seus maiores consumidores. Este trabalho apresenta uma revisão de literatura sobre os componentes mais comuns presentes nas bebidas energéticas: cafeína, taurina, guaraná e glucoronolactona, dando ênfase à legislação do Brasil, composição, ação sobre o organismo, aspectos toxicológicos e metabólicos. As pesquisas e estudos publicados demonstram que ainda há muitas divergências em relação às concentrações adequadas para o uso destes componentes na formulação destas bebidas e que se faz necessário maiores estudos sobre a interação destes componentes com outras substâncias como o álcool, uma vez que as bebidas energéticas são freqüentemente consumidas misturadas às bebidas alcoólicas com a finalidade de potencializar o efeito do álcool.

**Palavras-Chave.** bebida energética, composição, cafeína, taurina, glucoronolactona.

### ABSTRACT

In the last years the energetic drinks have come into the market, and in a remarkable way. Young people and athletes largely consume these sorts of beverages. In this work a review on the major compounds found in energetic drinks (caffeine, taurine, guarana and glucoronolactone) is presented, emphasizing the Brazilian legislations aspects, composition, physiological effects, metabolism, and toxicological aspects. According to the investigators and reported studies, the ideal contents of these stimulating agents in beverages formulation have not established yet, and further studies on the interactions of these compounds with other substances, as alcoholic drinks have to be done, since energetic drinks have largely been consumed in combination with alcoholic drinks; and mixing both kinds of drinks causes the alcohol effect enhancement.

**Key Words.** energetic drinks, caffeine, taurine, guarana, glucoronolactone.

### SUMÁRIO

Introdução .....	79
1.Aspectos da legislação brasileira .....	79
2.Ingredientes para bebidas energéticas .....	80
2.1. Cafeína .....	80
2.1.1. Ações sobre o organismo .....	80
2.1.2. Mecanismo de toxicidade .....	82
2.1.3. Uso como agente de sabor .....	82
2.1.4. Ação da cafeína no desempenho de atletas .....	82
2.2. Taurina .....	82
2.2.1. Ações sobre o organismo .....	83

2.2.2. Mecanismo de toxicidade .....	84
2.3. Guaraná .....	84
2.3.1. Ações sobre o organismo .....	84
2.4. Glucoronolactona .....	84
2.4.1. Ações sobre o organismo .....	84
2.4.2. Mecanismo de toxicidade .....	84
3. Conclusão .....	84
Referências .....	85

## INTRODUÇÃO

As bebidas com adição de componentes estimulantes, muitas vezes designadas como bebidas energéticas, foram lançadas no mercado em 1987 e desde então, seu crescimento em todo mundo tem sido enorme<sup>1</sup>.

As substâncias estimulantes inicialmente foram utilizadas por desportistas. Em princípio, foram desenvolvidas para incrementar a resistência física, prover reações mais velozes a quem as consumia, levar a uma maior concentração nas atividades exercidas, evitar o sono, proporcionar sensação de bem-estar, estimular o metabolismo e ajudar a eliminar substâncias nocivas para o corpo<sup>2</sup>.

Estas bebidas são geralmente embaladas em latas finas com um visual atrativo e posicionadas entre os principais produtos do mercado de bebidas. Pertencem a nova classe de alimentos conhecidos como 'alimentos funcionais'. Estes alimentos afetam favoravelmente funções particulares do corpo<sup>3</sup>. Segundo Hilliam<sup>4</sup>, o desenvolvimento do mercado de alimentos funcionais está sujeito a influência dos seguintes aspectos: mudança nas atitudes e expectativas dos consumidores, crescente compreensão da ligação entre os constituintes das dietas e dos processos fisiológicos e avanços na ciência e tecnologia de alimentos.

Além de água, a maioria dos produtos comercializados como bebidas energéticas contém carboidratos e cafeína como seus principais ingredientes. O carboidrato tem a função de prover o nutriente energético e a cafeína de estimular o sistema nervoso central, além destes eles devem também conter uma ampla variedade de outros ingredientes como aminoácidos e vitaminas<sup>5</sup>.

Segundo o Safefood<sup>3</sup>, as bebidas energéticas são definidas como produtos que contém tipicamente cafeína, taurina e vitaminas, e podem conter uma fonte de energia (carboidratos), ou outras substâncias, comercializadas com propósito específico de fornecer real ou perceptiva melhoria psicológica ou efeitos na performance. Entretanto não há ainda um consenso sobre o nível máximo de cafeína e a funcionalidade dos ingredientes tais como a taurina e a glucoronolactona<sup>6</sup>.

Este trabalho apresenta uma revisão de literatura sobre os componentes mais comuns presentes nas bebidas energéticas: cafeína, taurina, guaraná e glucoronolactona, dando ênfase à legislação brasileira, composição, ação sobre o organismo, aspectos toxicológicos e metabólicos.

## 1. Aspectos da Legislação Brasileira

É muito importante fazer distinção entre bebidas energéticas e as bebidas conhecidas como bebidas para o esporte (sport drinks) ou bebidas isotônicas, que são produtos com diferentes funções e composição, embora os termos sejam usados de forma permutável. As bebidas para o esporte são principalmente designadas para repor fluídos e prover carboidratos e não contém normalmente os principais ingredientes das bebidas energéticas tais como: cafeína, taurina e glucoronolactona<sup>3,7</sup>.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), vinculada ao Ministério da Saúde, faz distinção entre as bebidas para o praticante de atividade física e as chamadas bebidas energéticas.

A Resolução RDC n° 273 de 22-09-05 do Ministério da Saúde<sup>8</sup> (que revogou a Portaria n° 868, de 03-11-98 do Ministério da Saúde<sup>9</sup>) têm como objetivo fixar requisitos mínimos de características e qualidade para as bebidas denominadas Composto Líquido Pronto para o Consumo, definidas como sendo produtos que contém como ingrediente(s) principal(is): inositol e/ou glucoronolactona, e/ou taurina, e/ou cafeína, podendo ser adicionada de vitaminas e/ou minerais até 100% da Ingestão Diária Recomendada (IDR) na porção do produto, podendo ser adicionados outros ingredientes desde que não haja descaracterização do produto.

Já o regulamento técnico para praticantes de atividades físicas, descrito na Portaria n° 222, de 24-03-98, do Ministério da Saúde<sup>10</sup> se aplica aos alimentos especialmente formulados e elaborados para praticantes de atividade física. Nesta categoria estão excluídas as bebidas alcoólicas e bebidas gaseificadas; produtos que contenham substâncias farmacológicas estimulantes, como por exemplo, a cafeína; hormônios e outras consideradas como *dopping* pelo Comitê Olímpico Internacional (COI); produtos que contenham substâncias medicamentosas ou indicações terapêuticas; produtos fitoterápicos; formulações à base de aminoácidos isolados (caso em que se enquadraria a utilização de taurina). Também neste regulamento técnico, encontra-se a definição de repositores energéticos descritos como produtos formulados com nutrientes que permitam o alcance e/ou manutenção do nível apropriado de energia para atletas. Nestes produtos, os carboidratos devem constituir, no mínimo, 90% dos nutrientes energéticos presentes na formulação. Opcionalmente, estes produtos podem conter vitaminas e ou minerais.

No entanto, de acordo com a atual legislação referente ao composto líquido pronto para o consumo o produto pode ser rotulado utilizando expressões como bebida energética ou *energy drink*, o que pode gerar alguma confusão para os consumidores destes produtos devido à proximidade dos termos.

Mesmo antes da atual legislação, o termo bebida energética já era comum na denominação destes produtos no Brasil, pois dentre os efeitos associados a estas bebidas estão reações como aumento da sensação subjetiva de alerta ou vigor, sensações relacionadas a um estado de “maior energia” e disposição no indivíduo.

Segundo Smit e Rogers<sup>11</sup>, as bebidas energéticas são um grupo de produtos anunciados como sendo capazes de promover estado de alerta, energia e redução do sono, o que pode não ocorrer, dependendo do indivíduo.

## 2. Ingredientes para bebidas energéticas

### 2.1. Cafeína

A cafeína é a droga de maior emprego, maior aceitação social e mais largamente utilizada no mundo<sup>12,13</sup>. Em suas fontes naturais, a cafeína tem sido consumida pelo homem em todo mundo há séculos<sup>14</sup>. É consumida regularmente por bilhões de pessoas, configurando diversas e variadas práticas culturais, sendo até vital para algumas economias<sup>6</sup>.

A cafeína é um alcalóide purínico da classe das metilxantinas (1, 3, 7-trimetilxantina), de ocorrência natural em folhas de mate, café, cacau, noz de cola. O café só contém cafeína, porém o cacau contém também outras metilxantinas, especialmente teofilina e teobromina<sup>16,17</sup>. As xantinas são substâncias capazes de estimular o sistema nervoso, produzindo certo estado de alerta de curta duração<sup>15</sup>.

Desde seu isolamento químico em 1820, a cafeína, além de estimulante, tem sido utilizada terapêuticamente no tratamento da apnéia infantil, no tratamento da acne e outras desordens da pele, sendo também empregada no tratamento de dores de cabeça e enxaquecas. A cafeína também é encontrada em uma variedade de medicamentos usados como analgésicos, diuréticos, controladores de peso e preparações para aliviar alergias<sup>14</sup>.

#### 2.1.1. Ações sobre o organismo

Devido a cafeína ser uma das substâncias mais largamente utilizadas em todo o mundo, os estudos sobre as implicações para a saúde resultantes do consumo desta substância, são de interesse dos consumidores de alimentos, bebidas e medicamentos<sup>12,18</sup>.

Segundo a legislação o composto líquido pronto para consumo pode conter o limite máximo de 35 mg/100mL de cafeína em sua composição<sup>8</sup>.

Para crianças que não consomem normalmente muito café ou chá, e que substituem água por refrigerantes de cola ou bebidas energéticas, há um aumento na ingestão diária de cafeína, quando comparada com outras fontes. Isso pode resultar

em mudanças no comportamento, como um aumento na irritabilidade, nervosismo e ansiedade<sup>19</sup>.

Os riscos relacionados ao consumo de cafeína durante a gravidez ainda são muito controversos. Muitas avaliações epidemiológicas sugerem que não há problemas na ingestão de cafeína abaixo de 300 mg/dia<sup>19</sup>.

Mais de 99% da dose ingerida é rapidamente absorvida a partir do trato gastrointestinal, elevando sua concentração no plasma sanguíneo entre 15 e 45 minutos. Uma vez na corrente circulatória, a cafeína penetra eficazmente em todos os tecidos corporais<sup>17,18</sup>.

O período de semi-eliminação da cafeína (o tempo requerido para que o corpo metabolize e elimine a metade da concentração no plasma sanguíneo: a meia-vida) oscila entre horas e dias, dependendo da idade, o sexo, a medicação e as condições de saúde, estado hormonal e se o indivíduo é ou não fumante<sup>17,18,20</sup>. Para sua eficaz eliminação, a cafeína deve ser convertida em seus metabólitos que são mais rapidamente excretados pela urina. Esta biotransformação ocorre principalmente no fígado<sup>17,18</sup>. A cafeína também pode ser excretada pelo leite materno<sup>20</sup>.

Arnaud et al<sup>21</sup> observaram um aumento da meia-vida da cafeína em mulheres grávidas, no terceiro mês de gestação. O estudo ainda afirma que os níveis de cafeína utilizados, baseados nos hábitos alimentares das gestantes, não apresentam nenhum risco para os fetos, mas recomendam que as gestantes consumam café ou bebidas descafeinadas, a fim de manter os níveis plasmáticos de cafeína mais baixos sem, contudo modificar seus hábitos alimentares.

Sabe-se com certeza que a cafeína afeta a função normal celular e tem diversos efeitos fisiológicos. É um estimulante do Sistema Nervoso Central (SNC) e, dependendo em parte da quantidade consumida, pode produzir uma variedade de efeitos em outros órgãos. Dependendo da dose, ela pode aumentar os batimentos cardíacos e a taxa de metabolismo basal, promover secreção ácida no estômago e aumentar a produção de urina. A cafeína também apresentou um efeito broncodilatador em jovens pacientes com asma<sup>20,22</sup>.

No sistema nervoso central, mais precisamente no sistema nervoso autônomo, o sistema de neurotransmissão baseado no neurotransmissor adenosina age como redutor da frequência cardíaca, da pressão sanguínea e da temperatura corporal. A cafeína exerce uma ação inibidora sobre os receptores do neurotransmissor adenosina, situados nas células nervosas<sup>15</sup>. Muitas das respostas fisiológicas com a administração de cafeína são opostas às de adenosina, por isso há uma sensação de revigoramento, diminuição do sono e fadiga<sup>15,18</sup>. A cafeína exerce um efeito sobre a descarga das células nervosas e a liberação de alguns outros neurotransmissores e hormônios, tais como a adrenalina<sup>15</sup>.

A cafeína aumenta o metabolismo energético em todas as partes do cérebro, mas diminui algumas vezes o fluxo cerebral induzindo uma hipoperfusão relativa do cérebro. Além disso, a droga ativa a noradrenalina aparentemente afeta a

liberação da dopamina. Muitos dos efeitos de alerta da cafeína podem estar relacionados à ação das metilxantinas sobre a serotonina<sup>23</sup>. A Tabela 1 apresenta uma comparação entre os efeitos antagônicos da cafeína e adenosina.

Ratliff-Crain e Kane<sup>24</sup> avaliaram a relação entre o aumento do consumo de cafeína e situações de estresse entre consumidores. Segundo os autores, a hipótese de que estes aumentem a quantidade de cafeína consumida, em situações de estresse, devido aos seus efeitos estimulantes não foi comprovada. Embora alguns consumidores participantes do estudo afirmem que em situações como dor, tensão e depressão sintam-se mais aliviados consumindo cafeína.

Numerosos estudos investigam a ligação entre a cafeína e as doenças cardiovasculares, esta relação ainda é incerta<sup>3</sup>.

O Scientific Committee on Food (SCF)<sup>19</sup> na Europa considera que há um aumento no risco de doenças cardiovasculares por efeito da cafeína sozinha ou em combinação com outros constituintes, como a taurina, presente em alguns tipos de bebidas energéticas, particularmente consumidas durante ou depois do exercício intenso. Os estudos com humanos incluíram indivíduos normais descansados, indivíduos submetidos a exercícios intensos e indivíduos com predisposições a arritmias cardíacas.

Os efeitos relacionados ao sistema cardiovascular variam desde aumentos moderados na velocidade dos batimentos cardíacos até arritmias cardíacas sérias<sup>3,12</sup>. Em alguns casos pode haver sensação de palpitação produzida pela ocorrência de extra-sístoles<sup>15</sup>.

O aumento da pressão sanguínea é um conhecido fator de risco para doenças cardiovasculares e derrames, e os indivíduos com pressão alta são geralmente aconselhados a reduzir o consumo de cafeína<sup>3</sup>. Tem-se sugerido que o consumo de cafeína pode aumentar os riscos relacionados à hipertensão. Noordzid et al.<sup>25</sup> afirmam que o consumo regular de cafeína aumenta a pressão arterial, mas quando ingerida através do café, o efeito sobre a pressão arterial é pequeno. O estudo não se refere ao consumo de bebidas energéticas.

O uso regular de bebidas contendo cafeína, por um período curto de dois a quatro dias, já muda a resposta do organismo aos seus efeitos. Desenvolve-se uma tolerância, e o uso prolongado não causa mais qualquer tipo de alteração na

pressão sanguínea, frequência cardíaca, níveis de renina, adrenalina ou fluxo de sangue nos tecidos<sup>26</sup>.

A cafeína possui dois efeitos importantes no sistema respiratório. Ela estimula os neurônios do centro respiratório do cérebro proporcionando um aumento discreto da frequência e a intensidade da respiração, juntamente com um efeito local nos brônquios, produzindo um satisfatório efeito broncodilatador<sup>15</sup>. Essas propriedades evidenciam a utilidade do consumo regular de bebidas que contêm cafeína, por pacientes asmáticos<sup>26</sup>.

Recentemente, observou-se a crescente ingestão de bebidas alcoólicas, principalmente destiladas, com bebidas energéticas. Estas bebidas vêm sendo utilizadas para potencializar os efeitos das bebidas alcoólicas, devido possivelmente a uma redução dos efeitos depressores do álcool pela ação estimulante da cafeína no córtex cerebral<sup>27</sup>. Segundo Ferreira et al<sup>28</sup> a administração de doses equivalentes ao consumo de três latas de 250 mL de bebida energética por um indivíduo de 70 kg (aproximadamente 10,71 mL de bebida energética por kg de peso corpóreo), apresentou ação antagônica aos efeitos depressores do álcool na atividade locomotora de ratos. Segundo Nehlig et al<sup>23</sup> as metilxantinas como a cafeína induzem aumentos na dose-resposta da atividade locomotora em animais.

Assumido que as bebidas energéticas podem realçar os efeitos estimulantes do álcool ou atuar como antagônico nos efeitos depressores é necessário determinar quais os ingredientes ou compostos, bem como as doses responsáveis por estes efeitos. Embora haja indicação que estes possam ser devidos à taurina e/ou cafeína<sup>28</sup>.

Com relação aos efeitos de alerta da cafeína, Reyner e Horne<sup>29</sup> sugerem que o consumo de 250 mL de bebida energética é benéfico na redução do sono, em estudos avaliando jovens motoristas. As amostras controle utilizadas para o estudo não continham cafeína, taurina ou glucoronolactona, indicando que o efeito de alerta é promovido por estes componentes. Os autores ainda sugerem que a quantidade proposta para consumo, que contém 80 mg de cafeína combinada com taurina e glucoronolactona, é mais efetiva do que a utilização do café, que contém somente cafeína, em quantidade de 200 mg. Segundo Gyllenhaal et al.<sup>30</sup> estudos sobre a administração da

**Tabela 1.** Comparação entre os efeitos da cafeína e adenosina sobre o organismo humano.

Local de ação	Cafeína	Adenosina
Sistema Nervoso Central	Estimulação	Sedação
Sistema cardiovascular	Aumento da frequência cardíaca e da pressão sanguínea	Diminuição da frequência cardíaca e da pressão
Metabolismo	Aumento da lipólise no tecido adiposo	Diminuição da lipólise
Sináptico	Aumento da liberação de catecolaminas	Diminuição da liberação de catecolaminas

Fonte: BORSTEL<sup>18</sup>

cafeína têm demonstrado que ela afeta a quantidade e a qualidade do sono.

Smit e Rogers<sup>11</sup> encontraram efeitos significativos das bebidas energéticas sobre o humor. Estes efeitos foram relacionados com os termos estado de alerta, revitalizante, maior atenção e melhoria da energia mental, e estavam relacionados com a cafeína.

### 2.1.2. Mecanismo de Toxicidade

A cafeína é uma substância farmacologicamente ativa e seu consumo é difundido em todo o mundo. Os efeitos, a curto e a longo prazo, da exposição da cafeína têm sido estudados em detalhes. Contudo, mesmo com extensivas pesquisas, os efeitos e conseqüências para a saúde ainda é assunto de interesse<sup>1</sup>.

A cafeína figura na lista GRAS (substâncias geralmente consideradas como seguras), é utilizada com freqüência em bebidas refrescantes e em fármacos e também é considerada como estimulante em doses baixas. O consumo de uma xícara de café, em que se supõe a ingestão de 1-2 mg/kg de peso corpóreo, dá uma concentração plasmática máxima de 5 - 10 µM. Um consumo excessivo (concentração plasmática >50 µM) produz sintomas de cafeinismo (ansiedade, agitação, dificuldades de conciliar o sono, diarreia, tensão muscular, palpitações cardíacas). A dose letal (DL<sub>50</sub>) é de 150 - 200 mg/kg de peso corpóreo (concentração no plasma sanguíneo de aproximadamente 750 µM) que equivale ao consumo de uma só vez de 75 xícaras de café forte<sup>17</sup>.

Não é aconselhável um consumo elevado de cafeína durante a gravidez. Pode-se consumir quantidades moderadas de cafeína sem problemas quando é parte de uma dieta saudável e equilibrada<sup>22</sup>. O SCF, até o ano de 1999, não verificou nenhum efeito teratogênico em humanos, nem em suas nas funções reprodutivas, e nenhuma associação entre o consumo de cafeína e adversidades durante a gravidez<sup>19</sup>.

Por outro lado, Cristian e Brent<sup>31</sup> descrevem estudos epidemiológicos onde o consumo de cafeína por mulheres grávidas está relacionado com a má formação congênita, retardo no crescimento fetal e abortos espontâneos. Contudo os autores reconhecem que avaliar os riscos do consumo de cafeína somente através de estudos epidemiológicos seja difícil devido à concentração de cafeína contida em alimentos e bebidas variar consideravelmente, interferindo nos resultados obtidos em estudos com humanos.

Santa-María et al.<sup>32</sup> estudaram a toxicidade *in vitro* de diferentes marcas de bebidas energéticas. Os resultados demonstraram que, nas condições do teste, as bebidas não apresentam efeitos tóxicos. No entanto os autores afirmam que o consumo destes produtos por períodos prolongados, em altas doses ou em combinação com bebidas alcoólicas pode ser perigoso para saúde de alguns consumidores.

Há poucos casos de intoxicação retratados pela cafeína. As principais manifestações ocorrem no sistema nervoso central

e cardiovascular. Insônia, agitação e hiperexcitabilidade são manifestações iniciais<sup>26</sup>.

### 2.1.3. Uso como agente de sabor

Segundo Lindsay<sup>33</sup>, a sensação amarga pode ser desejável no sabor dos alimentos. Em algumas bebidas não alcoólicas, esta sensação é um atributo importante do sabor em algumas bebidas consumidas em grandes quantidades, como café e chás. Em bebidas tipo *soft drink* a cafeína é adicionada como agente modificador de sabor<sup>16</sup>.

A cafeína é usada em concentrações de até 200 ppm nas bebidas de cola e grande parte da cafeína empregada para este fim, se obtêm por extração com solventes das sementes de café verde que são utilizados para o preparo de café descafeinado<sup>33</sup>.

### 2.1.4. Ação da cafeína no desempenho de atletas

Há pouca informação sobre os efeitos da cafeína relacionados à força<sup>34</sup>, mas por ser a cafeína um estimulante do sistema nervoso central, apesar de efeito temporário, faz o atleta se sentir mais disposto<sup>5</sup>. A cafeína promove uma melhora na performance cognitiva e no alerta. Tem sido associada com a melhora na performance durante os exercícios de alta intensidade<sup>35</sup>.

A cafeína contribui para o desempenho nos exercícios ou provas de resistência, aparentemente devido à sua capacidade de aumentar a mobilização de ácidos graxos, conservando as reservas de glicogênio<sup>34,36</sup>. A cafeína pode agir diretamente sobre a contratibilidade muscular, possivelmente por facilitar o transporte de cálcio<sup>36</sup>. Seu efeito estaria na capacidade de retardar a fadiga, devido à sua influência sobre a sensibilidade das miofibrilas ao íon cálcio<sup>26</sup>. Pode reduzir também a fadiga, através da redução do acúmulo dos íons potássio<sup>36</sup>. Pesquisas não mostram, entretanto, qualquer efeito da cafeína sobre a força muscular máxima ou sobre as contrações musculares voluntárias<sup>26</sup>.

O Comitê Olímpico Internacional (COI) proíbe altas doses de cafeína no organismo. Atletas olímpicos com mais de 12 mg de cafeína por mililitro de urina podem ser desqualificados da competição<sup>26</sup>. A ingestão de cafeína presente no café não é expressiva, quando comparada com o doping com cafeína pura<sup>34</sup>.

O efeito diurético da cafeína pode ser negativo para atletas com excessiva necessidade de água, ou para aqueles que estão desenvolvendo eventos de longa distância que não queiram urinar durante a prova<sup>36</sup>.

Há algumas evidências, de que os efeitos na melhora da performance pela ingestão de cafeína ocorrem em níveis modestos de ingestão (1 - 3 mg/kg de peso corpóreo ou aproximadamente 70 - 210 mg de cafeína), quando a cafeína é tomada antes e/ou durante o exercício físico<sup>13</sup>.

## 2.2. Taurina

Alguns ingredientes nas bebidas energéticas incluem aminoácidos individuais tais como glutamina, arginina, taurina,

e/ou aminoácidos de cadeia ramificada, por exemplo leucina, isoleucina e valina<sup>5</sup>.

A taurina, o ácido 2-amino-etano-sulfônico, é um beta-aminoácido sulfurado não proteínogênico. É um dos aminoácidos mais abundantes no corpo humano. O corpo o sintetiza por várias rotas de oxidação da cisteína. Embora a taurina seja sintetizada principalmente no fígado e no cérebro, foram encontrados altos níveis de taurina em tecidos do coração, retina, no músculo esquelético e no sistema nervoso central<sup>37</sup>.

### 2.2.1. Ações sobre o organismo

Há evidências de que a taurina serve como neurotransmissor (um mensageiro químico para o sistema nervoso), um regulador de sal e do equilíbrio de água dentro das células e um estabilizador das membranas celulares. A taurina participa na desintoxicação de substâncias químicas estranhas e também está envolvida na produção e ação da bilis<sup>37</sup>. Contudo, o papel da taurina nestes processos não é claramente entendido e a influência de altas doses de taurina nestes processos é incerta<sup>19</sup>.

Certas enfermidades podem estar relacionadas com deficiências, ou necessidade de aumento da ingestão deste aminoácido. Tem-se demonstrado que a taurina é utilizada no tratamento de várias enfermidades comuns, portanto seu potencial terapêutico merece um estudo mais detalhado<sup>17</sup>.

Com relação à enfermidade cardíaca, podemos dizer que a taurina compreende mais de 50% dos aminoácidos livres no coração. A taurina melhora a força do músculo do coração, prevenindo o desenvolvimento de uma cardiomiopatia (uma enfermidade do músculo cardíaco) em animais<sup>37</sup>. Os baixos níveis de taurina estão relacionados com a hipertensão. Alguns estudos têm mostrado que consumindo suplementos de taurina se consegue baixar a pressão sanguínea. Os estudos com taurina demonstraram uma melhora na contractilidade do coração nos pacientes cardíacos podendo, ser utilizada como antioxidante<sup>5</sup>.

Encontram-se altas concentrações de taurina na retina do olho, onde parece que funciona como um *buffer celular* – protegendo as células da retina dos efeitos danosos da luz ultravioleta e das substâncias tóxicas<sup>37</sup>. A taurina também é necessária para as reações químicas produzidas na visão normal, e sua deficiência está associada à degeneração da retina, além de protegê-la, ajuda a prevenir as cataratas relacionadas com a idade.

Outra função deste aminoácido é manter a correta composição da bílis e manter a solubilidade do colesterol. A taurina se liga a certos sais biliares, e por isso melhora sua habilidade de digerir as gorduras. Os estudos com animais têm demonstrado que a complementação com taurina pode inibir a formação de cálculos biliares<sup>37</sup>. Segundo Kingstone et al<sup>38</sup> a taurina também possui propriedades antioxidantes.

A ingestão média diária de taurina entre consumidores de bebidas energéticas é de aproximadamente 0,4 g aumentando para cerca de 1,0g entre altos consumidores<sup>3</sup>. A concentração de taurina contida nas bebidas energéticas é mais alta que a quantidade encontrada em outros produtos<sup>19</sup>.

No Brasil, a Resolução RDC n° 273 de 22-09-2005, do Ministério da Saúde, estabelece o limite máximo de taurina como ingrediente, para o composto líquido pronto para consumo em 400 mg/100 mL<sup>8</sup>.

Um outro aspecto importante com relação à taurina presente nas bebidas energéticas é a sua ingestão juntamente com bebidas alcoólicas. Sugere-se que as bebidas energéticas poderiam prolongar os efeitos excitatórios do álcool, possivelmente por uma modulação da neurotransmissão gabaérgica (relacionada ao ácido gama-amino-butírico)<sup>27</sup>. O ácido gama-amino-butírico (GABA) é um neurotransmissor inibitório no Sistema Nervoso Central de mamíferos. Sabe-se que o efeito depressor do álcool está associado a aumento da neurotransmissão mediada pelo GABA, inibindo o SNC. Desta forma, diminuindo a atividade gabaérgica, a taurina reduziria o efeito depressor do álcool<sup>39</sup>. As interações da taurina com o álcool são particularmente pertinentes, visto que há evidências que as bebidas energéticas são regularmente consumidas com

**Tabela 2.** Resumo das funções fisiológicas da taurina no organismo humano.

Sistema	Ação
<b>Cardiovascular</b>	Modulação da ação do canal de cálcio Retarda a cardiomiopatia Propriedades anti-arritmia Ação hipotensiva
<b>Sistema Nervoso Central</b>	Regulação da resposta cardiorespiratória Alteração na duração do sono Propriedades anti-convulsivas Modulador da excitabilidade neural Manutenção da função cerebral Termoregulação Ação anti-tremores
<b>Retina</b>	Manutenção da estrutura e das funções
<b>Fígado</b>	Síntese dos sais biliares
<b>Sistema reprodutivo</b>	Motilidade do esperma
<b>Músculos</b>	Estabilidade das membranas
<b>Outros</b>	Modulador dos neurotransmissores e hormônios Osmoregulação Estimulação da glicólise e glicogênese Efeitos antioxidantes Atenuação da hipercolesterolemia Proliferação e viabilidade das células

Fonte: adaptado de SAFEFOOD<sup>3</sup>

álcool<sup>3</sup>. A Tabela 2 apresenta um quadro com uma síntese das ações da taurina sobre o organismo.

### 2.2.2. Mecanismo de toxicidade

Pode-se dizer no que se refere a toxicidade, que a taurina é geralmente bem tolerada. Não se têm relatados sérios efeitos colaterais nas doses terapêuticas usuais de 1 – 3 g ao dia. Apesar dos muitos estudos clínicos, a verdade é que a dose ótima de taurina é desconhecida. Os médicos orientados sobre nutrição geralmente prescrevem de 500 a 1000 mg, 2 a 3 vezes ao dia, para adultos<sup>37</sup>.

Há poucos estudos sobre a interação de taurina com outros ingredientes contidos nas bebidas energéticas (como a cafeína e glucoronolactona) ou outras substâncias como o álcool ou drogas<sup>3</sup>.

### 2.3. Guaraná

O guaraná (*Paullinia cupana*) é uma planta nativa da América do Sul, encontrada principalmente na Venezuela e Brasil. Seu componente principal é a guaranina, uma substância quimicamente idêntica à cafeína<sup>3,40</sup>. O guaraná é adicionado às bebidas energéticas em combinação com a cafeína ou sozinho<sup>1</sup>.

O Brasil é praticamente o único país a produzir guaraná em escala comercial em cultivos racionais e sistemáticos. Os estados produtores são Acre, Amazonas, Rondônia, Pará, Bahia e Mato Grosso<sup>41,42,43</sup>.

A semente de guaraná contém entre 5 e 6% de cafeína, apresentando teores bem mais elevados que os do cacau e do café e ligeiramente superiores aos do chá. Estas sementes contêm também fibra vegetal, amido, água, resina, pectinas e ácido tânico, que confere a adstringência característica do guaraná<sup>40,44</sup>.

No Brasil, o Ministério da Saúde, classifica o extrato de guaraná utilizado no composto Líquido pronto para consumo como o extrato obtido da fruta das plantas *Paullinia sorbilis* ou *Paullinia cupana* que contém de 3 a 5 % de cafeína, assim como 1% de teobromina<sup>9</sup>. O controle de qualidade do guaraná é realizado através de análises da quantidade de cafeína presente<sup>45</sup>.

#### 2.3.1. Ações sobre o organismo

O efeito estimulante do guaraná é similar ao da cafeína, sendo que 1 g de guaraná contém o equivalente a 40 mg de cafeína<sup>1</sup>. A fonte natural precisa da atividade estimulante do guaraná não é bem conhecida<sup>3</sup>. Contudo, tem sido relatado que o guaraná exerce um efeito mais prolongado que o equivalente médio de cafeína<sup>1</sup>. O teor de gordura contida na semente de guaraná e substâncias como o ácido tânico fazem com que a liberação da guaranina seja mais lenta do que a da cafeína<sup>40</sup>, prolongando seus efeitos no organismo.

Há pouca informação na literatura que relata os efeitos do guaraná, embora seja consenso que produtos com altas quantidades de guaraná apresentem efeitos fisiológicos similares à cafeína<sup>3</sup>.

### 2.4. Glucoronolactona

A glucoronolactona ocorre naturalmente como um metabólito formado a partir da glicose no fígado, sendo também encontrada em um pequeno número de produtos, como o vinho, que é uma boa fonte (acima de 20 mg/L). A glucoronolactona também pode ser encontrada em vegetais que contêm gomas. A goma xantana é um exemplo de goma formada por unidades de manose e ácido glucorônico<sup>1</sup>.

Nem todas as bebidas energéticas contêm glucoronolactona, porém a concentração em algumas delas pode variar de 250 a 2500 mg/L<sup>1</sup>.

No Brasil, a legislação referente às bebidas energéticas estabelece o limite máximo de glucoronolactona em 250 mg/100 mL<sup>8</sup>.

#### 2.4.1. Ações sobre o organismo

No pH fisiológico, a glucoronolactona entra em equilíbrio com o ácido glucorônico, seu precursor imediato. O ácido glucorônico é um importante constituinte das fibras e tecidos conjuntivos de animais<sup>19</sup>.

A glucoronolactona administrada por via oral em humanos é rapidamente absorvida, metabolizada e excretada como ácido glucarico, xilitol e L – xilulose<sup>19</sup>.

Alguns animais como os roedores, utilizados em estudos, podem sintetizar vitamina C endogenamente a partir do ácido glucorônico. Esta via acontece convertendo ácido gulônico ou glucoronolactona para gulonolactona e daí para ácido ascórbico. Contudo, primatas, incluindo o homem, não possuem esta rota metabólica. Por esta razão os roedores podem ser um modelo inapropriado para medir os efeitos da glucoronolactona<sup>19</sup>.

#### 2.4.2. Mecanismo de Toxicidade

De acordo com Finnegan<sup>1</sup>, o metabolismo da glucoronolactona em humanos é desconhecido e não há avaliações que forneçam informações sobre as interações entre glucoronolactona e álcool, por exemplo.

De acordo com o Scientific Committee on Food (SCF)<sup>19</sup> é necessário que se conheça a influência de altas doses de glucoronolactona, pois as rotas metabólicas envolvendo glicose podem ser um relevante fator de risco em relação a crianças e diabéticos.

### 3. Conclusão

As bebidas energéticas possuem um grande potencial de mercado, dado a grande variedade de componentes em sua formulação, cada um contendo suas características de funcionalidade. Por serem produtos ainda relativamente novos no mercado, existem muitas controvérsias a respeito das concentrações adequadas de uso e a respeito dos reais efeitos destes ingredientes no organismo.

São necessárias também mais pesquisas sobre as interações destes componentes com outras substâncias como o álcool, visto que o público alvo destas bebidas são os jovens,

que se utilizam muitas vezes da combinação álcool/bebida estimulante.

## REFERÊNCIAS

1. Finnegan D. The health effects of stimulant drinks. *Nutrition Bulletin*. 2003; 28:147-55.
2. Drogas y Temas Asociados. 2003. [acesso em 2003 nov 13]. Disponível em URL: <http://www.usb-med.edu.co/unidades/ciaf/temas.htm>.
3. Safefood - The Food Safety Promotion Board. A review of the health effects of stimulant drinks - Final report. 2002. [acesso 2003 nov 16]. Disponível em URL: [http://www.safefoodonline.com/pdf/health\\_effects\\_of\\_stimulant\\_drinks.pdf](http://www.safefoodonline.com/pdf/health_effects_of_stimulant_drinks.pdf).
4. Hilliam M. The Market for Funcional Foods. *Int Dairy Journal*. 1998; 8:349-53.
5. Bonce L. Energy Drinks: ¿ayudan, perjudican ó hiperenergizan? [acesso 2003 nov 25]. Disponível em URL: <http://www.nutrinfo.com.ar>.
6. Healey ID. Sport drinks and functional ingredients. *Drink Technology & Marketing* 2004; 8(1):14-5.
7. Amendola C, Iannilli I, Restuccia D, Santini I, Vinci G. Multivariate statistical analysis comparing sport and energy drinks. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2004; 5: 263-7.
8. Brasil. Resolução RDC nº 273, de 22 de set. de 2005 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 22 set. 2005. Seção 1, nº 184, p. 375-6.*
9. Brasil. Portaria nº 868, de 3 de nov. de 1998 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 05 nov. 1998.*
10. Brasil. Portaria nº 222, de 24 de mar. de 1998 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 22 mar. 1998.*
11. Smit HJ, Rogers PJ. Effects of 'energy' drinks on mood and mental performance: critical methodology. *Food Quality and Preference*. 2002; 13:317-26.
12. Carrilo JA, Benitez J. Clinically significant pharmacokinetic interactions between dietary caffeine and medications. *Clin Pharmacokinetic*. 2000; 39(2):127-53.
13. Australian Institute of Sport - AIS. Caffeine and Sport Performance. 2001. [acesso 13 nov 2003]. Disponível em URL: <http://www.ausport.gov.au/ais/nutrition/suppcaffws.htm>.
14. Roberts HR, Barone JJ. Biological Effects of Caffeine - History and Use. *Food Technology*. 1983; 37(9):32-9.
15. Ballone JG. Psiqweb - Cafeína. 2003. [acesso em 13 nov 2003]. Disponível em URL: <http://www.psiqweb.med.br>.
16. Araújo MCP, Mello JSR, Oiano-Neto J, Castro IM. Quantificação de cafeína em bebidas comerciais tipo energético (energy drink) via metodologia de CLAE aprovada em ensaio interlaboratorial. In: 5º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, Campinas, São Paulo, 2003, CD-ROM.
17. Wong DWS. Química de los alimentos - mecanismos y teoría. Zaragoza, España: Editorial Acribia; 1995.
18. Borstel RWV. Biological Effects of Caffeine - Metabolism. *Food Technology* 1983; 37(9):40-3.
19. Scientific Committee on Food - SCF. Opinion on caffeine, taurine and D-glucorono- $\delta$ -lactona as constituents of so-called 'energy drinks'. 1999. [acesso em 16 nov 2003]. Disponível em URL: [http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out22\\_en.html](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out22_en.html).
20. Institute of Food Technologist. Evaluation of Caffeine Safety - A Scientific Status Summary by the Institute of Food Technologist's Expert Panel on Food Safety & Nutrition; 1987. 1-6.
21. Arnaud MJ, Murray C, Youssif A, Milon H, Devoe LD. Caffeine consumption and metabolism in pregnant women during the third-trimester pregnancy. Switzerland: Nestlé Research Center; 1993.
22. Cafeína y Salud. [acesso em: 20 out 2003]. Disponível em URL: <http://www.caffeineandhealth.net/AboutUs1.htm>.
23. Nehlig A, Daval JL, Debry G. Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Res Rev*. 1992; 17(2):139-70.
24. Ratliff-Crain J, Kane J. Predictors for altering caffeine consumption during stress. *Addictive Behaviors*. 1995; 20(4):509-16.
25. Noordzij M, Uiterwaal CS, Arends LR, Kok FJ, Grobbee DE, Geleijnse JM. Blood pressure response to chronic intake of coffee and caffeine: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Hypertens*. 2005; 23(5):921-8.
26. Fitfazio. Cafeína - saúde e performance. [acesso em: 13 nov 2003]. Disponível em URL: <http://www.fitfazio.hpg.ig.com.br/cafeina.html>.
27. Ferreira SE, Mello MT, Formigoni MLOS. O efeito das bebidas alcoólicas pode ser afetado pela combinação com bebidas energéticas? Um estudo com usuários. *Rev Assoc Med Brás*. 2004; 60(1):48-51.
28. Ferreira SE, Quadros IMH, Trindade AA, Takahashi S, Koyama RG, Sousa-Formigoni, MLO. Can energy drinks reduce the depressor effect of ethanol? An experimental study in mice. *Physiology & Behavior*. 2004; 82:841-7.
29. Reyner LA, Horne JA. Efficacy of a 'functional energy drink' in counteracting driver sleepiness. *Physiology Behavior*. 2002; 75:331-5.
30. Gyllenhaal C, Merritt SL, Peterson SD, Block KI, Gochenour T. Efficacy and safety of herbal stimulants and sedatives in sleep disorders. *Sleep Medicine Reviews*. 2000; 4(3):229-51.
31. Cristian MS, Brent RL. Teratogen update: evaluation of reproductive and developmental risks of caffeine. *Teratology*. 2001; 64(1):51-8.
32. Santa-Maria A, Días MM, López A, Miguel MT, Fernández MJ, Ortiz AI. *In vitro* Toxicity of Stimulant soft drinks. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2002; 53:70-2.
33. Lindsay, RC. Flavor. In: Fennema, OR. Química de los alimentos. Zaragoza, España: Editorial Acribia; 1993. p. 666-7.
34. Gahan TE. Caffeine and exercise: metabolism, endurance and performance. *Sports Med*. 2001; 31(11):785-807.
35. Rogers NL, Dinges DF. Caffeine: implications for alertness in athletes. *Clin Sports Méd*. 2005; 24(2):1-13.
36. Berning JR. Nutrição para treinamento e desempenho atléticos. In: Mahan LK, Scott-Stump S. Krause: Alimentos, nutrição e dietoterapia. 10ª ed. São Paulo: Roca; 2002. p. 517-38.
37. Del Río HS. La taurina: esse aminoácido desconocido. [acesso em 22 ago 2003]. Disponível em URL: <http://www.hector.solorzano.com/articulos/taurina.html>.
38. Kingston R, Kearns S, Kelly C, Murray P. Effects of systemic and regional taurine on skeletal muscle function following ischaemia-reperfusion injury. *J Orthopaedic Res*. 2005; 23:310-4.
39. Kuriyama K, Hashimoto T. Interrelationship between taurine and GABA. *Adv Exp Med Biol*. 1998; 44(2):329-37.
40. Seis bebidas "energéticas", al laboratorio: mais que energéticas, son estimulantes. [acesso em 12 nov 2004]. Disponível em URL: <http://revista.consumer.es/web/es/20020601/actualidad/analisis1/?print=true>.
41. Dias RA. Perfil de Oportunidade de Investimento na Industrialização de Guaraná. Amazonas: Centro de assistência Gerencial à Pequena e Média Empresa do Estado do Amazonas - CEAG-AM, Série Perfil Industrial, 1979.
42. Costa RSC. Testes de Clones de Guaranazeiro em Rondônia. In: Simpósio de Inovações Tecnológicas e Gerenciais - FRUTAL 2001. Fortaleza: FRUTAL; 2001 (CD-ROM)
43. Tfouni SAV, Toledo MCF, Camargo MCR, Vitorino SHP. Determinação de cafeína em guaraná em pó (*Paullinia cupana*). In: 5º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos. Campinas, 2003. CD-ROM.
44. Angelucci E, Tocchini RP, Lazarine VB. Caracterização Química da Semente de Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* Ducke). *Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos* 1978; 56: 183-92.
45. Magna A, Salomão AA, Vila MMDC, Tubino M. Comparative Study of two Spectrophotometric Reagents for Catecol Analysis in Guaraná Seeds Powder. *J Braz Chem Soc*. 2003; 14(1):129-32.

# Influência da lecitina sobre os níveis de retinol do leite materno

## Influence of lecithin on retinol concentration in human milk

RIALA6/1069

Fernanda B. SOARES<sup>1</sup>, Karla Danielly da S. RIBEIRO<sup>2</sup>, Roberto DIMENSTEIN<sup>3\*</sup>

\* Endereço para correspondência: Avenida Praia de Genipabu 2100, apto. 1402, Noronha, Ponta Negra, CEP 59094-010, Natal, RN, Brasil. Telefone: 0xx84-3219-3559; e-mail: rdimen@uol.com.br.

<sup>1</sup> Curso de Nutrição da Universidade federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brasil. Bolsista PIBIC/CNPq. E-mail: fernandasoaresnutri@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Curso de Mestrado em Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Centro de Biociências, Departamento de Bioquímica, Natal (RN), Brasil. E-mail: karladaniellysr@yahoo.com.br

<sup>3</sup> Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal (RN), Brasil. E-mail: robertod@ufrnet.br

Recebido: 23/03/2006 – Aceito para publicação: 31/07/2006

### RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da adição de lecitina sobre a concentração e conseqüente disponibilidade de retinol do leite humano processado. Para tanto, coletaram-se 400mL de leite materno do banco de leite humano da Maternidade Escola Januário Cicco, Brasil. Foram retiradas 10 alíquotas de 1 mL (leite sem lecitina), e em seguida foram adicionados 2g de lecitina. Posteriormente, mais 10 alíquotas foram removidas (leite com lecitina). O leite, após saponificação, foi extraído com hexano e a determinação do retinol foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência. Para análise estatística utilizou-se o teste *t* de *Student*. As concentrações médias de retinol nas amostras de leite sem e com lecitina foram respectivamente de  $28,0 \pm 5,1 \mu\text{g}/100\text{mL}$  e  $35,3 \pm 5,0 \mu\text{g}/100\text{mL}$ , sendo estatisticamente diferentes ( $p < 0,001$ ). Os resultados sugerem que a adição de lecitina ao leite proporciona uma maior oferta de vitamina A. Assim, esta informação é válida para os bancos de leite, pois garantiria o fornecimento de um leite com maior valor nutricional, e para estudos que utilizam o leite como indicador do estado nutricional de lipídios ou vitaminas lipossolúveis.

**Palavras-Chave.** lecitina, vitamina A, leite materno

### ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the effect of lecithin addition on retinol concentration, and its consequent availability in processed human milk. For this purpose, 400mL of human milk were collected at the Januário Cicco Maternity Hospital. Ten samples of 1 mL of human milk (milk without lecithin) were separated, and 2g of lecithin were added into each aliquot. After saponification, the milk was extracted with hexane, and retinol amount was determined by means of High Performance Liquid Chromatography. Statistical analysis was conducted using Student's t-Test. The average concentrations of retinol in milk samples without and with lecithin were  $28.0 \pm 5.1 \mu\text{g}/100\text{mL}$  and  $35.3 \pm 5.0 \mu\text{g}/100\text{mL}$ , respectively, being the difference statistically significant ( $p < 0.001$ ). The observed findings suggest that the addition of lecithin into milk results in high vitamin A provision. Therefore, reporting these data is of great value as for the Milk Banks, as it would guarantee the provision of human milk with high nutritional value, and for other studies that make use of milk as an indicator for monitoring nutritional state of lipids or liposoluble vitamins.

**Key Words.** lecithin, vitamin A, human milk

## INTRODUÇÃO

O leite humano é a única fonte de vitamina A para o lactente totalmente alimentado ao seio e a capacidade da criança adquirir seu requerimento depende da concentração e do volume consumido<sup>1</sup>. Além disso, é fornecedor de energia e nutrientes em quantidades apropriadas para uma boa nutrição nos primeiros seis meses de vida<sup>2</sup>.

Algumas crianças que por algum motivo não puderam ser amamentadas pelas suas mães, como as de nascimento prematuro, de baixo peso e com doenças infecciosas, utilizam o leite proveniente do Banco de Leite Humano (BLH) para garantir o aporte de nutrientes.

Entretanto, durante o procedimento de coleta e posterior processamento (congelamento, pasteurização e re-congelamento) podem ocorrer perdas que comprometem o valor nutricional do leite, já que alguns nutrientes são passíveis de sofrer modificações na presença de calor, oxigênio e luz. Como exemplo, o retinol que é uma vitamina fotossensível<sup>3</sup>.

Ribeiro et al.<sup>4</sup> sugerem a utilização de frascos opacos para coleta de leite materno como medida para minimizar as perdas do retinol durante o processamento do leite obtido em BLH. Porém, essa medida não previne a redução no conteúdo de retinol, já que este está presente nos glóbulos de gordura, que por sua vez aderem-se aos recipientes de coleta e armazenamento do leite materno, podendo levar à diminuição da disponibilidade da vitamina A em solução<sup>5</sup>.

Para tornar os glóbulos de gordura estáveis em suspensão, seria necessária a adição de um agente emulsificante. Um dos agentes bastante utilizado na indústria de alimentos é a lecitina (fosfatidilcolina), que tem por objetivos favorecer e assegurar as características físicas das emulsões e das suspensões, sendo bastante utilizada em fórmulas infantis<sup>6</sup>. Além disso, ela é fonte de colina, um nutriente importante no desenvolvimento cerebral e mental do feto e da criança<sup>7,8</sup>.

Não existe até o momento um estudo que avalie os benefícios da adição de um agente emulsificador ao leite materno sobre a concentração de nutrientes lipossolúveis e consequentemente sobre sua disponibilidade. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da adição de lecitina sobre o nível de retinol do leite processado em BLH.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido entre os meses de dezembro/2005 e janeiro/2006. O leite materno foi obtido do Banco de Leite Humano (BLH) da Maternidade Escola Januário Cicco (MEJC), Natal/RN, Brasil.

Um pool (400mL) de leite materno foi agitado, em agitador magnético, e foram retiradas dez alíquotas de 1mL de leite (amostras sem lecitina). Posteriormente, foi acrescido ao pool de leite 2g de lecitina em pó do tipo Centrox<sup>TM</sup>F, segundo recomendações do fabricante *The Solae Company* (0,5g/

100mL). A lecitina foi submetida à análise para presença de retinol, sendo comprovada a ausência de qualquer traço desta vitamina. O leite foi mantido sob agitação para obter-se a dissolução da lecitina. Foram coletadas mais 10 amostras, cada qual contendo 1 mL de leite (amostras com lecitina).

Todas as alíquotas foram extraídas segundo Giuliano et al.<sup>9</sup>, como descrito a seguir: em 1000µL de leite foram adicionados 2000µL de etanol absoluto e 1000µL de hidróxido de potássio (50%). A mistura foi submetida à agitação e levada ao Banho-Maria, na temperatura de 45°C durante duas horas. Em seguida, foram adicionados 2000µL de hexano e após agitação, o tubo foi centrifugado por dez minutos a 4.000 rpm. A camada hexânica foi removida e a operação repetida mais duas vezes, sendo as fases hexânicas reunidas em outro recipiente. O extrato hexânico foi evaporado sob atmosfera de nitrogênio, em banho-maria a 37°C e posteriormente ressuspenso em 1,0 ml de metanol (Merck) em grau de pureza para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A concentração de retinol das amostras foi determinada por CLAE em cromatógrafo LC-10 AD Shimadzu, acoplado a um detector SPD-10 A Shimadzu UV-VIS e integrador Chromatopac C-R6A Shimadzu, com uma coluna LC Shim-pack CLC-ODS (M) de 4,6 mm x 25 cm. Foram injetados 20µL da amostra e o cromatograma evoluiu nas seguintes condições: fase móvel metanol 100% e fluxo 1,0 mL/min.

A identificação e a quantificação do retinol nas amostras foram estabelecidas por comparação com os tempos de retenção e as áreas dos respectivos padrões de all-trans retinol – SIGMA (Figura 1). As concentrações dos padrões foram confirmadas pelo coeficiente de extinção específico ( $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 1.850$ ) em etanol absoluto (Vetec) e comprimento de onda de 325nm<sup>10</sup>. Os valores de retinol foram expressos pela média e desvio padrão dos resultados obtidos.

A exatidão do método foi avaliada através do teste de recuperação da extração, obtendo-se 95% de recuperação do retinol acetato (padrão interno) adicionado às amostras. A precisão foi avaliada pelo teste de reprodutibilidade, em que triplicatas de uma mesma amostra de leite foram aferidas para retinol durante 3 dias seguidos. Os valores encontrados apresentaram variação inferior a 1 desvio padrão. Os limites de detecção e quantificação foram baseados na linearidade da curva do padrão, obtendo-se valores de 0,05 µg/mL e 0,1 µg/mL, respectivamente.

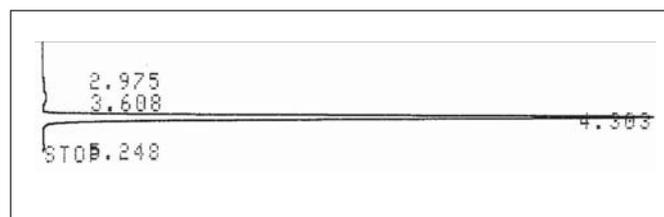


Figura 1. Cromatograma do padrão de all-trans retinol, 24ng/20µL e tempo de retenção 4,3 minutos.

Para testar as diferenças entre as médias dos dados numéricos paramétricos, foi utilizado o teste t de Student em amostras pareadas. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

Os valores de retinol das amostras com e sem lecitina encontram-se na Tabela 1. Os resultados obtidos mostraram que a diferença entre as médias foi estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ).

## DISCUSSÃO

Assim como encontrado por Ribeiro et al.<sup>4</sup>, neste estudo verificou-se uma baixa concentração de retinol, provavelmente à predominância de leite maduro na amostra analisada, leite com menor concentração de vitamina A quando comparado ao colostro, secreção da primeira semana pós-parto<sup>11</sup>.

Após o descongelamento do leite, existe uma tendência da gordura aglomerar-se e até mesmo se fixar à parede do frasco ocasionando perda no valor nutricional, durante o reenvaso do leite ou separação de alíquotas<sup>12</sup>.

O leite acrescido de lecitina apresentou uma concentração de retinol 28% maior quando comparado à amostra sem lecitina, demonstrando que a utilização do surfactante contribuiu para a manutenção dos glóbulos de gordura em uma emulsão estável. A ausência de um fator emulsificante em amostras de leite que foram armazenadas sob refrigeração ou congelamento pode resultar em grande variabilidade, afetando análises bioquímicas que tenham como objetivo quantificar lipídeos ou vitaminas lipossolúveis.

A concentração de retinol encontrada no leite com lecitina está de acordo com os dados da literatura<sup>11,13</sup> e acima do ponto de corte estabelecido para normalidade,  $30\mu\text{g}/100\text{mL}$ <sup>14</sup>. Analisando o leite sem lecitina, a média de retinol encontrada parece estar abaixo da normalidade, o que poderia caracterizar a população estudada como de risco para o desenvolvimento da hipovitaminose A, caso o retinol presente no leite fosse considerado um indicativo do estado nutricional de vitamina A.

Assim, a utilização de um surfactante natural, como a lecitina, auxiliaria na estabilidade da emulsão, reduzindo as

**Tabela 1.** Distribuição das amostras segundo a concentração de retinol no leite com lecitina e sem lecitina.

Leite humano	Média e Desvio - padrão
Amostras com Lecitina	$*35,3 \pm 5,0 \mu\text{g}/100\text{mL}$
Amostras sem Lecitina	$28,0 \pm 5,1\mu\text{g}/100\text{mL}$

\* Médias significativamente diferentes  $p < 0,001$

perdas decorrentes do processamento, permitindo a uniformização dos valores encontrados na determinação da concentração de retinol no leite. Além do mais, a lecitina é uma excelente fonte de colina<sup>4</sup> e ao ser adicionada ao leite conferiria vantagens para o desenvolvimento do bebê.

A padronização do uso de um emulsificante natural em amostras de leite materno armazenadas em BLH, bem como em metodologias que visam quantificar lipídeos ou vitaminas lipossolúveis, seria de extrema importância, principalmente quando se pretende utilizar o leite materno como indicador de estado nutricional em vitamina A.

Portanto, existe influência da lecitina adicionada ao leite materno, proporcionando um maior aproveitamento do retinol em amostras de leite, como aquelas armazenadas em BLH.

## AGRADECIMENTOS

À Maternidade Escola Januário Cicco e à *The Solae Company*, Solae do Brasil Ind. e Com. de Alimentos Ltda.

## REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Nutrient adequacy of exclusive breastfeeding for the term infant during the first six months of life. Geneva: WHO, 2002. p. 22-6.
2. Mahan LK, Escott-Stump S. Krause: Alimentos, nutrição e dietoterapia. São Paulo: Roca; 1998. p.72-82
3. Jensen RG. Miscellaneous factors affecting composition and volume of human and bovine milks. In: Jensen RG, editor. Handbook of milk composition. San Diego: Academic Press; 1995. p.237.
4. Ribeiro KD, Melo IL, Pristo AZ, Dimenstein R. Efeito do processamento do leite humano sobre os níveis de retinol. *J Pediatr*. 2005; 81:61-4.
5. Neville MC, Keller RP, Casey C, Allen JC. Calcium partitioning in human and bovine milk. *J Dairy Sci*. 1994; 77:1964-75.
6. Evangelista J. Tecnologia dos alimentos. 2ª ed. São Paulo (SP): Atheneu; 1992. p.462-3.
7. Miller DL. Health benefits of lecithin and choline. *Cereal Foods World* 2002; 47:178-84.
8. The Solae Company. [Internet site]. Ingress Communications. Available: <http://www.solae.com.br/benefitsofsoy/soylecithin.html>. Acesso em: 10 fevereiro 2006.
9. Giuliano AR, Neilson EM, Kelly BE, Canfield LM. Simultaneous quantitation and separation of carotenoids and retinol in human milk by high-performance liquid chromatography. *Methods Enzimol* 1992; 213:391-99.
10. Nierenberg RD, Namm SL. A method for determining concentrations for retinol, tocopherol, and five carotenoids in human plasma and tissue samples. *Am J Clin Nutr* 1992; 56:417-26.
11. Macias C, Schweigert FJ. Changes in the concentration of carotenoids, vitamin A, alpha-tocopherol and total lipids in human milk throughout early lactation. *Ann Nutr Metab*. 2001; 45(2):82-5.
12. Góes HC, Alexandre GT, Carmem MD, Nadia MF. Nutrient composition of banked human milk in Brazil and influence of processing on zinc distribution in milk fractions. *Nutrition*. 2002; 18:590-4.
13. Basu S, Sengupta B, Paladhi PKR. Single megadose vitamin A supplementation of Indian mothers and morbidity in breastfed young infants. *Postgrad Med J*. 2003; 79:397-402.
14. World Health Organization. Indicators for assessing vitamin A deficiency and their application in monitoring and evaluating intervention programmes. Geneva: WHO; 1996. [Internet site]. Ingress Communications. Available: [http://whqlibdoc.who.int/hq/1996/WHO\\_NUT\\_96.10.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/1996/WHO_NUT_96.10.pdf). 15 fevereiro 2005.

# Avaliação de critérios estatísticos utilizados em programas interlaboratoriais para pesquisa de chumbo em sangue

## Evaluation of statistical criteria applicable to interlaboratory comparisons for lead in blood

RIALA6/1070

Franca Durante de MAIO<sup>2</sup>, Odair ZENEBON<sup>1\*</sup>, Paulo TIGLEA<sup>1</sup>, Roberta I. S. OKURA<sup>2</sup>, Alice M. SAKUMA<sup>2</sup>

\* Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Divisão de Bromatologia e Química, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr Arnaldo 355, CEP 01246 902, São Paulo, Brasil.

<sup>2</sup> Seção de Equipamentos Especializados, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

Recebido: 16/01/2006 – Aceito para publicação: 18/07/2006

### RESUMO

A participação em Programas de comparação Interlaboratorial (PI) é uma ferramenta utilizada pelos laboratórios para garantir a confiabilidade de seus resultados analíticos. Em PIs a escolha do tratamento estatístico aplicado aos resultados pode afetar a estimativa do valor verdadeiro (valor designado) e a incerteza associada, o intervalo de aceitação e a avaliação de desempenho dos laboratórios. Empregando resultados dos laboratórios participantes do Programa de Ensaio de Proficiência para chumbo em sangue (PEP-Pb-s), coordenado pelo Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, para diferentes níveis de concentração, foram comparados sete critérios estatísticos. O valor designado foi calculado usando a mediana, ou a média após exclusão dos dispersos, empregando os critérios de Hampel, Grubbs, Dixon e Z-score. O intervalo de aceitação foi calculado pelo Z-score empregando o desvio padrão ou utilizando as equações de Horwitz ou de Horwitz modificada por Thompson. Foi também utilizado o critério atualmente empregado no Programa, que considera  $X_{\text{designado}} \pm 6$ , para concentrações [Pb-s]  $\leq 40 \mu\text{g}/100\text{mL}$  e  $X_{\text{designado}} \pm 15\% X_{\text{designado}}$  para concentrações  $> 40 \mu\text{g}/100\text{mL}$ . Verificou-se que os valores designados obtidos pelos critérios estatísticos empregados não apresentaram diferenças significantes em um nível de significância de 5%. Porém, os intervalos de aceitação obtidos mostraram-se influenciados pelos critérios estatísticos empregados.

**Palavras-Chave.** programa interlaboratorial, ensaio de proficiência, técnicas estatísticas para ensaio de proficiência, chumbo em sangue.

### ABSTRACT

The participation in Interlaboratory Comparison Programme (IP) is a tool used by laboratories to ensure reliability of analytical results. In IPs the selection of a statistical treatment applied to the results can affect the estimation of the “true” value (assigned value) and its uncertainty, the acceptance range and the performance assessment of the participants laboratories. Using the results of the participant laboratories in the Proficiency Test Programme for lead in blood, coordinated by Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, for different levels of concentration, seven statistical techniques were compared. The assigned value was calculated using the median, or the average value after the elimination of the dispersed results, employing Hampel, Grubbs, Dixon and Z-score’s criteria. The acceptance range was calculated according to Z-score, making use of the standard deviation or using Horwitz’s equation or the Horwitz’s one modified by Thompson. It was also used the current criterion applied to the Program, which considers  $X_{\text{designated}} \pm 6$ , for concentrations [Pb-s]  $\leq 40 \mu\text{g}/100\text{mL}$  and  $X_{\text{designated}} \pm 15\% X_{\text{designated}}$  for concentrations  $> 40 \mu\text{g}/100\text{mL}$ . It was verified that the assigned values obtained through the statistical techniques used did not present significant differences when the confidence level was 5%. However, the acceptance ranges obtained showed they were influenced by the statistical technique used.

**Key Words.** interlaboratorial programme, proficiency test, statistical criteria for proficiency test, lead in blood.

## INTRODUÇÃO

A avaliação externa da qualidade é uma ferramenta utilizada pelos laboratórios a fim de garantir a confiabilidade de seus resultados analíticos e demonstrar competência técnica. A técnica estatística aplicada a um PI para a determinação do valor designado (a melhor estimativa do valor verdadeiro de uma concentração) e sua incerteza associada, e do intervalo de aceitação dos resultados pode afetar a avaliação do desempenho dos laboratórios participantes. Um Programa Interlaboratorial consiste de uma série de medições de uma ou mais propriedades, em uma amostra de determinado material, realizada de forma independente por um grupo de laboratórios, e pode visar diferentes objetivos, como compatibilização de resultados, validação de métodos de análise, certificação de materiais de referência e avaliação de desempenho de laboratórios<sup>1</sup> (programas de ensaios de proficiência). A participação em PIs é um dos requisitos da norma ISO/IEC 17025<sup>2</sup> para acreditação ou habilitação de um determinado ensaio junto aos órgãos reguladores nacionais e internacionais, na área de metrologia.

A escolha do tratamento estatístico para um PI depende, em primeiro lugar, dos objetivos deste e de suas características, como o grau de dispersão dos resultados apresentados (que é função da dificuldade analítica do ensaio), da faixa de concentração do analito em estudo, entre outros fatores inerentes à realização do ensaio. Deve ainda considerar as conseqüências de uma decisão incorreta na avaliação dos laboratórios.

Para PIs, são descritas na literatura diferentes técnicas para o cálculo do valor designado e das incertezas a ele associadas, inclusive critérios para exclusão de resultados que, dentro de uma margem definida de probabilidade, possam afetar estes valores<sup>1,3,4,5</sup>. Para a determinação do valor designado, o valor de consenso dos laboratórios participantes (média - após exclusão de valores dispersos - ou mediana dos resultados) é um dos critérios mais utilizados.

Outro critério estatístico que pode ser empregado na avaliação dos resultados de um PI é a estatística robusta, válida inclusive para resultados de ensaios que não apresentam comportamento segundo uma distribuição normal<sup>6</sup>. A vantagem da utilização da estatística robusta é que resultados dispersos não exercem grande influência na estimativa da posição central e da dispersão dos resultados não sendo, portanto, requerida aplicação de testes para verificação e exclusão de resultados dispersos ("outliers"). O valor designado é dado pela mediana (md) dos resultados. O valor de dispersão é calculado pela amplitude interquartilica normalizada<sup>7</sup>.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, o principal objetivo da avaliação externa da qualidade é estabelecer a comparabilidade entre resultados de laboratórios, particularmente em investigações epidemiológicas, monitorização ambiental e biológica, pesquisas e outras atividades em Saúde Pública<sup>8</sup>.

A concentração de chumbo sanguíneo é o indicador biológico mais utilizado para avaliar a exposição recente de

um indivíduo a esse metal. Como o chumbo está presente no sangue em baixas concentrações, esta determinação apresenta dificuldades analíticas e, dada a sua complexidade, podem ocorrer erros aleatórios mesmo quando o ensaio é realizado por técnico treinado, com equipamento calibrado e com metodologia validada.

Neste trabalho, serão aplicados diferentes critérios estatísticos para avaliar os resultados de um programa interlaboratorial para chumbo em sangue, em três níveis de concentração, objetivando comparar os diversos tratamentos estatísticos para obtenção dos valores designados e dos intervalos de aceitação, avaliar o impacto à saúde de população exposta ao chumbo decorrente da adoção de diferentes critérios de aceitação dos resultados e avaliar os métodos mais adequados de tratamento estatístico para o PEP-Pb-s, na presença de resultados dispersos.

## MATERIAL E MÉTODO

Foram selecionadas três amostras do Programa de Ensaio de Proficiência para Chumbo em Sangue coordenado pelo Instituto Adolfo Lutz, com participação de cerca de 30 laboratórios, com concentrações de chumbo sanguíneo variando de cerca de 16 a 70 µg/100mL, abrangendo níveis geralmente encontrados em indivíduos com exposição ambiental ou ocupacional.

Num PI, a maior dificuldade no tratamento estatístico dos resultados é a determinação do valor verdadeiro do item de ensaio que, no caso de ensaios quantitativos, refere-se à determinação da concentração verdadeira do analito na amostra de ensaio. Em geral, não se tem o valor verdadeiro da amostra de ensaio, calculando-se, então, o valor designado.

Neste caso os valores designados foram os valores de consenso dos laboratórios participantes, obtidos por meio da média ou da mediana dos resultados. No caso de cálculos do valor designado baseado na média, empregou-se primeiramente algum teste de detecção para exclusão de "outliers", de forma que esses não pudessem afetar fortemente as estimativas da média (valor designado) e do desvio padrão. Ao utilizar a mediana como valor designado, não houve necessidade de aplicar testes de detecção de valores dispersos, já que é uma estatística robusta. Para que o desvio padrão também fosse obtido de forma robusta, foi calculado a partir da equação de Horwitz, ou da equação de Horwitz modificada por Thompson<sup>9</sup>, ambas baseadas na mediana dos resultados.

Foram comparados quatro testes de detecção de valores dispersos: Dixon, Grubbs, Z-score e Hampel<sup>10,4</sup>, sendo este último baseado em estatística robusta. Após a aplicação dos testes de detecção de "outliers", foi possível obter as estimativas para os valores designados por meio da média e desvios padrão e, dessa forma, foram então estabelecidos os intervalos de aceitação.

Os critérios descritos para estabelecer o valor designado, o desvio padrão e o intervalo de aceitação estão combinados de diferentes maneiras nas Tabelas 1 e 2, totalizando sete tratamentos estatísticos (A, B, C, D, E, F e G), que foram avaliados conforme os objetivos e as necessidades de um Programa Interlaboratorial para Chumbo em sangue.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observa-se pela Tabela 3 que, dentre todos os testes para exclusão de valores dispersos avaliados, o teste de Dixon é o que detecta a menor quantidade de dispersos. Necessita de valores tabelados, que dependem do tamanho da amostra e do nível de confiança adotado. Além disso, Dixon testa somente o menor ou maior valor presente na amostra, havendo necessidade, em alguns casos, da realização de vários passos para se detectar todos os “outliers”.

Já o teste de Grubbs apresenta as mesmas dificuldades com relação a valores tabelados e a número de passos até a obtenção de todos os valores de interesse. No entanto, detecta, em geral, pelo menos o mesmo número de valores dispersos que o teste de Dixon e é menos trabalhoso em termos de cálculos matemáticos<sup>4</sup>.

O Z-score utiliza o mesmo procedimento iterativo de eliminação dos valores dispersos do teste de Grubbs, com a vantagem de não depender de tabelas para sua realização, já que usa o índice z e avalia os valores de aceitação dentro do

intervalo fixo de -2 a 2, com 95% de confiança. Por fixar um intervalo, esse teste torna-se mais rigoroso, sendo, dentre todos os testes aqui utilizados, aquele que mais detecta valores dispersos, levando a uma estimativa menor do desvio padrão.

O teste de Hampel é o único, dentre os avaliados, baseado em estatísticas robustas. Não depende de valores tabelados que variam com o tamanho da amostra e é preciso aplicá-lo somente uma vez, o que o torna menos trabalhoso em relação aos demais. Em comparação aos dois primeiros testes citados, detecta mais observações discrepantes.

Ao considerarmos as técnicas cujos valores designados foram obtidos a partir da mediana, nota-se que os desvios padrão, calculados por meio das equações de Horwitz e de Horwitz modificada por Thompson, são semelhantes. A equação de Horwitz modificada por Thompson leva em consideração a faixa de concentração do analito, porém, para as concentrações usualmente encontradas para o chumbo sanguíneo, µg/100mL, as duas equações são coincidentes. Os resultados obtidos para o valor designado e o intervalo de aceitação das três amostras escolhidas utilizando os diferentes critérios estatísticos encontram-se nos Tabelas 4 e 5.

Os valores designados obtidos pelos critérios estatísticos que empregam a média (A, B, C, D e E) não apresentaram diferenças estatisticamente significantes para as amostras X1, X2 e X3, cujos valores de p com 95% de confiança foram respectivamente: 0,988, 0,922 e 0,801. Usando as técnicas F e G, os valores designados obtidos pelo emprego das medianas mostraram-se semelhantes aos anteriormente obtidos pela

**Tabela 1.** Critérios estatísticos utilizados para o cálculo do valor designado e do intervalo de aceitação baseados na média.

Critério Estatístico	Teste de Detecção De outliers	Intervalo de aceitação
A	Hampel	$X_{\text{designado}} \pm 2s_A$
B	Z-score	$X_{\text{designado}} \pm 2s_B$
C	Grubbs	$X_{\text{designado}} \pm 2s_C$
D	Dixon	$X_{\text{designado}} \pm 2s_D$
E	Z-score	$X_{\text{designado}} \pm 6$ , para concentrações $\leq 40 \mu\text{g}/100\text{mL}$ e $X_{\text{designado}} \pm 15\% X_{\text{designado}}$ , para concentrações $> 40 \mu\text{g}/100\text{mL}$

$s_A$ ,  $s_B$ ,  $s_C$  e  $s_D$  são os desvios padrão obtidos a partir de cada um dos critérios estatísticos apresentados e calculados com os resultados válidos após a aplicação dos testes de detecção de valores dispersos.

**Tabela 2.** Critérios estatísticos para a determinação do valor designado e do intervalo de aceitação baseados na mediana.

Critério estatístico	Cálculo do desvio padrão	Intervalo de aceitação
F	$s_F = \frac{2^{(1-0,5\log C)} \times \text{mediana}}{100}$	$X_{\text{designado}} \pm 2s_F$
G	$s_G = 0,02C^{0,8495}$ , $1,2 \cdot 10^{-7} \leq C \leq 0,138$	$X_{\text{designado}} \pm 2s_G$

C = razão de concentração expressa em g/g

média.

Os resultados obtidos são concordantes com LINSINGER et al<sup>4</sup> que compararam diferentes critérios utilizados na eliminação dos dispersos e verificaram que a média, ao contrário do desvio padrão, não é muito afetada pelo critério utilizado. Isso significa que o valor designado não é muito influenciado pelo critério de exclusão selecionado, o mesmo não ocorrendo com os cálculos do intervalo de confiança e do critério de desempenho que, em geral, envolvem o valor do desvio padrão. Por esse motivo, o critério utilizado para eliminação de valores dispersos de aceitação deve estar claro no relatório do programa enviado aos participantes. Os intervalos indicados na tabela 5 são representados nas Figuras 1, 2 e 3. A tabela 6 compara a influência dos critérios sobre a

percentagem de laboratórios com resultados considerados satisfatórios. Entre os aspectos a serem considerados na escolha de critérios estatísticos para o cálculo do intervalo de aceitação estão as suas possíveis conseqüências. No caso de análise de chumbo sanguíneo, se o laboratório, por erro na realização da análise, expressar um resultado menor que o real, um ou mais indivíduos podem deixar de ser afastados da fonte de exposição, sofrendo agravos à sua saúde, uma vez que o chumbo é um metal altamente tóxico e cumulativo. Se ocorrer o inverso, no caso de exposição ocupacional, poderão ocorrer perdas econômicas para a empresa ou para a Previdência Social, o que mostra a importância da exatidão de um resultado analítico. Neste caso, o critério estatístico empregado para avaliar o desempenho deve ser mais restritivo e considerar como

**Tabela 3.** Percentagem de valores dispersos detectados por teste e amostra (X1, X2 ou X3).

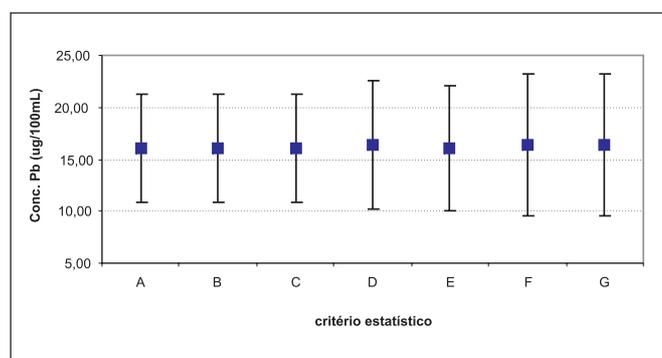
Teste de detecção de "outliers"	Percentagem de "outliers" detectados		
	X1 (n=27)	X2 (n=29)	X3 (n=27)
Hampel	7	10	15
Z-score	7	24	15
Grubbs	7	0	0
Dixon	4	0	0

**Tabela 4.** Valor designado para cada amostra, em µg/100mL, de acordo com a critério estatístico.

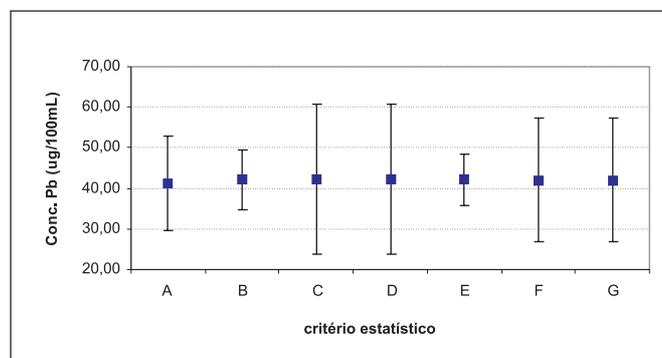
Critério estatístico	Valor designado para cada amostra		
	X1	X2	X3
A	16,08	41,31	65,54
B	16,08	42,11	65,54
C	16,08	42,25	67,44
D	16,42	42,25	67,44
E	16,08	42,11	65,54
F e G	16,38	42,00	67,15

**Tabela 5.** Intervalo de aceitação para cada amostra, em µg/100mL, de acordo com critério estatístico.

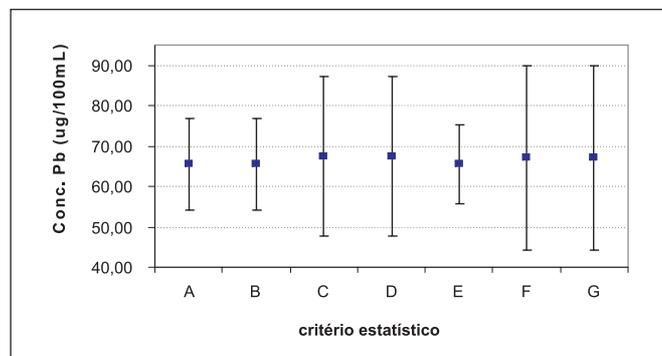
Critério estatístico	Intervalo de aceitação para cada amostra		
	X1	X2	X3
A	10,83-21,33	29,72-52,90	54,18-76,89
B	10,83-21,33	34,68-49,54	54,18-76,89
C	10,83-21,33	23,80-60,70	47,71-87,18
D	10,22-22,62	23,80-60,70	47,71-87,18
E	10,08-22,08	35,79-48,43	55,71-75,37
F e G	9,50-23,26	26,69-57,31	44,33-89,97



**Figura 1.** Intervalos de aceitação para a amostra X1.



**Figura 2.** Intervalos de aceitação para a amostra X2.



**Figura 3.** Intervalos de aceitação para a amostra X3.

**Tabela 6.** Percentagem de laboratórios com desempenho satisfatório por amostra, dependendo do critério estatístico utilizado.

Critério estatístico	Percentagem de laboratórios com desempenho satisfatório		
	X1 (n=27)	X2 (n=29)	X3 (n=27)
<b>A</b>	85	83	85
<b>B</b>	85	76	85
<b>C</b>	85	90	93
<b>D</b>	93	90	93
<b>E</b>	93	69	70
<b>F e G</b>	93	90	96

intervalo de aceitação uma faixa mais estreita de valores de concentração.

Analisando os resultados, verifica-se que para a amostra de baixa concentração (X1), os diferentes critérios empregados resultam em intervalos de aceitação semelhantes, o mesmo não ocorrendo para as demais concentrações.

Nas Figuras 2 e 3, tornam-se mais visíveis as diferenças obtidas no Intervalo de aceitação pelo emprego dos diferentes critérios. Verifica-se que os critérios C e D não se mostraram adequadas para o caso da determinação de chumbo sanguíneo, uma vez que, para a amostra X2, consideraram aceitáveis resultados de laboratórios com concentrações de Pb que variam desde o nível de não exposição para adultos até o Índice Biológico Máximo Permitido, de 60 µg/100 mL<sup>11</sup>. Para a amostra X3 o comportamento foi semelhante. Os critérios F e G apresentaram-se como equivalentes entre si para o cálculo dos intervalos de aceitação, os quais também se mostraram pouco restritivos, sendo que nas amostras de concentração alta os intervalos foram ainda superiores aos definidos pelas técnicas C e D. Para as amostras de concentrações média e alta, as técnicas A, B e E mostraram-se progressivamente mais restritivas.

No caso do critério estatística E, que é a empregada atualmente no Programa, o intervalo de aceitação independe da dispersão dos resultados do grupo, uma vez que não inclui esse parâmetro no seu cálculo. Este intervalo de aceitação também é o utilizado pelo PICC da Espanha e baseado no programa da United Kingdom External Quality Assessment Scheme for Lead in Blood (UKEQAS)<sup>12</sup>. O critério também leva em conta a dificuldade analítica, pois à medida que a concentração do chumbo sanguíneo diminui, o intervalo torna-se mais aberto. Assim, por exemplo, o valor 6 µg/100 mL, que é a semi-amplitude do intervalo de aceitação, representa 15% da concentração quando o valor designado é 40 µg/100

mL; já para um teor de 20 µg/100 mL, esse mesmo valor representa 30% da concentração.

## CONCLUSÕES

A utilização de diferentes critérios estatísticos empregados para o tratamento de resultados de um programa interlaboratorial mostrou que o valor designado não foi significativamente influenciado pelo critério utilizado. No entanto, o intervalo de aceitação, que depende da estimativa do desvio padrão na maioria dos casos aqui analisados, variou dependendo do critério estatístico adotado.

Nem todos os critérios estatísticos comumente empregados para o tratamento de dados de um PI são adequados para o caso do Programa de Ensaio de Proficiência para chumbo em sangue, uma vez que o intervalo de aceitação deve ser mais restritivo e levar em consideração os agravos à saúde de indivíduos ou populações expostas que podem resultar de decisões incorretas.

O critério estatístico E, atualmente empregado no Programa, mostrou-se adequado aos três níveis de concentração e tem a particularidade de levar em consideração a dificuldade analítica do ensaio. Esse critério pode inclusive ser utilizado em programas interlaboratoriais cujos laboratórios participantes não estejam ainda completamente harmonizados.

## REFERÊNCIAS

1. Associação Brasileira de Normas Técnicas [ABNT]. ABNT ISO / IEC Guia 43: ensaios de proficiência por comparações interlaboratoriais. Rio de Janeiro; 1999.
2. Associação Brasileira de Normas Técnicas [ABNT]. ABNT ISO / IEC Guia 17025: requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaios e calibração. Rio de Janeiro; 2005.
3. Davies PL. Statistical evaluation of interlaboratory tests. *Fresenius Z Anal Chem* 1988;331:513-9.
4. Linsinger TPJ, Kandler W, Kraska R, Grasserbauer M. The influence of different evaluation techniques on the results of interlaboratory comparisons. *Accred Qual Assur* 1998;3:322-7.
5. Tholen DW. Statistical treatment of proficiency testing data. *Accred Qual Assur* 1998;3:362-6.
6. Analytical Methods Committee. Robust Statistics – How not to reject outliers. Part 1. Basic Concepts. *Analyst* 1989;114: 1693-7.
7. Chui QSH, Bispo JMA, Iamashita CO. Comparação de técnicas estatísticas aplicadas à avaliação de resultados de programas interlaboratoriais. Anais do III Congresso Internacional de Metrologia em Química, Curitiba, PR, de 30 de setembro a 02 de outubro de 2002.
8. World Health Organization. Regional Office for Europe. External quality assessment of health laboratories. Copenhagen; 1981.
9. Thompson M. Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing. *Analyst* 2000;125:385-6.
10. International Organization for Standardization [ISO]. ISO 5725-2:1994(E). Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method. Genève; 1994.
11. Brasil. Norma Regulamentadora nº 7, Portaria nº 24, de 29.12.1994 da Secretaria de Segurança e Saúde no Trabalho. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 30 dez. 1994.
12. Bullock DG, Smith NJ, Whitehead TP. External quality assessment of assays of lead in blood. *Clin Chem* 1986;32(10):1884-9.

# Perfil de ácidos graxos da pele e músculo de *Balistes capriscus* e *Menticirrhus littoralis*, pescados na região sul do Brasil

## Fatty acids profile in muscle and skin of *Balistes capriscus* and *Menticirrhus littoralis* fished in southern region of Brazil

RIALA6/1071

Ademir, L. BASTOS, Ana Luiza M. BAISH<sup>1</sup>, Rosilene M. CLEMENTIN, Leonor A. de SOUZA-SOARES, Eliana B. FURLONG\*

\* Endereço para correspondência: <sup>1</sup> Fundação Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rua Engenheiro Alfredo Huch 475 Caixa Postal 474-Bairro Centro -Cep 96201900 Rio Grande/RS

Recebido: 01/02/2006 – Aceito para publicação: 31/08/2006

### RESUMO

Neste trabalho foi determinado o perfil de ácidos graxos da pele e do músculo de duas espécies marinhas de pescados, *Balistes capriscus* e *Menticirrhus littoralis*, usadas pela população da região de Rio Grande no Rio Grande do Sul. Estes pescados foram selecionados pelos efeitos benéficos dos chás de suas peles para tratamento da asma brônquica. Os pescados foram coletados no mercado público e empresas de pescado da cidade e a pele e o músculo destes foram separados para o estudo. As frações lipídicas foram extraídas pelo método de Bligh e Dyer, esterificadas, identificadas e quantificadas por cromatografia gasosa. Os resultados revelaram que os ácidos graxos predominantes nas duas porções (músculo e pele) das espécies foram o ácido dihomo- $\gamma$ -linolênico (20:3n-6;DHA) e o ácido eicosapentaenóico (20:5n-3; EPA), estes representam juntos 21,3% e 39% nas duas porções do *Balistes capriscus* e 12,8% e 24,2% no *Menticirrhus littoralis*. Os ácidos graxos poliinsaturados representam de 54,6 a 67,6% dos lipídios totais em quase todas as porções, exceto na pele do *Menticirrhus littoralis* em que predominaram os ácidos graxos monoinsaturados. A relação dos ácidos graxos EPA e DHA apresentou valores sempre superiores a 2 no músculo e na pele dos pescados estudados.

**Palavras-Chave.** *Balistes capriscus*, *Menticirrhus littoralis*, ácidos graxos poliinsaturados, músculo, pele, óleo de pescado.

### ABSTRACT

The fatty acids profile was determined in skin and muscle from two species of marine fishes, *Balistes capriscus* e *Menticirrhus littoralis*, consumed by population in Rio Grande, Rio Grande do Sul State. These fishes were chosen due to the benefic effects of their skin, used as infused tea for asthma treatment. Fishes samples were collected in public market and fish industries located in Rio Grande city and the fish skin was separated from the muscle. -The lipid fractions were extracted following Bligh and Dyer methodology, and then esterified, identified, and quantified by means of gas chromatography technique. The main fatty acids found in both muscle and skin portions of these fish species were dihomo linoleic acid (20:3n-6;DHA) and eicosapentenoic acid (20:5n-3; EPA), being 21.3% and 39% in both portions of *Balistes capriscus*, and 12.8% and 24.2% in *Menticirrhus littoralis*. Poliunsaturated fatty acid was equivalent to the quantity from 54,6% to 67.6% of the total lipids, except *Menticirrhus littoralis* skin, wherein the main fatty acids were monoinsaturated. The ratio of EPA to DHA values were always higher than 2, in both muscle and skin portions of the studied fishes.

**Key Words.** *Balistes capriscus*, *Menticirrhus littoralis*, fatty acids, muscle, skin.

## INTRODUÇÃO

Na região de Rio Grande, no Rio Grande do Sul, como em outras regiões do país, a população atribui à pele dos pescados *Balistes capriscus* e *Menticirrhus littoralis* efeitos farmacológicos benéficos capazes de reverter o quadro de asma brônquica. Tal característica foi demonstrada experimentalmente por Cavalli et al.<sup>1</sup>

Segundo dados fornecidos pelo Centro de Pesquisa e Gestão dos Recursos Pesqueiros (CEPERG/RS)<sup>2</sup>, o *Balistes capriscus* é mais freqüente nas estações de verão e outono e a pesca industrial costuma variar de um ano para outro chegando a serem capturadas em média 17 toneladas anuais. Quanto ao *Menticirrhus littoralis* a pesca industrial fica numa média de 8,3 toneladas anuais, sendo sua maior ocorrência nas estações de outono e inverno. No entanto, estas espécies são pouco valorizadas industrialmente, resultando em emprego na fabricação de subprodutos como farinha e silagem.

Os lipídios devido às suas propriedades físicas, químicas e fisiológicas têm se revelado, especialmente nos últimos anos, compostos cada vez mais importantes na nutrição humana e animal nos últimos anos<sup>3</sup>. Além de serem uma fonte de energia para o organismo, também funcionam como veículo de vitaminas lipossolúveis, com funções reguladoras ou de coenzimas, bem como de precursores na síntese de prostaglandinas e hormônios esteróides que desempenham papéis importantes no controle da homeostase do organismo.  
3-11

Vários estudos têm demonstrando que os lipídios provenientes de pescado são uma fonte rica em ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) especialmente aqueles da família omega-3, sendo encontrados em concentrações mais expressivas em peixes e animais marinhos, principalmente os de regiões frias.<sup>11-14</sup> Neste caso, são importantes especialmente por exercerem funções biológicas específicas tais como a capacidade de reduzir o teor de lipídios séricos e à sua conversão em compostos eicosanóides, que apresentam ação sobre a fisiologia do sistema vascular.<sup>3,4,6,7,9,10,11</sup> Pesquisas indicam que o aumento da ingestão de AGPI, principalmente ácido eicosapentaenóico (EPA), reduz o risco de doenças cardíacas, de fatores bioquímicos associados à artrite, psoríase e câncer.<sup>3,9,10</sup> Kelley<sup>8</sup> destaca que os AGPI EPA (22:5n-3) e dihomo- $\gamma$ -linolênico (20:3n-6) são precursores de potentes eicosanóides anti-inflamatórios tais como, as prostaglandinas (PGE2) e leucotrieno (LTB4), atuando no sistema imunológico das células.

Em função da importância dos lipídios, principalmente dos ácidos graxos poliinsaturados, na prevenção de doenças crônicas e na crença popular, de que os chás da pele dos pescados revertem a asma brônquica, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de ácidos graxos na pele e músculo dos pescados *Balistes capriscus* e *Menticirrhus littoralis*, uma vez que estudos sobre suas composições e seus efeitos são pouco freqüentes no Brasil, especialmente na região sul.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Preparo das amostras

As amostras da espécie *Balistes capriscus* (peixe-porco) foram coletadas em uma indústria pesqueira nos meses de julho e agosto de 2003 e as de *Menticirrhus littoralis* (papa-terra) no entreposto pesqueiro da cidade no mesmo período. Os espécimes amostrados foram indivíduos adultos, sem distinção de sexo.

Os pescados do tipo papa-terra foram escamados, filetados e a pele separada do músculo. As peles foram homogeneizadas utilizando um moedor manual de rosca sem fim. As amostras de peixe-porco tiveram a pele separada do músculo, porém devido a maneira como as escamas se aderem à pele não foi possível realizar uma perfeita escamação. Para homogeneizá-las foi empregado um moedor elétrico para romper a resistência ao corte. As porções homogeneizadas foram armazenadas sob congelamento (-18°C) até o momento das determinações analíticas.

Os músculos dos dois tipos de pescado (100 g) foram homogeneizados individualmente, sendo numa primeira etapa com o auxílio de um moedor de carnes manual e, em seguida, utilizando homogenizador Blender por aproximadamente 5 minutos até a obter uma massa homogênea. Estes também foram armazenados sob congelamento até a realização das determinações de ácidos graxos.

### Determinação de ácidos graxos

Os filés e as peles homogeneizados foram submetidos à extração de lipídios utilizando o método de Bligh e Dyer<sup>15</sup>. Os solventes dos extratos lipídicos foram evaporados em banho-maria a 50°C sob nitrogênio.

Para a esterificação, 100 mg de material lipídico extraído do filé e da pele de *Balistes capriscus* e 200 mg de cada porção do *Menticirrhus littoralis* foram transferidos separadamente para balões de fundo chato de 250 mL e submetidos ao processo de saponificação e metilação de acordo com método descrito por Metcalfe e Schimitz<sup>16</sup> que consiste em submeter o extrato lipídico a refluxo para saponificação e esterificação com trifluoreto de boro seguido de separação das fases aquosa e orgânica para recuperação dos derivados metilados de ácidos graxos.

Os ésteres metílicos dos ácidos graxos foram separados em cromatógrafo gasoso modelo Varian-3400 CX equipado com detector de ionização de chama. Os componentes da mistura foram separados em coluna megabore modelo DB-FFAP (fase estacionária: ácido nitrotereftálico modificado por polietilenoglicol) com 30 m de comprimento, 0,5 mm de diâmetro e filme de 1 mm de espessura. O gás de arraste foi o nitrogênio a 1 mL. min<sup>-1</sup>. As temperaturas do injetor e do detector foram de 250 e 300°C, respectivamente. A temperatura inicial da coluna foi de 90°C, permanecendo nesta temperatura por 2 minutos. A seguir foram utilizadas 4 programações de temperatura: aumento a 5°C min<sup>-1</sup> até 150°C, permanecendo

por 1 minuto; aumento a  $2^{\circ}\text{C min}^{-1}$  até  $200^{\circ}\text{C}$ , permanecendo por 2 minutos, aumento a  $2^{\circ}\text{C min}^{-1}$  até  $210^{\circ}\text{C}$ , aumento  $5^{\circ}\text{C}$  até  $240^{\circ}\text{C}$ , permanecendo nesta temperatura durante 20 minutos, totalizando 59 minutos. As quantidades de padrão e amostras injetadas foram de  $1\mu\text{L}$ . Foi utilizada uma mistura contendo 24 padrões da marca Sigma Supelco para a identificação dos ésteres de ácidos graxos, cujos componentes estão especificados na Tabela 3.

A identificação dos ésteres metílicos foi realizada pela comparação dos tempos de retenção dos padrões com o das amostras; e através da extrapolação gráficos do  $\log Tr$  (tempo de retenção dos padrões) número de átomos de carbono como variável independente, descrito por Maia<sup>17</sup>.

A quantificação dos picos cromatográficos foi efetuada utilizando o software Varian Star 4.51 acoplado ao cromatógrafo, e os resultados expressos em porcentagens de ésteres metílicos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados presentes no extrato lipídico determinados por normalização das áreas, fornecidas pelo software. As determinações foram realizadas em triplicatas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os teores de lipídios totais presentes nas diferentes porções de pescado estão apresentados na Tabela 1, referem-se a média de seis ensaios.

Os níveis de lipídios totais encontrados nas espécies estudadas, permitiram classificar, segundo Contreras<sup>8</sup>, as duas porções na categoria A, isto é, baixo teor de gordura (abaixo de 5%) com exceção da pele do *Menticirrhus littoralis* (7%). Amostras destes pescados coletadas em outras épocas do ano apresentaram valores semelhantes.

Na Tabela 2 estão apresentadas os resultados médios de três ensaios avaliando as composições de ácidos graxos do músculo e da pele dos pescados *Balistes capriscus* e *Menticirrhus littoralis*. O padrão Supelco utilizado para a determinação de ácidos graxos continha, segundo o fabricante, 24 ésteres metílicos, sendo separados satisfatoriamente 23 nas condições cromatográficas utilizadas. Possivelmente não foram separados os ácidos erúico (22:1n-9) do ácido cetoléico (22:1n-11) que é o mais comum em óleo de pescado<sup>4,17</sup>. Foi

**Tabela 1.** Teores de lipídios totais no músculo e pele dos pescados *Balistes capriscus* e *Menticirrhus littoralis*.

Espécie (porção)	g. 100 g <sup>-1</sup>	CV (%)
<i>Balistes capriscus</i> (músculo)	0,8	10
<i>Balistes capriscus</i> (pele)	0,5	12
<i>Menticirrhus littoralis</i> (músculo)	0,8	11
<i>Menticirrhus littoralis</i> (pele)	7	5

CV : coeficiente de variação

observado que o ácido beênico (22:0) é o ácido graxo saturado (AGS) mais abundante, tanto no músculo quanto na pele das duas espécies de pescado, respectivamente 15, 12, 14 e 20,4%. Em segundo encontra-se o ácido margárico (C17:0), embora sua presença pareça equivocada por tratar-se de ácido graxo de número ímpar de carbonos, também Gonçalves e Souza-Soares<sup>7</sup> mencionaram a presença deste ácido graxo em diferentes óleos de pescado. Moreira et al.<sup>21</sup> estudaram o efeito do ambiente na composição de ácidos graxos na cabeça de algumas espécies de pescados e os teores encontrados não são similares a estes

O ácido palmitoléico (16:1) é o principal ácido graxo monoinsaturado (AGMI) presente no músculo e na pele das espécies estudadas, seguido pelo ácido oléico (18:1). Quanto aos ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) o predominante nas duas porções foi o ácido dihomo- $\gamma$ -linolênico (20:3n-6) e em segundo o ácido eicosapentenoico (20:5n-3; EPA), eles representam juntos 21,3% e 39% nas duas porções do *Balistes capriscus* e 12,8% e 24,2% no *Menticirrhus littoralis*.

A partir da Tabela 2 pode ser verificado que a relação EPA/DHA no músculo e pele das duas espécies apresenta valores superiores a 1 mostrando que a quantidade de EPA foi maior que o DHA. Segundo Contreras<sup>12</sup>, isto reflete a composição do plâncton, que em determinados períodos é mais rico em EPA do que DHA, gerando um acúmulo de gordura visceral e subcutânea.

Na Figura 1 está um cromatograma que ilustra a separação dos ésteres metílicos, nas condições cromatográficas empregadas. Estão grifados na figura os ésteres presentes em maiores proporções na pele do *Menticirrhus littoralis*, conforme salientado no texto.

A Tabela 3 apresenta o resultado das relações EPA/DHA para a mesma espécie e parte do corpo, além das relações EPA (pele/músculo) e DHA (pele/músculo) para uma mesma espécie.

Os valores da relação EPA (pele/músculo) e DHA (pele/músculo) foram próximos aos da relação olho/filé encontrados por Visentainer et al.<sup>14</sup> para outros pescados marinhos. A relação EPA/DHA no músculo e pele dos pescados estudados foi sempre superior a 2, indicando tratar-se de uma fonte balanceada destes ácidos graxos.

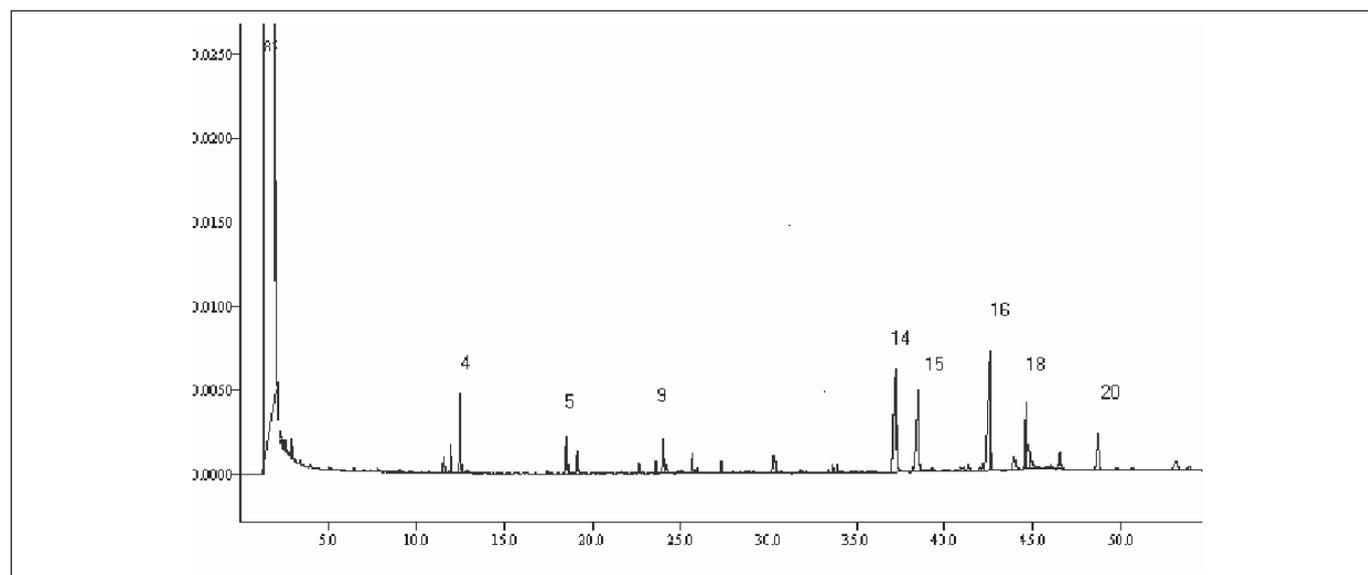
A pele do *Menticirrhus littoralis* apresentou valor da relação EPA/DHA de 2,8, podendo ser uma fonte barata para obtenção destes ácidos graxos, salientando que ocasionalmente quando processados ou utilizados na alimentação a pele é retirada para a produção de filés. O *Balistes capriscus* apesar de ser um pescado bastante magro apresentou relação de EPA/DHA superior no músculo.

No pescado *Balistes capriscus* os níveis de ácidos graxos insaturados foram 3,5 vezes superiores às quantidades de ácidos graxos saturados tanto na pele quanto no músculo. Podendo esta relação estar associada com seus efeitos benéficos para o tratamento da asma brônquica, uma vez que estes ácidos graxos poliinsaturados participam da composição de

**Tabela 2.** Composição de ácidos graxos expressos como porcentagem do lipídio dos músculos e pele dos pescados *Balistes capriscus* e *Menticirrhus littoralis*.

Ácido graxo	<i>Balistes capriscus</i>		<i>Menticirrhus littoralis</i>	
	Músculo	Pele	Músculo	Pele
Ác. Mirístico (14:0)	1,7	Nd	Nd	Nd
Ác. Miristoleico (14:1 ω5)	Nd	Nd	2	Nd
Ác. Palmitoleico (16:1 ω7)	5,6	1	22,2	5,7
Ác. Margárico (17:0)	0,8	Nd	12,1	3,8
Ác. Metilpalmitoleico (c17:1)	1,7	Nd	Nd	Nd
Ác. Esteárico (18:0)	1,2	Nd	Nd	Nd
Ác. Oléico (18:1n-9) cis	4,3	0,6	15,3	3,4
Ác. Linoléico (18:2n-6) trans	Nd	Nd	Nd	1,3
Ác. Linolênico (18:3n-3)	Nd	Nd	Nd	6,3
Ác. Araquídico (20:0)	Nd	Nd	1,1	Nd
Ác. Gadoleico (20:1n-9)	1,8	4,2	1,6	3
Ác. Eicosadienóico (20:2n-6)	0,9	Nd	1	Nd
Ác. Dihomo-γ-linolênico(20:3n-6)	15	35,5	9	20,2
Ác. Araquidônico (20:4 n-3)	Nd	0,6	Nd	0,5
Ác. Eicosapentaenóico (20:5n-3)	6,3	3,5	3,8	4
Ác. Behênico (22:0)	15	12	14	20,1
Ác. Docosaenoico (22:1)	2	11,4	1,6	1,7
Ác. Docosadienóico (22:2)	4,6	2,6	12	21
Ác. Clupanodônico (22:5n-3)	16	24	Nd	Nd
Ác. Docosapentaenóico (22:5n-6)	17,7	Nd	Nd	Nd
Ác. Docosahexaenóico (22:6n-3)	1,4	1,4	1,7	1,4
Ác. Lignocérico (24:0)	2,7	2	Nd	3,8
Ác. Nervônico (24:1n-9)	Nd	Nd	Nd	0,4
Σ ω3	23,7	29,5	5,5	12,2
Σ ω6	33,6	35,5	10	21,5
Razão ω6/ω3	1,4	1,2	1,8	1,8

Nd: Não detectado



**Figura 1.** Cromatograma dos ésteres metílicos presentes na pele de *Menticirrhus littoralis*.

4: ácido palmitoleico; 5: ácido margárico; 9: ácido oléico; 12: eicosapentaenóico; 14: ácido dihomog-linolênico; 15: ácido beênico; 16: ácido docosadienóico; 18: ácido lignocérico; 20: docosahexaenóico.

**Tabela 3.** Relações entre EPA/DHA no músculo e pele de *Balistes capriscus* e *Menticirrhus littoralis*.

Espécie	Porção	EPA/DHA	EPA pele/músculo	DHA pele/músculo
<i>Balistes capriscus</i>	Músculo	4,5	0,55	1
	Pele	2,5		
<i>Menticirrhus littoralis</i>	Músculo	2,2	1,05	0,8
	Pele	2,8		

fosfolípidios constituintes das membranas celulares.<sup>11</sup> No pescado *Menticirrhus littoralis* esta superioridade ficou em torno de 2,4 vezes no músculo e na pele.

Em relação ao total de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) e ácidos graxos saturados (AGS), as espécies estudadas apresentaram valores diferentes dos mencionados por Mendez et al.<sup>13</sup> em filés de outras espécies marinhas da América Latina (valores de AGPI numa faixa de 16% a 38% e AGS entre 30% e 37,5%). Maia et al.<sup>14</sup> encontraram para filés de pescados de água doce valores de AGPI e AGS em torno de 21 e 42%, respectivamente. Tais relações indicam que apesar destas espécies serem do tipo magro os balanços em ácidos graxos são altos sugerindo a possibilidade de empregá-las para satisfazer as necessidades recomendadas para a prevenção de doenças crônico-degenerativas.<sup>9,10</sup>

A Figura 2 ilustra a composição percentual de ácidos graxos saturados (AGS), ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) e ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) nas porções músculo e pele dos pescados estudados.

No que se refere à questão nutricional, Enser et al.<sup>19</sup>, baseados em informações do Departamento de Saúde da Inglaterra, recomendam para alimentos integrais a razão AGPI/AGS no mínimo 0,45 com uma relação  $\omega 6/\omega 3$  de no máximo 4. As razões AGPI/AGS no músculo do *Balistes capriscus* e *Menticirrhus littoralis* foram de 2,9 e 0,9 respectivamente. Na pele as razões de AGPI/AGS foram de 4,8 e 1,9 para as duas espécies. Nos músculos as razões

encontradas foram 1,4 e 1,8 do *Balistes capriscus* e *Menticirrhus littoralis*, respectivamente, sendo superiores aquelas encontradas por Andrade et al.<sup>5</sup> para outras espécies marinhas, que foram de 0,05 para a anchova (*Anchovia clupeoides*) e 0,08 para merluza (*Merluccius hubbisi*).

Com relação às quantidades de AG- $\omega 3$  nos pescados estudados foram obtidos valores iguais e até 2,3 vezes maior, tanto no músculo quanto na pele, quando comparados aos resultados obtidos nos músculos de 5 espécies marinhas e de água doce, conforme mencionado por Luzia et al.<sup>20</sup>

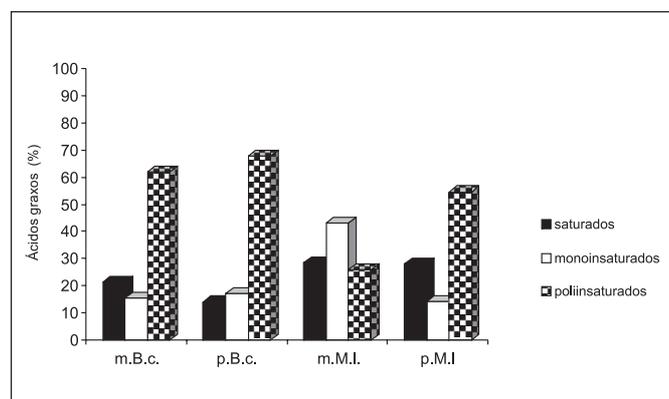
## CONCLUSÃO

Os teores de lipídios totais nas duas espécies permitem classificá-los como pescados do tipo magro. Nos lipídios do músculo e pele do *Balistes capriscus* os valores de AGPI foram 54,6 e 67,6% e de AGS e 21,4 e 28,6% respectivamente. O músculo do pescado *Menticirrhus littoralis* que apresentou maior quantidade de AGMI (43%). Nas duas espécies as relações EPA/DHA mostraram que as quantidades de EPA foram superiores as de DHA nas porções analisadas.

Os ácidos graxos presentes em maiores quantidades foram o ácido docosapentaenóico (22:5n-6) com 17,7% no músculo e dihomo- $\gamma$ -linolênico (20:3n-6) com 35,5% na pele do *Balistes capriscus* e o ácido palmitoléico (16:1n-7) com 22,2% no músculo e dihomo- $\gamma$ -linolênico (20:3n-6) com 20,2% na pele do *Menticirrhus littoralis*.

## REFERÊNCIAS

1. Cavalli L S et al. Fish *Balistes capriscus* skin extract induced relaxation in mesenteric arterial bed of rat. *J Ethnopharmacology* 2003;88:215-20.
2. CEPERG/RS (Centro de Pesquisa e Gestão dos Recursos Pesqueiros Lagunares e Estuarinos) – IBAMA. Desembarque de Pescados no Rio Grande do Sul. Rio Grande: CEPERG/RS, 1999, 2000, 2001.
3. Ramírez M, Amate L, Gil A. Absorption and distribution of dietary fatty acids from different sources. *Early Human Development* 2001;65:95-101.
4. Ackman RG. Nutritional composition of fats in seafoods. *Progress Food Nutrition*, 1989;13: 161-241.
5. Andrade AD et al. Omega-3 fatty acids in baked marine fish from south of Brazil. *Ach. Biol Tec* 1996;39:187-92.
6. Champe PC, Harvey RA. *Bioquímica ilustrada*, 2ª edição, Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.
7. Gonçalves AA, Souza-Soares LA. Lipídios em peixes. *Revista Vetor* 1998;8:35-53.
8. Kelley DS. Modulation of human immune and inflammatory responses by dietary fatty acids. *Nutrition* 2001;17:669-73.



**Figura 2.** Composição de Ácidos Graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados (%) no músculo e pele dos pescados *Balistes capriscus* e *Menticirrhus littoralis*.

m.B.c.: músculo *Balistes capriscus*; p.B.c.: pele *Balistes capriscus*; m.M.I.: músculo *Menticirrhus littoralis*; p.M.I.: pele *Menticirrhus littoralis*.

9. Vázquez, RP et al Effects of different dietary oils on inflammatory mediator generation and fatty acid composition in rat neutrophils. *Metabolism* 2004;53:59-65.
10. Weaver BJ, Holob BJ. Health effects and metabolism of dietary eicosapentaenoic acid. *Progress in Food and Nutr Sc* 1998; 12:111-50.
11. Badolato ESG et al. Determinação dos ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docohexapentaenóico (DHA) em óleo de sardinha brasileira (*Sardinella brasiliensis*) e em suplementos alimentares à base de óleo de sardinha. *Rev Inst Adolfo Lutz* 1991;3: 21-3.
12. Contreras-Guzmán ES. *Bioquímica de pescados e derivados*. Jaboticabal: FUNEP, 1994.
13. Mendez E et al. Lipid content and fatty composition of filets of six fishes from the Rio de la Plata. *J Food Comp and Analysis* 1996;9:163-70.
14. Visentainer JV et al. Concentração de ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) em peixes marinhos da costa brasileira. *Ciênc Tecnol Alim* 2000;20:90-3.
15. Bligh EG, Dyer WJA. Rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Bioch Phys* 1959;37:911-7.
16. Metcalfe LDAA, Schmitz JR. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas liquid chromatography. *Anal Chem* 1966;38:514.
17. Maia EL. *Caracterização dos constituintes lipídicos e composição em aminoácidos de peixes de água doce* [Tese de Doutorado]. Campinas, Universidade Estadual de Campinas, 1992, 242 p.
18. Maia EL. et al. Fatty acids of the total, neutral, and phospholipids of the brazilian freshwater fish *Prochilodus scrofa*. *J Food Comp and Analysis* 1994;7:240-51.
19. Enser M et al. Fatty acid content and composition of UK beef and lamb muscle in relation to production system and implications for human nutrition. *Meat Science* 1998; 49:329-41.
20. Luzia LA et al. The Influence of season on the lipid profiles of five commercially important species of brazilian fish. *Food Chem* 2003;15:1-5.
21. Moreira AB et al. Composição de ácidos graxos e teor de lipídios em cabeças de peixes: matrinxã (*B. cephalus*), piraputanga (*B. microlepis*) e piracanjuba (*B. orbignyana*), criados em diferentes ambientes. *Ciênc Tecnol Alim* 2003; 23:79-183.

# Determinação espectrofotométrica de ciclamato de sódio em alimentos e bebidas dietéticas e de baixas calorias

## Sodium cyclamate determination in dietetics and low calories foods and beverages by spectrophotometry

RIALA6/1072

Mônica C. R. de CAMARGO\*; Maria Cecília F. TOLEDO

\* Endereço para correspondência: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, CP 6121, Rua Monteiro Lobato, 80 - CEP 13083-862, Campinas, SP, Brasil. e-mail: monicarajo@uol.com.br

Recebido: 21/11/2005 – Aceito para publicação: 31/08/2006

### RESUMO

O presente estudo teve como objetivo determinar os teores de ciclamato de sódio em adoçantes de mesa líquido, adoçantes em pó, refrigerantes diet/light, chás diet/light, iogurtes light, néctares light, além de preparados sólidos para refresco light, comercializados na região de Campinas, SP. A determinação deste edulcorante foi feita por espectrofotometria de UV, após sua derivação a N,N-diclorociclohexilamina. A absorbância foi medida em um espectrofotômetro Varian, Modelo Cary 50, a 314 nm usando o ciclohexano como referência. Os teores de ciclamato de sódio variaram de acordo com o produto analisado, situando-se na faixa de 64,9 a 95,0 mg/mL em adoçantes de mesa, 79,0 a 94,4 mg/g em adoçantes em pó, 36,1 a 101,0 mg/100mL em refrigerantes diet/light, 22,7 a 54,0 mg/100mL em chás diet/light, 83,6 a 105,0 mg/100mL em néctares light e de 83,6 a 122,5 mg/100mL em iogurtes light. Em uma única marca de preparado sólido para refresco light analisada, a quantidade média encontrada para o edulcorante foi de 28,2 mg/100 mL. De modo geral, a concentração de ciclamato de sódio não excedeu o limite máximo estabelecido pela legislação brasileira para cada uma das categorias de alimentos estudadas.

**Palavras-Chave.** edulcorantes, ciclamato de sódio, análise de alimentos, alimentos e bebidas de baixa caloria.

### ABSTRACT

The present study was conducted in order to determine sodium cyclamate concentrations in tabletop sweeteners, powdered sweeteners, diet/light soft drinks, diet/light teas, light yogurts, light nectars and dried mixture for light beverages, available in markets of Campinas city. Determination of this sweetener product was performed by ultraviolet spectrophotometry. Sodium cyclamate was quantitatively converted to N,N-dichlorocyclohexylamine, which was determined by measuring its UV absorption at 314 nm. Cyclamate concentration varied according to the analyzed matrix in a range from 64.9 to 95.0 mg/mL in tabletop sweeteners, 79.0 to 94.4 mg/g in powdered sweeteners, 36.1 to 101.1 mg/100mL in diet/light soft drinks, 22.7 to 54.0 mg/100mL in diet/light teas, 83.6 to 105.0 mg/100mL in light nectars, and 83.6 to 122.5 mg/100mL in light yogurts. The unique brand of mixture for beverages available, the mean quantity of this sweetener was 28.2 mg/100 mL. In general, sodium cyclamate concentration in the analyzed samples did not exceed the maximum limit established by the Brazilian Legislation.

**Key Words.** intense sweeteners, sodium cyclamate, food analysis, low calorie products

## INTRODUÇÃO

Os edulcorantes pertencem à classe de aditivos alimentares cuja finalidade é substituir, parcial ou totalmente, os açúcares convencionais usados na elaboração de alimentos e bebidas<sup>1,2</sup>. O uso dessas substâncias começou a se popularizar na década de 60, principalmente nos Estados Unidos.

O ciclamato de sódio foi introduzido em bebidas e alimentos em 1950 e dominou o mercado de edulcorantes artificiais na maior parte dos anos 60, quando seu uso, em combinação com a sacarina, tornou-se bastante comum em bebidas dietéticas. A utilização destes edulcorantes, geralmente na proporção de dez partes de ciclamato para uma de sacarina, resulta em potencialização do sabor doce e, ao mesmo tempo, mascara o sabor amargo residual da sacarina<sup>3</sup>. Segundo Miller<sup>4</sup>, o crescimento do mercado de bebidas dietéticas, graças ao uso do ciclamato, representou um grande incentivo para o desenvolvimento posterior de novos edulcorantes.

No Brasil, até os anos 90, apenas sacarina, ciclamato e aspartame eram utilizados. Hoje, a Legislação Brasileira em vigor<sup>5</sup> aprova para uso em alimentos os edulcorantes naturais sorbitol, manitol, isomalte, esteviosídeo, maltitol, lactitol e xilitol, e os artificiais sacarina, ciclamato, aspartame, acessulfame-K e sucralose<sup>1</sup>.

Em função do maior número de edulcorantes disponíveis no mercado brasileiro e do fato de o uso isolado de cada um deles não proporcionar todas as características desejáveis, a indústria nacional tem utilizado em alimentos e bebidas diferentes combinações de edulcorantes. Nos últimos anos, formulações envolvendo 2 ou 3 edulcorantes, como por exemplo, sacarina, ciclamato e aspartame ou acessulfame-K e aspartame, têm sido encontradas em várias formulações.

O ciclamato de sódio (Figura 1) é aproximadamente 30-60 vezes mais doce que a sacarose e é extremamente estável em uma ampla faixa de pH e temperatura, assim como na presença de luz e oxigênio. Tanto o ácido ciclâmico quanto seus sais apresentam alta solubilidade em água e solubilidade bastante limitada em óleos, gorduras e solventes não polares, como benzeno, clorofórmio e éter.

A legislação nacional especifica limites máximos para o uso do ácido ciclâmico e de seus sais em várias categorias de alimentos e bebidas para fins especiais através da Resolução-RDC nº 3, 2001<sup>5</sup>, conforme apresentado na Tabela 1. Seu uso em adoçantes de mesa, entretanto, não é limitado, uma vez que estes produtos podem conter e serem formulados à base de edulcorantes naturais ou artificiais permitidos pela legislação<sup>6</sup>.

Os ciclamatos de sódio e de cálcio, assim como seu principal metabólito ciclohexilamina (CHA), foram previamente avaliados pelo JECFA (Joint Expert Committee on Food Additives) em 1967, 1970, 1976, 1977 e 1980. Em

1980, foi atribuída, em caráter temporário, uma Ingestão Diária Aceitável (IDA) de 0-4 mg/kg de peso corpóreo para o edulcorante e seus sais, tendo em vista os estudos toxicológicos disponíveis na época. Esta IDA foi posteriormente prorrogada, mediante requisição de novos estudos de reprodução e conversão. Em 1982, o caráter temporário foi retirado e o valor da IDA aumentado para 0-11 mg/kg peso corpóreo (para os sais de cálcio e sódio, expressos como ácido ciclâmico). Para o cálculo deste valor de IDA, o JECFA considerou o NOEL (No Observed Effect Level) de 100 mg/ kg peso corpóreo, relativo ao efeito de atrofia testicular em ratos, identificado para a CHA, e assumiu que 63% do ciclamato absorvidos estão disponíveis para a conversão a este metabólito, com taxa média de conversão de 30%<sup>2</sup>.

Ao longo de toda a sua história de uso como aditivos para alimentos, a sacarina e o ciclamato têm sido alvo de controvérsias quanto à sua segurança, uma vez que estudos toxicológicos efetuados no passado associaram estes edulcorantes com a ocorrência de tumores na bexiga urinária de roedores. Como conseqüência, existe uma preocupação pública constante com relação à ingestão desse e de outros edulcorantes, principalmente por grupos específicos da população como crianças, diabéticos e obesos.

Internacionalmente, recomenda-se que os países controlem a exposição de sua população a estes aditivos, através da realização periódica de estimativas de ingestão, de forma a assegurar ingestões dentro de valores considerados seguros. O presente estudo foi conduzido com o objetivo de analisar e quantificar os níveis de ciclamato em produtos dietéticos disponíveis comercialmente como adoçantes de mesa líquido, adoçantes em pó, refrigerantes *diet/light*, chás disponíveis comercialmente como adoçantes de mesa líquido, adoçantes em pó, refrigerantes *diet/light*, néctares *light*, preparado sólido para refresco *light* e iogurtes *light*, para então estimar a contribuição destes produtos como fonte de ciclamato na dieta.

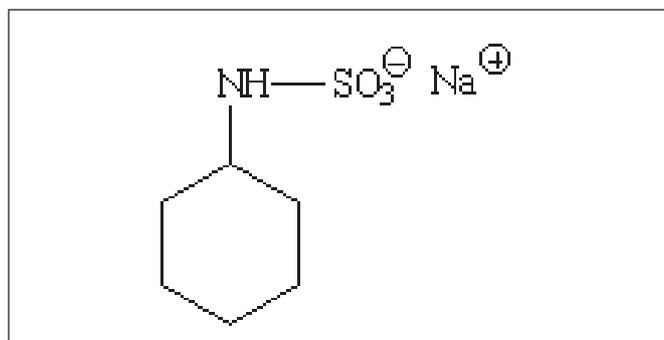


Figura 1. Estrutura química do ciclamato de sódio.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras

Dois lotes de cada um dos diferentes produtos abaixo relacionados foram adquiridos no comércio da cidade de Campinas, SP, no decorrer dos anos de 2003 e 2004, totalizando 58 amostras. Somente foram selecionados e analisados aqueles produtos em cujo rótulo estava declarada a presença do ciclamato. São eles:

- adoçante de mesa líquido (10 marcas);
- adoçante em pó (2 marcas);
- néctar de fruta *light* (manga e uva);
- preparado sólido para refresco *light* (limão);
- refrigerante *light* (cola, laranja e guaraná);
- refrigerante *diet* (guaraná, tônica, limão A e limão B);
- chá (mate limão *light*, mate *diet* e mate *light*);
- iogurte de morango *light* (4 marcas)

### Metodologia

O método utilizado para a determinação de ciclamato de sódio em diferentes matrizes foi aquele desenvolvido por Sjoberg e Alanko<sup>7</sup>, como descrito a seguir:

### Preparação das amostras

Pesou-se uma quantidade de amostra suficiente para conter 1-20 mg de ciclamato de sódio e transferiu-se para um funil de separação (A), adicionando-se a seguir 100 mL de água. No caso de refrigerantes, primeiramente a amostra foi degaseificada em banho de ultrassom por 15 minutos. A solução (A) foi acidificada com 10 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, agitando-se e resfriando-se a mesma. Adicionaram-se 100 mL de acetato de etila, agitou-se a mistura por 2 minutos e separou-se a fase orgânica da fase aquosa. Em seguida, tomou-se uma alíquota de 80 mL da fase de acetato de etila e transferiu-se para outro funil de separação (B). Extraiu-se com três porções de 30 mL de água e as fases aquosas foram combinadas em um outro funil de separação (C). Adicionaram-se 2 mL de NaOH 10M e 10 mL de ciclohexano e agitou-se o extrato por 1 minuto. A fase aquosa alcalina foi transferida para um funil de separação (D).

### Reação de derivação e determinação

No funil de separação (D), adicionaram-se 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O (3:7, v/v), 10 mL de ciclohexano e 10 mL de hipoclorito de sódio sucessivamente. Agitou-se a mistura por 2 minutos, escoando-se a fase aquosa e agitando-se a fase orgânica com 50 mL de NaOH 0,5M por 1 minuto. Em seguida, a fase aquosa alcalina foi escoada e a fase orgânica foi lavada com 50 mL de água, descartando-se a fase aquosa. O espectro da fase orgânica foi medido em um espectrofotômetro Varian, Modelo Cary 50, a 314 nm usando o ciclohexano como referência. Todas as amostras foram analisadas em duplicata.

### Quantificação e construção da curva de calibração

A quantificação de ciclamato de sódio foi feita através da curva de calibração, obtida a partir de uma solução estoque do padrão de ciclamato de sódio de 0,8 mg/ml. Para tanto, pipetaram-se 2,0; 5,0; 10; 15; 20 e 25 mL da solução mãe (contendo 1; 6; 4; 8; 12; 16 e 20 mg de ciclamato de sódio) em um balão volumétrico e completou-se com 100 mL de água. Cada uma dessas soluções foi transferida para um funil de separação e procedeu-se como descrito para as amostras começando-se na etapa "Acidificar a solução com 10 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado.....". As determinações foram feitas em duplicata e foram lidas em um espectrofotômetro UV a 314 nm. O limite de detecção (expresso como concentração) foi determinado de acordo com Miller & Miller<sup>8</sup>.

### Recuperação

Os testes de recuperação foram feitos adicionando-se quantidades conhecidas de ciclamato de sódio, em três diferentes concentrações (0,04, 0,08 e 0,12 mg/mL), em amostras selecionadas dentre os grupos de produtos avaliados (adoçante de mesa líquido, néctar de uva *light*, refrigerante de cola *light*, chá de limão *light* e iogurte de morango *light*). As análises das amostras fortificadas, assim como dos controles (branco), foram feitas em duplicata. As recuperações foram calculadas pela diferença entre os valores totais obtidos para o ciclamato de sódio nas amostras fortificadas e não fortificadas. Os resultados analíticos

**Tabela 1.** Níveis de ácido ciclâmico e seus sais de cálcio, potássio e sódio autorizados para uso em alimentos e bebidas no Brasil<sup>1</sup>.

Alimento/bebida	Limite Máximo g/100g ou g/100 mL
Alimentos e bebidas para controle de peso	0,13
Alimentos e bebidas para dietas com ingestão controlada de açúcares	0,13
Alimentos e bebidas para dietas com restrição de açúcares	0,13
Alimentos e bebidas com informação nutricional complementar	0,13
Alimentos e bebidas com reduzido teor de açúcares	0,097

<sup>1</sup> Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 3 de 2 de janeiro de 2001<sup>5</sup>.

reportados não foram corrigidos em função da porcentagem de recuperação.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a determinação de ciclamato de sódio nos produtos selecionados utilizou-se o método descrito por Sjoberg & Alanko<sup>7</sup>. De acordo com o procedimento original, a determinação de ciclamato de sódio foi feita por espectrofotometria de UV, após sua derivação a N,N-diclorociclohexilamina, uma vez que a molécula deste edulcorante não possui cromóforo e, portanto, não absorve na região do UV/visível. O derivado, quantitativamente formado pela adição de acetato de etila e hipoclorito de sódio ao extrato acidificado contendo o ciclamato, é então determinado espectrofotometricamente a 314 nm.

O procedimento de extração adotado mostrou-se satisfatório para a análise do ciclamato nas diferentes matrizes

selecionadas, não sendo necessário modificar qualquer etapa do procedimento original. Os valores médios de recuperação obtidos (Tabela 2) se situaram na faixa de 84 a 101%, com coeficiente de variação máximo de 7,4 %, dentro dos limites aceitos para análise de aditivos em níveis de mg<sup>9</sup>. O limite de detecção para o ciclamato foi de 0,02 mg/mL. Para algumas matrizes, como foi o caso do iogurte, a estimativa de desvio padrão em torno da média foi maior, o que representa uma maior variabilidade nos valores de recuperação obtidos nos níveis de fortificação utilizados.

Embora o método de Sjoberg & Alanko<sup>7</sup> tenha sido reprodutível, o tempo necessário para sua execução é relativamente longo, o que o torna inviável para análises em grande escala, sendo, no entanto, satisfatório para ser utilizado em análises de rotina em laboratórios de controle de qualidade.

As Tabelas 3, 4 e 5 apresentam os teores de ciclamato de sódio nos alimentos estudados. A concentração deste edulcorante nas diferentes amostras se situou na faixa de 64,9

**Tabela 2.** Recuperação do ciclamato em diferentes grupos de alimentos.

Produto	Recuperação <sup>1</sup> média (%)			Recuperação	CV (%) <sup>2</sup>
	Nível 1	Nível 2	Nível 3		
Adoçante de mesa líquido	99	100	105	101	3,1
Néctar <i>light</i> sabor uva	95	98	99	98	2,0
Mate limão <i>light</i>	85	82	84	84	2,1
Refrigerante de cola <i>light</i>	89	91	96	92	4,1
Iogurte de morango <i>light</i>	72	83	76	77	7,4

<sup>1</sup> Nível 1: 0,04 mg/mL; Nível 2: 0,08 mg/mL; Nível 3: 0,12 mg/mL

<sup>2</sup> CV: Coeficiente de Variação

**Tabela 3.** Níveis médios de ciclamato de sódio em adoçantes de mesa e adoçantes em pó.

Produto/marca	Valor determinado (mg/mL) <sup>1</sup>	Valor nominal (mg/mL)
<b>Adoçantes de mesa líquido</b>		
A	78,4	83,0
B	78,5	-
C	64,9	-
D	95,0	-
E	82,4	-
F	89,3	83,0
G	70,9	-
H	80,2	-
I	91,6	-
J	85,2	-
<b>Adoçantes em pó</b>		
K	94,37	-
L	79,00	-

<sup>1</sup> média de 2 determinações

-: não declarado

**Tabela 4.** Níveis médios de ciclamato de sódio em bebidas não alcoólicas.

Produto/marca (mg/100mL) <sup>1</sup>	Valor determinado	Valor nominal (mg/100mL)
<b>Refrigerantes Light</b>		
Cola	75,1	69,7
Laranja	73,5	64,0
Guaraná	36,1	31,0
<b>Refrigerantes Diet</b>		
Guaraná	38,5	32,0
Tônica	69,0	55,0
Limão A	101,1	107,0
Limão B	60,5	69,7
<b>Chás</b>		
Mate limão <i>light</i>	29,4	23,0
Mate <i>diet</i>	54,0	50,0
Mate <i>Light</i>	22,7	25,0
<b>Néctar de fruta light</b>		
Manga	105,0	96,0
Uva	83,6	96,0
<b>Preparado sólido para refresco light</b>		
Limão	28,2	22,0

<sup>1</sup> média de 2 determinações

**Tabela 5.** Níveis médios de ciclamato de sódio em iogurtes de morango *light*.

Produto/marca	Valor determinado (mg/100mL) <sup>1</sup>	Valor nominal (mg/100mL)
A	95,5	-
B	122,5	-
C	83,6	-
D	101,2	-

<sup>1</sup> média de 2 determinações

-: não declarado

a 95,0 mg/mL em adoçantes de mesa líquido, 79,0 a 94,4 mg/g em adoçantes em pó, 36,1 a 101,0 mg/100mL em refrigerantes *diet/light*, 22,7 a 54,0 mg/100mL em chás *diet/light*, 83,6 a 105,0 mg/100mL em néctares *light* e de 83,6 a 122,5 mg/100mL em iogurtes *light* de morango. Em uma única marca de preparado sólido para refresco *light* analisada, a quantidade média encontrada para o edulcorante foi de 28,2 mg/100 mL.

Como pode ser observado, houve variação nas quantidades de ciclamato de sódio entre amostras de diferentes marcas para um mesmo produto. As diferenças apresentadas se devem ao fato de que em função do maior número de edulcorantes disponíveis hoje no mercado brasileiro, a indústria nacional tem utilizado em alimentos e bebidas diferentes combinações desses edulcorantes.

Em função de alguns produtos declararem no rótulo a quantidade de ciclamato adicionada, foi possível

correlacionar essas quantidades àsquelas determinadas analiticamente. Tal comparação permitiu observar que existe uma boa correlação entre os dados analíticos e os valores nominais das embalagens.

## CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo indicam que a quantidade de ciclamato presente nos alimentos e bebidas de baixa caloria analisados atende ao limite máximo estabelecido pela legislação vigente. Estas informações, juntamente com o levantamento de dados de consumo dos alimentos em questão serão utilizadas para estimar a ingestão de ciclamato de sódio pela população de Campinas, SP e avaliar a contribuição destes alimentos como fonte deste edulcorante na dieta.

## AGRADECIMENTOS

À FAPESP, pela concessão de auxílio financeiro à pesquisa, Processo 02/05471-7.

## REFERÊNCIAS

1. Henin N. Intake of sweeteners, physiological and nutritional aspects. *Int Sugar J*. 2001; 103: 346-51.
2. Toledo MCF. Aditivos Alimentares. In: Oga S, editor. *Fundamentos de Toxicologia*. São Paulo: Ed Atheneu; 1996. p.405-39.
3. Bopp BA, Price P. Cyclamate. In: Nabors LOB, editor. *Alternative Sweeteners* 3<sup>rd</sup> ed. New York: Marcel Dekker Inc.; 2001. p.63-85.
4. Miller WT. The legacy of cyclamate. *Food Technol*. 1987; 41:116.
5. Brasil. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 3, de 2 de jan. 2001 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, Poder Executivo, DF, 3 jan 2001.
6. Brasil. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 271, de 22 de set. 2005 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 set. 2005.
7. Sjöberg AMK, Alanko TA. Spectrophotometric determination of cyclamate in foods: Nordic Committee on Food Analysis Collaborative Study. *J Assoc Off Ana Chem*, 1987; 70: 588-90.
8. Miller JC, Miller JN. *Statistics for Analytical Chemistry*. 3<sup>rd</sup> ed. Chicago (IL): Ellis Horwood Limited Publishers; 1993. p. 101-39.
9. Horwitz W, Laverne RK; Boyer KW. Quality Assurance in the analyses of foods for trace constituents. *J Assoc Anal Chem*, 1980; 63: 1344-54, 1980.

# Monitoramento da qualidade da água de poços rasos de escolas públicas da zona rural do Município de Ibiúna/SP: parâmetros microbiológicos, físico- químicos e fatores de risco ambiental

Monitoring the quality of water from groundwater located in the rural public schools of the Ibiúna municipality/SP: microbiological and physicochemical parameters, and factors for environmental risk

RIALA6/1073

Francisco R. M. SOTO<sup>\*1</sup>, Yara S. K. FONSECA<sup>2</sup>, Marcia R. RISSETO<sup>1</sup>, Sérgio Santos de AZEVEDO<sup>3</sup>, Maria de Lourdes B. ARINI<sup>2</sup>, Maria Aparecida RIBAS<sup>4</sup>, Cristiane R. V. MOURA<sup>4</sup>, Daniel S. MARCHETTE<sup>5</sup>.

\* Endereço para correspondência: <sup>1</sup> Divisão de Vigilância Sanitária Municipal do Centro de Vigilância Sanitária e Controle de Zoonoses “ Tereza Rodrigues de Camargo ”- Ibiúna – SP. Caixa Postal 34, Ibiúna – SP CEP 18150-000, Fone (15) 32942223- 32481880, chicosoto@ig.com.br

<sup>2</sup> Instituto Adolfo Lutz de Sorocaba , Sorocaba, SP.

<sup>3</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

<sup>4</sup> Secretária Municipal do Meio Ambiente- Ibiúna- SP.

<sup>5</sup> Universidade de Campinas/ Conselho Regional de Química IV.

Recebido: 09/06/2006 – Aceito para publicação: 12/09/2006

## RESUMO

Este trabalho teve por objetivo realizar um diagnóstico da qualidade da água de poços rasos em relação aos parâmetros microbiológico e físico-químico em 50 escolas da rede pública do Município de Ibiúna-SP. Como objetivo secundário, fazer um levantamento dos fatores de risco ambiental de contaminação desta água, e propor medidas de intervenção. Este estudo foi desenvolvido em três etapas: levantamento de fatores de risco, análise microbiológica e físico- química da água. Os resultados revelaram elevada contaminação com níveis acima de 100 UFC (unidades formadoras de colônias) para coliformes totais em 90%, e termotolerantes em 82% das amostras analisadas ( $p < 0,001$ ). Quanto aos parâmetros físico-químicos, foi identificada alteração de aspecto, cor, turbidez e ferro, em três, quatro e uma das amostras analisadas, respectivamente. Quanto aos fatores de risco, os mais representativos neste trabalho foram manutenção dos poços, informação sobre a qualidade da água e seu tratamento ( $p < 0,001$ ).

**Palavras-Chave.** água, escola, fatores de risco, coliformes, indicadores da qualidade da água.

## ABSTRACT

The aim of this study was to assess the quality of water from groundwater located in 50 public schools of the Ibiúna municipality, state of São Paulo, regarding to microbiological and physicochemical parameters. Secondly, the study aimed to investigate on risk factors for environmental contamination, and to propose the intervention measures. This study was carried out in three stages: assessment of risk factors, water microbiological and physicochemical analyses. High contamination with total coliforms at levels above 100 colony forming units(CFU) was revealed in 90% of water samples, and termotolerants in 82% of analyzed specimens ( $p < 0.001$ ). Regarding to physicochemical parameters, alterations in the aspect, color, turbidity, and iron content were revealed in three, four, and one samples, respectively. Concerning the risk factors, the most representative were of groundwater safe-keeping, information about water quality, and your treatment ( $p < 0.001$ ).

**Key Words.** water, schools, risk factors, coliforms, water quality indicators.

## INTRODUÇÃO

Com o processo de urbanização acelerada a partir da segunda metade do século XX, a tal ponto que mais da metade da população mundial vive atualmente em aglomerações urbanas, técnicas foram sendo desenvolvidas de modo que é possível o fornecimento de água potável em grandes volumes para atender a milhões de habitantes que se concentram nas médias e grandes cidades espalhadas por todo o globo terrestre. No entanto, a água potável não está atualmente disponível para todas as pessoas em muitas sociedades. De fato, os países do mundo desenvolvido conseguem atender, na maioria das vezes e de forma universal, às necessidades de suas populações por meio de sistemas coletivos de distribuição que caracterizam um acesso adequado à água potável para todos. Ao contrário, os demais países apresentam parcelas significativas de suas populações urbanas e rurais sem ter acesso ou com um acesso precário à água potável<sup>1</sup>.

Água potável pode ser definida como água para consumo humano cujos parâmetros microbiológicos, físico-químicos e radioativos atendam ao padrão de potabilidade e que não ofereça risco à saúde<sup>2</sup>. A importância desta definição reveste-se pelo fato que a água pode ser um importante veiculador de doenças de causa infecciosa ou não, prejudicando direta e indiretamente a qualidade de vida das pessoas<sup>3</sup>.

Os problemas decorrentes de tal situação se refletem na persistência de doenças de veiculação hídrica que poderiam ser evitadas, caso houvesse um suprimento de água potável, condição indispensável para uma qualidade de vida razoável. Com efeito, por ser um bem de primeira necessidade, a água é utilizada, cotidianamente, para o preparo de alimentos, saciar a sede, higiene e asseio corporal, limpeza de utensílios domésticos e da habitação, banho e descarga de vasos sanitários, dentre outros usos importantes. A inexistência de água potável em quantidade suficiente compromete seu uso cotidiano, podendo expor as pessoas a riscos de doenças, como também, limitar a qualidade de vida das pessoas<sup>1</sup>.

Indubitavelmente, esta situação gera problemas de saúde pública, como a elevação da mortalidade infantil em uma determinada localidade e outros agravos relacionados à qualidade microbiológica da água como diarreias de origem bacteriana, sendo a colibacilose provocada pela *E. coli* como uma das mais importantes, a rotavirose e a hepatite provocada por vírus e principalmente as verminoses intestinais<sup>3</sup>. Somem-se a este quadro, os parâmetros físico-químicos, muitas vezes alterados e relacionados a fatores de risco como: presença de contaminantes, localização e conservação inadequada dos poços<sup>4</sup>. As condições higiênico-sanitárias e conservação dos reservatórios são indispensáveis e assumem papel importante na contaminação ou recontaminação da água<sup>5</sup>.

O risco de ocorrência de surtos de doenças de veiculação hídrica no meio rural é elevado, no Município de Ibiúna, mais de 50% dos casos de diarreias, hepatites e verminoses em crianças estão relacionados com a água de poço<sup>6</sup>, principalmente em

função da possibilidade de contaminação bacteriana de águas muitas vezes captadas em poços com longo tempo de uso, inadequadamente vedados, construídos próximos de áreas contaminadas, como fossas e áreas de pastagem<sup>7</sup>. O uso de água subterrânea contaminada não tratada adequadamente foi responsável por 44% dos surtos de doenças de veiculação hídrica nos Estados Unidos, entre 1981 e 1988<sup>8</sup>. No Brasil, Estado de São Paulo, segundo dados do Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE/SP) no ano de 2003, quase 100.000 pessoas estiveram envolvidas em 24 surtos de intoxicação alimentar em que a água contaminada foi a responsável. Nestes, mais de 50% dos surtos foi oriunda de água de poço de escolas<sup>9</sup>. O Município de Ibiúna, localizado no Estado de São Paulo, enfrenta este tipo de problema, com extensa área rural, onde a maioria da população incluindo as crianças que freqüentam as escolas municipais localizadas nestas regiões, se abastecem de águas de poços rasos. A qualidade microbiológica e físico-química destas águas não têm sido avaliadas bem como a realização do seu tratamento com cloro e flúor por órgãos oficiais. A ausência deste monitoramento, não desencadeia ações corretivas da qualidade da água pelos órgãos oficiais, podendo ocorrer surtos de intoxicação alimentar de veiculação hídrica principalmente nas crianças que consomem esta água, prejudicando os indicadores de saúde do município como morbidade e mortalidade infantil. Os objetivos do trabalho foram: realizar um diagnóstico físico-químico para os parâmetros: aspecto, cor, odor, turbidez, pH, dureza, nitratos, nitritos, ferro, flúor, cloretos e microbiológico (quantificação de coliformes totais termotolerantes) da água de poços rasos em todas as escolas da rede pública do Município de Ibiúna, SP, que utilizam este sistema; avaliar e associar fatores de risco de contaminação ambiental desta água e com base nos resultados obtidos, propor medidas de intervenção e/ou correção amparadas em ações de saneamento a serem desenvolvidas por órgãos responsáveis pelo abastecimento da água do município, como empresas públicas ou privadas que abastecem a população, além disso, indicar parâmetros capazes de definir e desenvolver ações educativas pela vigilância sanitária municipal amparadas tecnicamente com os resultados laboratoriais obtidos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi realizada no período de 10 de janeiro a 10 de novembro de 2005, em 50 escolas da rede pública que utilizam água de poço como sistema alternativo de abastecimento, sendo dividida em:

### **Levantamento de fatores de risco de contaminação da água dos poços**

Teve como base o roteiro de inspeção da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do Ministério da Saúde<sup>10</sup>. Foram analisados sete possíveis fatores de risco: (a) focos de contaminação no entorno de 15 metros, como criação de animais; (b) tipo de proteção do poço contra agentes contaminantes na

sua entrada; (c) área de alagamento próxima ao poço; (d) nível de lençol freático de três metros da boca do poço; (e) necessidade de manutenção da estrutura de extração de água; (f) informações sobre a qualidade da água (físico- química e microbiológica); e (g) tratamento da água para deixá-la potável. Estes dados foram levantados através da aplicação de questionário com questões fechadas realizado pelo setor de engenharia da Prefeitura do Município de Ibiúna - SP em todas as escolas, sendo entrevistadas 50 diretoras das escolas, bem como avaliação dos fatores de risco realizado pelo entrevistador nos locais. O método de validação das respostas do questionário foi realizado através de análise de frequência simples e apresentadas na forma de proporção.

#### Coleta de amostras

Foram coletadas 100 amostras de água em 50 escolas públicas zona rural no Município de Ibiúna, sendo 50 amostras para análise microbiológica e 50 para análise físico-química. As coletas foram efetuadas por técnicos da Vigilância Sanitária do Município de Ibiúna, em sacos plásticos estéreis de 200 ml para o ensaio microbiológico e físico-químico, acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo e transportadas no mesmo dia para o Instituto Adolfo Lutz de Sorocaba - SP.

#### Exame microbiológico

Foi realizado segundo o método nº 9222-B-9-54 da Técnica de Filtração em Membrana, recomendado pelo "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater"<sup>11</sup>. O meio de cultura utilizado foi o M-Endo Ágar, incubado a 35 °C por 24 horas. As amostras positivas foram confirmadas utilizando-se o Caldo Bile Verde Brilhante para coliformes totais (35 °C por 48 horas) e o Caldo EC para coliformes termotolerantes (44,5 °C por 24 horas). O resultado foi reportado como uma contagem direta do número de colônias/100 ml da amostra no meio Endo.

#### Exame físico químico

Na análise físico-química, foram pesquisados parâmetros de aceitação para o consumo humano: cloreto, cor aparente, dureza, ferro, sólidos totais dissolvidos e turbidez. Também foram pesquisados parâmetros que representavam risco à saúde como: fluoreto, nitrato e nitrito (como Nitrogênio). A metodologia utilizada foi a preconizada pelo Standard Methods<sup>12</sup> e pelas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz<sup>13</sup>.

#### Análise dos dados

O tratamento dos resultados laboratoriais foi realizado através de análise de frequência simples e apresentadas na forma de proporção. Para a comparação das frequências relativas complementares dos parâmetros analisados, foi utilizado o teste binomial<sup>14</sup>, com o programa SPSS for Windows versão 13.0.

### RESULTADOS

Os resultados das análises microbiológicas, físico-química e das condições de fatores de risco, revelaram níveis acima de 100 UFC (unidades formadoras de colônias) para cada 100 ml de água, sendo coliformes totais em 90 %, termotolerantes em 82% das amostras analisadas, com significância e associação estatística ( $p < 0,001$ ) com os fatores de risco: tratamento e informação da qualidade microbiológica e físico-química da água, conforme as Tabelas de 1 a 3. Na Tabela 2, sobre os parâmetros físico- químicos analisados, destaque para o flúor, que esteve em desacordo em 100% das amostras. Em nível secundário para outros parâmetros, como aspecto e a cor, em 6%, turbidez em 8%, e nível de ferro de 2%, do total das amostras analisadas estiveram em desacordo. Para os fatores de risco de contaminação ambiental, apresentados na Tabela 3, os itens manutenção, informações sobre a qualidade da água e seu tratamento foram os mais importantes, com frequência de amostras insatisfatórias de 40, 100 e 100% respectivamente.

### DISCUSSÃO

Com base nos resultados microbiológicos obtidos, detectou-se níveis acima de 100 UFC (unidades formadoras de colônias) da água para coliformes totais (90%), e termotolerantes (82%), nos poços analisados. Resultados iguais foram encontrados também por Amaral et al.<sup>15</sup>, em amostras de águas de poços de propriedades rurais da região Nordeste do Estado de São Paulo. Aguila et al.<sup>16</sup>, avaliando também a qualidade microbiológica da água de poços do Município de Nova Iguaçu, Estado do Rio de Janeiro, encontraram um nível de contaminação por coliformes totais e fecais próximos a 100% nas amostras processadas, onde fatores de risco ambientais como tratamento da água e manutenção dos poços, semelhantes a este estudo, também estavam presentes e houve associação com a contaminação bacteriana das amostras processadas. Estes números são preocupantes para a saúde pública, e exigem uma

**Tabela 1.** Resultados obtidos na pesquisa de coliformes totais e termotolerantes e a análise estatística realizada, em 50 amostras de água coletadas nas escolas municipais do Município de Ibiúna, SP, com amostragem no cavalete do poço.

Pesquisa para coliformes	Nº de amostras	Presença de coliformes	% de presença	p
Coliformes totais	50	45	90	<0,001
Termotolerantes	50	41	82	<0,001

pronta intervenção dos órgãos públicos. Ação esta que foi iniciada após os resultados laboratoriais, com a instalação de sistemas alternativos de cloração, fluoretação e educação em saúde em todas as escolas públicas que participaram deste estudo, para a eliminação dos fatores de risco ambientais. Destaca-se nas intervenções realizadas de desinfecção da água dos poços, que o cloro residual e subprodutos da cloração também podem ser prejudiciais à saúde, de modo que a preocupação com a remoção destes compostos por filtração em filtros contendo carvão ativo foi recomendada pela vigilância sanitária municipal e realizada pela empresa executora. Estas medidas foram acompanhadas pela vigilância sanitária municipal que realizou exames laboratoriais para avaliação da potabilidade da água após as intervenções, a manutenção dos poços também foi efetuada, eliminando-se assim, os três fatores de risco mais importantes neste estudo: manutenção, informação da qualidade

microbiológica e físico química e tratamento com cloro e flúor, conferindo potabilidade à água dos poços das escolas. A água para consumo humano é um dos importantes veículos de doenças diarreicas de natureza infecciosa, principalmente bactérias da espécie *E. coli*, o que torna primordial o seu tratamento<sup>17</sup>. Some-se a este quadro, que a *E. coli* constitui a causa mais comum de infecção das vias urinárias, sendo responsável por cerca de 90% das primeiras infecções urinárias em mulheres jovens<sup>18</sup>. Nanan et. al<sup>19</sup> relataram que houve uma queda drástica de casos de diarreias em crianças no norte do Paquistão quando ações de desinfecção da água de consumo foram implantadas naquele país. O desenvolvimento sócio-econômico de um país depende muito da qualidade da água que a população consome<sup>20</sup>. Esta foi também a conclusão de Gazzinelli e et al<sup>21</sup>, que relacionou fonte de água, condições sanitárias e a ocorrência de doenças transmitidas pela água.

**Tabela 2.** Resultados obtidos para parâmetros físico-químicos e a análise estatística realizada em 50 amostras coletadas nas escolas do Município de Ibiúna, SP, com amostragem no cavalete do poço.

Parâmetros analisados	Amostras de água / legislação vigente*				p
	Insatisfatórias		Satisfatórias		
	N	%	N	%	
Aspecto	3	6	47	94	<0,001
Cor aparente	3	6	47	94	<0,001
Odor	0	0	50	100	<0,001
Turbidez	4	8	46	92	<0,001
pH	0	0	50	100	<0,001
Dureza	0	0	50	100	<0,001
Nitritos	0	0	50	100	<0,001
Nitratos	0	0	50	100	<0,001
Ferro	1	2	49	98	<0,001
Flúor	50	100	0	0	<0,001
Cloretos	0	0	50	100	<0,001

\* Portaria 518 de 25/03/2004, Ministério da Saúde, onde: N°- número, % percentagem.

**Tabela 3.** Resultados obtidos na avaliação dos fatores de risco de contaminação da água e a análise estatística realizada em 50 escolas do Município de Ibiúna, SP.

Parâmetros analisados	Legislação vigente*				p
	Insatisfatórias		Satisfatórias		
	N	%	N	%	
Focos de contaminação	48	96	2	4	<0,001
Proteção do poço	47	94	3	6	<0,001
Área de alagamento	48	96	2	4	<0,001
Nível de lençol de água	47	94	3	6	<0,001
Manutenção	30	60	20	40	0,203
Informações sobre a qualidade microbiológica e físico química da água	0	0	50	100	<0,001
Tratamento sanitário da água	0	0	50	100	<0,001

\* Portaria 518 de 25/03/2004, Ministério da Saúde

Em relação aos parâmetros físico-químicos analisados, 100% das amostras não atenderam o padrão para o flúor<sup>2</sup>. Três amostras de água (6%) apresentaram parâmetros alterados em relação ao aspecto e cor aparente. Ocorrência de turbidez também foi detectada como fora do padrão em quatro amostras (8%).

Em relação à análise de nitritos e nitratos nas amostras de água, utilizados como indicadores de contaminação antrópica, os resultados laboratoriais apresentaram apenas quatro amostras com níveis de nitrato próximos ao limite máximo permitido pela legislação<sup>20</sup>. Mesmo de acordo com a legislação, estes parâmetros são dinâmicos<sup>22</sup>, e exigem intervenções, sendo esta uma limitação do estudo. Nitratos e nitritos estão associados com presença de matéria orgânica no lençol freático, principalmente originária de fossas sépticas e criações de animais. Em relação ao nitrato, há interesse na saúde pública preventiva em fazer o monitoramento, pois ele é um dos mais frequentes contaminantes de águas subterrâneas em áreas rurais. Quando presente em níveis excessivos na água para consumo humano, pode provocar metahemoglobinemia, conhecida popularmente como a doença dos bebês azuis (cianose). Esta é uma enfermidade causada pela excessiva conversão da hemoglobina a metahemoglobina, a qual é incapaz de transportar oxigênio. A metahemoglobina se forma quando a molécula de hemoglobina oxida o Fe<sup>2+</sup> (estado ferroso) da molécula heme a Fe<sup>3+</sup> (estado férrico)<sup>23</sup>. Níveis elevados de nitrato também indicam a possível presença de outros contaminantes procedentes de residências como detritos de esgoto doméstico ou de resíduos de agricultura como defensivos agrícolas ou fertilizantes. Quanto ao flúor, somente uma amostra apresentou resultado acima do limite permitido pela legislação<sup>2</sup>, que é 1,5 mg/L, e as demais apresentaram, níveis próximos de zero. Esta informação desencadeia duas ações importantes a serem desenvolvidas: a primeira é a necessidade de fluoretação no sistema alternativo de tratamento da água dos poços, objetivo primário de prevenção da cárie dentária nas crianças. Entretanto, ainda que sejam conhecidos os benefícios da adição do flúor às águas como medida de promoção à saúde e prevenção da cárie dental, muitas são as cidades brasileiras que não dispõem desse processo ou não possuem uma política de vigilância sanitária que controle de forma satisfatória a sua execução<sup>24</sup>. A segunda ação importante refere-se ao excesso deste elemento em apenas uma amostra, mostrando que o flúor, pode ocorrer em lençóis freáticos em níveis elevados. Visto que o principal objetivo da utilização do flúor é exercer o maior impacto possível na prevenção e controle de cáries, sem, contudo, aumentar a prevalência de fluorose dental<sup>25</sup>. A criação de mecanismos visando controlar a concentração de flúor é fundamental para a melhoria da qualidade da água a ser fornecida à população, sendo, portanto, indispensável a ação correta do seu tratamento e fluoretação.<sup>26,27,28</sup> Cabe as empresas públicas e ou privadas de abastecimento de água nos municípios, o seu suprimento com níveis adequados de flúor, seja pela rede pública, atingindo os bairros da zona rural ou por sistemas alternativos de cloração e fluoretação monitorados pela vigilância sanitária, medida esta desenvolvida nas escolas públicas da zona rural do

Município de Ibiúna.

Em relação aos níveis de ferro, em apenas uma amostra este elemento foi encontrado na concentração de 1,71 mg/L, valor este, acima do limite máximo permitido pela legislação<sup>2</sup>, indicando a necessidade de correção. Há de se considerar também que em mais quatro amostras, os níveis aceitáveis de ferro estavam muito próximos ao limite permitido que é de 0,3mg/L. Estes resultados reforçam a necessidade do monitoramento laboratorial, assim como dos demais parâmetros analisados, pois níveis elevados de alguns elementos químicos na água podem desencadear quadros de intoxicação e doenças degenerativas, comprometendo a saúde da população<sup>23</sup>. Esta foi também a conclusão de Soto e et al<sup>5</sup>, em um trabalho sobre a qualidade microbiológica da água conduzido no Município de Ibiúna-SP em 2004, onde mostrou a necessidade do constante monitoramento microbiológico tanto de águas de sistema de abastecimento alternativo como de rede pública, que muitas vezes não atendem a legislação<sup>2</sup>.

Outros parâmetros analisados, como odor, pH, dureza e cloretos, na sua totalidade, estiveram dentro dos níveis aceitáveis pela legislação<sup>2</sup>.

Com relação aos fatores de riscos estudados e analisados, destacaram-se os itens manutenção dos poços, onde 40% destes apresentaram-se insatisfatórios por ter contaminação bacteriana, níveis de nitrato próximos ao limite máximo permitido<sup>2</sup>, informação da qualidade microbiológica e físico química da água e seu controle de qualidade que estiveram associados com a contaminação bacteriana analisada ( $p < 0,001$ ). Informações constantes tornam-se necessárias e fundamentais neste processo, assim como ações voltadas principalmente para a educação em saúde. Há necessidade de um trabalho interativo de educação sanitária e ambiental, aliado à divulgação de medidas básicas de higiene pessoal, doméstica e comunitária que contribuam para redução e prevenção de doenças por intervenções de saneamento<sup>29</sup>. Este deve fazer parte de um programa constante de monitoramento da qualidade da água de poços das escolas, realizado pela vigilância sanitária municipal integrado com outros setores da prefeitura como o do meio ambiente, obras, desenvolvimento urbano e rural, com análises laboratoriais periódicas completas, acompanhamento de medidas de saneamento, educação em saúde de forma continuada, e avaliação dos resultados obtidos para a saúde da população atendida.

A Tabela 3 relaciona outros fatores de risco presentes nas escolas como: focos de contaminação, proteção da boca do poço, área de alagamento e nível de lençol freático, que estiveram também associados aos principais responsáveis pela ocorrência de coliformes totais e termotolerantes ( $p < 0,001$ ) e teores de nitrato próximos ao limite máximo permitido.

## CONCLUSÕES

Houve contaminação com níveis acima de 100 UFC (unidades formadoras de colônias) da água para coliformes totais

(90%), e termotolerantes (82%), nos 50 poços das escolas analisados;

Em relação aos parâmetros físico-químicos analisados, quase a totalidade das amostras estiveram dentro dos limites permitidos pela legislação vigente, com exceção do flúor;

Sobre os fatores de riscos ambientais estudados e analisados, os mais importantes foram: informação sobre a qualidade microbiológica e físico-química da água e seu tratamento para deixá-la potável associado estatisticamente com presença de coliformes totais e termotolerantes ( $p < 0,001$ );

O diagnóstico microbiológico, físico químico e de fatores de risco ambientais ( $p < 0,001$ ) permitiu a pronta intervenção por parte dos órgãos públicos, com ações de cloração e fluoretação da água, educação em saúde de forma continuada com toda a população, e eliminação dos fatores de risco encontrados, que foi realizada após os resultados obtidos neste trabalho.

Todas as ações que envolvem saneamento da água de poços devem ser ampliadas para todo o Município de Ibiúna, principalmente na zona rural, onde o acesso à água potável pela população ocorre com maior dificuldade, e é um desafio para as administrações públicas.

#### AGRADECIMENTOS

Agradecemos colaboração dos engenheiros: Celso Tinen, Celso Duarte dos Santos e Kengi Yoshida; aos técnicos do laboratório de microbiologia e bromatologia do Instituto Adolfo Lutz Sorocaba-SP e aos funcionários do Centro de Vigilância Sanitária e Controle de Zoonoses “Tereza Rodrigues de Camargo”- Ibiúna- SP.

#### REFERÊNCIAS

1. Pontes CAA, Schramm FR. Bioética da proteção e papel do Estado: problemas morais no acesso desigual à água potável. *Cad Saúde Pública*, 2004; 20:5:1319-27.
2. Portaria 518 de 25/03/2004, Ministério da Saúde.
3. Riedal G, Controle Sanitário dos Alimentos. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 1992
4. Pedley HG, Barrett S, Nalubega M, Johalk MK. Risk factors contributing to microbiological contamination of shallow groundwater in Kampala, Uganda. *Water Res*, 2003 Aug. 37(14): 3421-9.
5. Soto FRMS, Fonseca YSK, Antunes DV, Risetto, MR, Amaku M, Arini, MLB. Avaliação microbiológica da água de abastecimento público em escolas no município de Ibiúna - SP: estudo comparativo da qualidade da água no cavalete e pós-cavalete. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2005, 64(1):128-31.
6. Vigilância Epidemiológica Municipal, Ibiúna, SP, Estatísticas, 2006.
7. Stukel TA, Greenberg ER, Dain BJ, Reed FC, Jacobs NJ. A longitudinal study of rainfall and coliform contamination in small community drinking water supplies. *Environ Sci Technol*. 1990;24:571-5.
8. Craun GF. Causes of waterborne diseases in the United States. *Water Sci Technol*. 1991; 24:17-20.
9. Centro de Vigilância Epidemiológica, CVE, SP, Estatísticas de doenças e surtos de veiculação hídrica no ano de 2003, 2006.
10. Roteiro de Inspeção em Vigilância Sanitária, Secretaria de Vigilância em Saúde- SVS, Ministério da Saúde
11. American Public Health Association- Apha. Standard Methods for the Examination of Water and Wasterwater. 20<sup>th</sup> ed. 1998.
12. American Public Health Association (APHA) Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 19<sup>th</sup>, Ed. Washington, 1995.
13. Instituto Adolfo Lutz, Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos, 3<sup>a</sup> ed São Paulo, 1985.
14. Zar JH, Bistatistical analysis. 4. ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 1999, 663 p.
15. Amaral LA, Filho AN, Rossi Júnior OD, Ferreira FLA, Barros LSSB. Água de consumo humano como fator de risco à saúde em propriedades rurais. *Ver Saúde Pública*. 2003;37:4.
16. Aguila, PS, Roque OCC, Miranda CAS, Ferreira AP. Avaliação da qualidade de água para abastecimento público do Município de Nova Iguaçu. *Cad Saúde Pública*. 2000; 16(3):791-98.
17. Isaac- Marquez AP, Lesava Davila CM, Kupech RP, Tamay Segovia P. Calidad sanitaria de los seministros de água para consumo humano em Campeche, *Salud Publica Méx*. 1994; 36:655-61.
18. Brooks GF, Butel JS, Morse AS. *Microbiologia médica*. 20<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. 175-84.
19. Nanan D, White F, Azam I, Afsar H, Hozhabri S. Evaluation of water, sanitation, and hygiene education intervention on diarrhoea in northern Pakistan. *Bull World Health Organization*. 2003;81:160-5.
20. Adriaens P, Goovaerts P, Skerlos S, Edwards E, Egli T. Intelligent infrastructure for sustainable potable water: a round for emerging transnational research and technology development needs. *Biotechnol Adv*. 2003; 22:119-34.
21. Gazzinelli, A. Souza MCC, Nascimento, I. Utilização doméstica de água em comunidade rural de Minas Gerais e sua relação com fatores sócio econômicos. *Cad. Saúde Pública*. 1998; 14(2):265-77.
22. Spalding RF, Exner, ME. Occurrence of Nitrate in Groundwater-A Review *Journal of Environmental Quality JEVQAA*, 1993, 22:3, 392-402.
23. Mídio AF, Martins DI. *Toxicologia de Alimentos*, Varela Editora e Livraria Ltda, São Paulo 2000, p. 49.
24. Calvo MCM, 1996. Situação da Fluoretação de Águas de Abastecimento Público no Estado de São Paulo – Brasil. São Paulo. Dissertação de Mestrado, São Paulo: Departamento de Prática de Saúde Pública, Universidade de São Paulo.
25. Clarkson JJ, Barmes D, Hardwick K, Richardson LM. International Collaborative Research on Fluoride. *J Dental Res*. 2000; 79:893-904.
26. Maia LC, Valença AM, Soares EL. et al. Controle operacional da fluoretação da água de Niterói, Rio de Janeiro, Brasil. *Cad Saúde Pública*. 2003; 19(1):61-7.
27. Cury JA. Fluoretação da água: Benefícios, riscos e sugestões. *Revista de Odontologia do Brasil Central*. 1992; 2:32-3.
28. Narvai, PC. 2001. *Vigilância Sanitária da Fluoretação das Águas de Abastecimento Público no Município de São Paulo, Brasil, no Período 1990-1999. Tese de Livre Docência*. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo.
29. Sá, LLC. Jesus IM. Santos ECO et. al. Qualidade microbiológica da água para consumo humano em duas áreas contempladas com intervenções de saneamento- Belém do Pará, Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 2005; 14(3): 171-180.

# Susceptibilidade antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp. isoladas de alimentos envolvidos em surtos de doenças bacterianas transmitidas por alimentos, ocorridos na região noroeste do Estado de São Paulo, no período de abril de 1990 a dezembro de 2003

Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. strains isolated from foods involved in foodborne bacterial disease outbreaks in the north-western region of the State of São Paulo, Brazil, during the period from April 1990 to December 2003

RIALA6/1074

Jacqueline Tanury Macruz PERESI<sup>1,2\*</sup>, Ivete Aparecida Zago Castanheira de ALMEIDA<sup>1</sup>, Elisabete Alves CARDIGA<sup>1</sup>, Denise Fusco MARQUES<sup>1</sup>, Fátima Aparecida CARNICEL<sup>2</sup>, Fernando Leite HOFFMANN<sup>3</sup>

\* Endereço para correspondência: Rua Alberto Sufredine Bertoni n°. 2325, São José do Rio Preto, São Paulo, CEP 15060 - 020.

<sup>1</sup> Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Regional de São José do Rio Preto, SP.

<sup>2</sup> Universidade Estadual Paulista, UNESP, São José do Rio Preto, SP.

<sup>3</sup> Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos - Universidade Estadual Paulista, - UNESP, São José do Rio Preto - SP.

Recebido: 06/04/2006 – Aceito para publicação: 31/08/2006

## RESUMO

Na década de 1990, a resistência aos antimicrobianos emergiu em nível mundial como um dos temas de maior interesse em saúde pública. Ciente do fato, este estudo teve como objetivo avaliar a susceptibilidade antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp. isoladas de alimentos incriminados em surtos de doenças de origem alimentar, ocorridos na região noroeste do Estado de São Paulo, no período de abril de 1990 a dezembro de 2003. Foram analisadas, segundo o método de difusão com disco em ágar, 25 (67,6%) das 37 cepas de *S. aureus* envolvidas nos surtos, a partir de 1992 e 31 (96,9%) das 32 cepas de *Salmonella*, a partir de 1990. Das cepas de *S. aureus*, 8 (32,0%) foram sensíveis a todos os antimicrobianos, quatro (16,0%) resistentes a um antimicrobiano; 10 (40,0%) a dois; dois (8,0%) a três e um (4,0%) a quatro. Os maiores percentuais de resistência foram frente à penicilina (56,0%), seguido de azitromicina e tetraciclina (20,0%), oxacilina (16,0%) e cloranfenicol (12,0%). Das cepas de *S. Enteritidis*, 12 (48,0%) apresentaram perfil de resistência intermediária à tetraciclina. Em relação aos demais sorotipos de *Salmonella*, foi observada a presença de resistência em duas (33,3%) das 6 cepas analisadas, ambas *S. Typhimurium*, sendo uma resistente à ampicilina e outra à tetraciclina. A vigilância da resistência antimicrobiana é um dos passos essenciais para o desenvolvimento de estratégias de controle visando a eficiência da terapia antimicrobiana e minimização dos riscos em saúde pública.

**Palavras-Chave.** resistência aos antimicrobianos, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., surtos de doenças transmitidas por alimentos, alimentos.

## ABSTRACT

Antimicrobial resistance worldwide emerged in the nineties as one of the topics of most concern in public health. On account of this, the objective of this study was to evaluate the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* strains, isolated from foods involved in foodborne disease outbreaks (FBDO) in the north - western region of São Paulo State, Brazil, during the period from April 1990

to December 2003. Using agar disk diffusion technique, 25 (67.6%) of 37 *S. aureus* strains involved in FBDO as from 1992, and 31 (96.9%) of 32 *Salmonella* strains involved as from 1990 were analysed. Eight (32.0%) of *S. aureus* strains were sensitive to all of tested antimicrobial compounds, 4 (16.0%) were resistant to one antibiotic agent; 10 (40.0%) to two; two (8.0%) to three, and one (4.0%) to four drugs. The resistance was mostly frequent to penicillin (56.0%), followed by azitromycin and tetracycline (20.0%), oxacillin (16.0%), and chloramphenicol (12.0%). None of 25 tested *S. Enteritidis* isolates presented resistance, but intermediate resistance to tetracycline was observed in 12 (48.0%) strains. Among the remaining *Salmonella* serotypes, two (33.3%) of them, both *S. Typhimurium*, were resistant to ampicillin and to tetracycline, respectively. Antimicrobial resistance surveillance is one of the key steps essential for developing strategies to safeguard the efficiency of antibiotic therapy and to minimize public health risks.  
**Key Words.** antimicrobial resistance, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, foodborne disease outbreaks, foods.

## INTRODUÇÃO

Na década de 1990, a resistência aos antimicrobianos emergiu em nível mundial como um dos temas de maior interesse em saúde pública, tendo em vista suas conseqüências relativas à diminuição da efetividade de antibióticos, demandando o uso daqueles mais onerosos e ainda, deparando com a dificuldade da escolha terapêutica<sup>1,2</sup>.

A resistência antimicrobiana resulta em aumento de morbidade, mortalidade e custos, sendo consenso global que o uso irracional e abusivo de antibióticos, terapêutica ou profilaticamente, contribuiu para a ascensão desta resistência<sup>3-6</sup>. Além disso, estudos sugerem que diferenças nas condições sócio-econômicas e sanitárias, assim como o padrão de drogas usadas, desempenham papel importante no aumento da resistência<sup>6</sup>.

Segundo Wenzel e Edmond<sup>7</sup> nos Estados Unidos são 160 milhões de prescrições de antibióticos/ano, das quais 50,0% para uso em pacientes e 50,0% para uso em animais, agricultura e aquicultura. Acrescentam que metade destas tem uso impróprio, como no caso de infecções virais das vias aéreas superiores, bronquites e faringites.

O surgimento de microrganismos resistentes aos antimicrobianos tem como uma das principais causas o aumento, nos últimos anos, do uso indiscriminado de antibióticos nas rações animais<sup>8-11</sup>.

Tratamento de animais destinados à alimentação com agentes antimicrobianos que são importantes na terapia humana pode representar um risco em saúde pública pela transferência de resistência de patógenos zoonóticos ou genes resistentes de animais para humanos, via consumo de alimentos contaminados<sup>2</sup>.

Ciente dos fatos, este estudo teve como objetivo avaliar a susceptibilidade aos agentes antimicrobianos das cepas de *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp. isoladas de alimentos incriminados em surtos de doenças de origem alimentar, ocorridos na região noroeste do Estado de São Paulo, no período de abril de 1990 a dezembro de 2003.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Cepas de *S. aureus* e *Salmonella* spp., isoladas de alimentos envolvidos nos surtos de doenças de origem alimentar ocorridos na região noroeste do Estado de São Paulo no período de abril de 1990 a dezembro de 2003, mantidas no Laboratório de Microbiologia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz-Laboratório Regional de São José do Rio Preto-SP, foram submetidas ao teste de susceptibilidade a antimicrobianos, segundo o método de difusão com disco em ágar, descrito por Bauer et al.<sup>12</sup>.

Os testes foram realizados em 25 (67,6%) das 37 cepas de *S. aureus* envolvidas nos surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA), ocorridos a partir de 1992. Quanto a *Salmonella*, os testes foram realizados com 31 (96,9%) das 32 cepas envolvidas a partir de 1990. Dessas, 25 eram *Salmonella* Enteritidis (SE) e 6 pertenciam a outros sorotipos (2 *S. Typhimurium*, 1 *S. Mbandaka*, 1 *S. Ohio*, 1 *S. Emek* e 1 *S. Newport*). As demais cepas não puderam ser analisadas.

Para o controle de qualidade dos testes foram utilizadas as seguintes cepas padrão ATCC (American Type Culture Collection): *Escherichia coli* ATCC 25922 (para os testes de *Salmonella*) e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (para os testes de *S. aureus*). Cada cepa a ser testada, bem como as cepas padrão ATCC foram inoculadas em tubos contendo 5 mL de solução salina a 0,85%, com o uso de alça de platina, previamente flambada, em quantidade suficiente para a obtenção da turvação padrão 0,5 da escala de Mc Farland. Com o auxílio de "swab" estéril, a cultura foi semeada em placas de Petri contendo ágar Müller-Hinton até a obtenção de um esfregaço uniforme. Após a secagem do esfregaço aplicou-se na superfície do meio de cultura discos com antibióticos (Cecon), escolhidos de acordo com a recomendação da "National Committee for Clinical Laboratory Standard"<sup>13</sup>.

As leituras foram realizadas após 18-24 horas por meio da medição dos halos de inibição, comparando-as posteriormente aos valores da tabela padrão para a classificação quanto à susceptibilidade aos antimicrobianos testados (sensível, resistente ou resistência intermediária).

As cepas de *S. aureus* foram testadas com os seguintes antimicrobianos: oxacilina (1 µg), penicilina G (10 Unidades

Peresi, JTM et al. Susceptibilidade antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp. isoladas de alimentos envolvidos em surtos de doenças bacterianas transmitidas por alimentos, ocorridos na região noroeste do Estado de São Paulo, no período de abril de 1990 a dezembro de 2003. **Rev Inst Adolfo Lutz**, 65(2):112-117, 2006.

Internacionais-UI), azitromicina (15 µg), clindamicina (2 µg), sulfazotrim (25 µg), vancomicina (30 µg), cloranfenicol (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), gentamicina (10 µg), rifampicina (30 µg) e tetraciclina (30 µg).

Os isolados de *Salmonella* foram testados em relação ao cloranfenicol (30 µg), gentamicina (10 µg), fosfomicina (200 µg), amicacina (30 µg), sulfazotrim (25 µg), cefazolina (30 µg), imipenem (10 µg), ampicilina (10 µg), tobramicina (10 µg), ofloxacina (5 µg), ciprofloxacina (5 µg), ceftazidima (5 µg), cefalotina (30 µg), ceftriaxona (30 µg) e tetraciclina (30 µg).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os resultados dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos obtidos em relação às cepas de *S. aureus* isoladas de alimentos envolvidos nos surtos de DTA.

De acordo com a Tabela 1, das 25 cepas testadas 8 (32,0%) foram sensíveis a todos os antimicrobianos, 4 (16,0%) resistentes a 1 agente; 10 (40,0%) a 2 (sendo 2 à oxacilina e penicilina, 2 à azitromicina e tetraciclina, 2 ao cloranfenicol e penicilina, 1 à azitromicina e penicilina, 1 à penicilina e tetraciclina, 1 à azitromicina e cloranfenicol e o último à gentamicina e penicilina); 2 (8,0%) a 3 (1 à azitromicina/penicilina/tetraciclina e 1 à oxacilina/penicilina/tetraciclina) e 1 (4,0%) a 4 (gentamicina/oxacilina/penicilina/rifampicina). Estas cepas revelaram maiores percentuais de resistência frente à penicilina (56,0%), seguido da azitromicina e tetraciclina (20,0%), oxacilina (16,0%) e cloranfenicol (12,0%). Os menores índices de resistência foram apresentados em relação à gentamicina e a rifampicina, correspondendo a 8,0 e 4,0%, respectivamente.

A presença de resistência entre as cepas de *S. aureus* foi constante em todo o período avaliado em relação aos seguintes agentes: azitromicina, penicilina e tetraciclina (a partir

de 1992), à oxacilina (a partir de 1994). Quanto à gentamicina e ao cloranfenicol, a resistência foi observada apenas nas cepas isoladas a partir de 1997 e 1998, respectivamente.

Isolados de *S. aureus* resistentes à penicilina foram observados quase concomitantemente a sua introdução no uso clínico devido à produção de β-lactamases ou penicilases, enzimas que hidrolizam o anel β-lactâmico das penicilinas, inativando-as<sup>3,14-16</sup>.

A resistência à penicilina das cepas de *S. aureus* isoladas de alimentos também foi observada por outros autores. Ombui, Kimotho, Nduhiu<sup>17</sup>, em estudo de 96 isolados de amostras de carne e de leite no Quênia, observaram alto percentual de resistência, correspondendo a 66,7%. Gelli et al.<sup>18</sup>, em avaliação de cepas isoladas de surtos de DTA ocorridos em alguns municípios do Estado de São Paulo, relataram a frequência de 80,0%. Os percentuais de resistência observados nesses dois estudos foram superiores ao por nós obtido. Oliveira et al.<sup>19</sup>, em estudo de *S. aureus* isolados de amostras de queijo tipo “Minas Frescal” comercializados no Rio de Janeiro detectaram resistência em 25,0% das cepas testadas, índice menor ao encontrado no presente estudo. Peresi et al.<sup>20</sup> relataram o percentual de 54,5% de resistência a este antimicrobiano em relação às 22 cepas isoladas de queijos tipo “Minas Frescal” comercializados no município de São José do Rio Preto-SP.

Em relação à tetraciclina, o estudo de Peresi et al.<sup>20</sup> revelou o percentual de resistência de 9,0% em relação à totalidade dos isolados testados e Gelli et al.<sup>18</sup> detectaram o de 10,0%, índices menores quando comparados ao resultado verificado neste estudo. Costa, Lima, Rabelo<sup>8</sup>, em estudo de 20 isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva oriundos de amostras de queijo “tipo Coalho” na Universidade Estadual do Maranhão observaram que 60,0% deles foram resistentes a este agente, mostrando um percentual de resistência muito superior ao encontrado no presente estudo.

**Tabela 1.** Susceptibilidade aos antimicrobianos observada para cepas de *S. aureus* isoladas de alimentos incriminados em surtos de origem alimentar, ocorridos na região noroeste do Estado de São Paulo, no período de abril de 1990 a dezembro de 2003.

Antimicrobianos	Cepas					
	Sensíveis		Resistência intermediária		Resistentes	
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%
Azitromicina	18	72,0	02	8,0	05	20,0
Ciprofloxacina	23	92,0	02	8,0	-	-
Clindamicina	25	100,0	-	-	-	-
Cloranfenicol	22	88,0	-	-	03	12,0
Gentamicina	23	92,0	-	-	02	8,0
Oxacilina	19	76,0	02	8,0	04	16,0
Penicilina	11	44,0	-	-	14	56,0
Rifampicina	24	96,0	-	-	01	4,0
Sulfazotrim	25	100,0	-	-	-	-
Tetraciclina	20	80,0	-	-	05	20,0
Vancomicina	25	100,0	-	-	-	-

Legenda: (-) ausência

A importância de *S. aureus* metilicina ou oxacilina resistente aumentou a partir da década de 80, sendo considerado, atualmente, o maior problema clínico e epidemiológico em infecções hospitalares. Esses microrganismos são designados por diferentes siglas em inglês ou português: ORSA (oxacilino-resistentes *Staphylococcus aureus*); MRSA (Methicilin resistant *Staphylococcus aureus*) ou SAMR (*Staphylococcus aureus* metilicina resistente)<sup>21</sup>. Considerado um patógeno tradicionalmente hospitalar, seu reservatório, modo de transmissão, fatores de risco e perfil de resistência aos antimicrobianos são bem conhecidos, com estabelecimento de medidas de prevenção baseadas nestes dados. A aquisição de MRSA na comunidade também é observada, envolvendo, principalmente, pessoas sob risco para esta aquisição<sup>22,23,24</sup>. No entanto, na última década, observa-se aumento na preocupação em relação à extensão pela qual estes microrganismos estão sendo disseminados para fora do ambiente hospitalar e, sobretudo envolvendo pessoas sem fatores de risco, surgindo a questão se estariam ocorrendo mudanças na epidemiologia do MRSA<sup>22,25</sup>.

Considerando que os estudos de rastreamento epidemiológico da intoxicação estafilocócica apontam o manipulador de alimentos como elemento incisivo no processo de disseminação do microrganismo, existe a possibilidade dos isolados de MRSA em alimentos terem sido oriundos de pessoas infectadas. Neste estudo, uma cepa MRSA foi isolada de alimento produzido em confeitaria, outro em padaria, não sendo obtidos dados dos órgãos de vigilância referentes às outras duas. Embora não seja possível afirmar a origem deste agente, tal fato vem confirmar a disseminação desses patógenos em ambientes não hospitalares, colocando os manipuladores de alimentos como possíveis disseminadores de *Staphylococcus* MRSA na comunidade, representando um risco para a saúde pública.

Neste estudo, todos os isolados testados mostraram-se sensíveis a clindamicina, sulfazotrim e vancomicina. Peresi et al.<sup>20</sup> também relataram sensibilidade aos mesmos antimicrobianos em 100,0% das cepas testadas, porém evidenciaram esta característica também em relação à oxacilina, rifampicina, cloranfenicol e gentamicina, cujos testes efetuados

neste estudo apresentaram-se parcialmente resistentes.

Nos estudos realizados por Oliveira et al.<sup>19</sup>, Bernardi et al.<sup>26</sup> e Gelli et al.<sup>18</sup> a sensibilidade das cepas avaliadas foi coincidente apenas em relação à vancomicina, porém neste último relato foi verificada ainda, a sensibilidade do total das cepas testadas em relação ao cloranfenicol, gentamicina e rifampicina e no de Bernardi et al.<sup>26</sup> em relação à gentamicina, que neste estudo apresentaram resistência.

Os resultados obtidos em relação às cepas de *S. Enteritidis* demonstraram que dos 25 isolamentos testados não houve nenhuma resistência, apenas a presença de 12 (48,0%) cepas com perfil de resistência intermediária à tetraciclina (Tabela 2).

Na década de 80, *S. Enteritidis* aparece, simultaneamente, em vários países do mundo. Tauxe<sup>27</sup> observou a partir dessa década, um aumento de sua resistência à vários antimicrobianos, determinando que os modelos de saúde pública incluíssem estudos de utilização de antimicrobianos na agricultura, tanto quanto os de uso humano.

Tavechio et al.<sup>11</sup> avaliaram no Instituto Adolfo Lutz-Laboratório Central-São Paulo o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de 131 cepas de SE (92 de origem humana e 39 de não humana), verificando a ocorrência de isolados multi-resistentes em SE de origem humana e não humana. Dos isolamentos de origem não humana, 23,1% foram resistentes a uma droga, 2,6% a duas e 2,6% a quatro, representando um grande problema de saúde pública, visto o curto período de tempo que esse sorotipo prevalecia no Estado de São Paulo.

Téo et al.<sup>28</sup>, em estudo referente aos isolamentos de *Salmonella* oriundos de alimentos e de pacientes envolvidos em 26 surtos de DTA, ocorridos no Estado do Paraná, no período de janeiro de 1999 e junho de 2001, revelaram que SE foi prevalente entre as cepas isoladas de pacientes (97,7%) e de alimentos (89,3%). A resistência antimicrobiana a pelo menos um dos antibióticos testados foi 50,0 e 13,9% para as cepas dos alimentos e dos pacientes, respectivamente. O total de 46,4% das cepas de alimentos e 23,3% das humanas apresentou perfil de resistência intermediária. Foi ainda relatada resistência à gentamicina frente a 25,0% dos isolados, fatos não observados neste estudo.

**Tabela 2.** Perfil de resistência/resistência intermediária das cepas de diferentes sorotipos de *Salmonella* isoladas de alimentos incriminados em surtos de origem alimentar, ocorridos na região Noroeste do Estado de São Paulo, no período de abril de 1990 a dezembro de 2003.

Antimicrobianos	Sorotipos/Número de cepas analisadas				
	<i>S. Enteritidis</i> (n=25)	<i>S. Typhimurium</i> (n=2)	<i>S. Mbandaka</i> (n=1)	<i>S. Ohio</i> (n=1)	<i>S. Emek</i> (n=1)
<b>Perfil de Resistência</b>					
Ampicilina	-	01 (50,0%)	-	-	-
Tetraciclina	-	01 (50,0%)	-	-	-
<b>Perfil de resistência intermediária</b>					
Tetraciclina	12 (48,0%)	01 (50,0%)	01 (100,0%)	01 (100,0%)	01 (100,0%)

Estudo realizado por Vaz et al.<sup>29</sup>, referente a 65 cepas de SE isoladas de produtos avícolas na região Sul do Brasil, revelou resistência aos seguintes antimicrobianos: tetraciclina (20,0%), sulfazotrim (93,8%), ampicilina (3,1%) e gentamicina (3,1%). No presente estudo, não foi detectada resistência a esses antimicrobianos. Os antimicrobianos testados em comum que também apresentaram 100,0% de sensibilidade foram a ciprofloxacina e o cloranfenicol.

Os mesmos índices de sensibilidade a alguns antibióticos foram também observados por outros autores. Araújo et al.<sup>30</sup>, em estudo de isolados de SE de origem humana e de alimentos oriundos de 4 surtos de DTA, observaram 100% de sensibilidade à amicacina, tobramicina, gentamicina, cloranfenicol, ceftriaxona e sulfazotrim.

Dentre os outros sorotipos de *Salmonella* testados, apenas *S. Newport* apresentou perfil de sensibilidade a todos os antimicrobianos testados. A Tabela 2 ainda revela os resultados dos diferentes sorotipos isolados de alimentos envolvidos nos surtos de DTA que apresentaram resistência e resistência intermediária em relação aos agentes avaliados.

Embora a maioria das cepas tenha apresentado sensibilidade aos antimicrobianos testados, a resistência à tetraciclina, amplamente utilizada como promotor de crescimento em ração animal, sugere que o uso indiscriminado pode selecionar cepas resistentes<sup>31</sup>.

O monitoramento da resistência antimicrobiana em bactérias de origem animal na França, efetuado pela Agência Francesa de Segurança Alimentar em 1998, revelou *S. Typhimurium* como um dos sorotipos de *Salmonella* mais resistentes, apresentando índice de 87,5%<sup>32</sup>. Foi relatado ainda, no período de julho a setembro de 2000, o acometimento de indivíduos de cinco países europeus infectados por uma linhagem de *Salmonella* Typhimurium DT204b multi-resistente a drogas antimicrobianas<sup>33</sup>.

Threlfall et al.<sup>34</sup> avaliaram a resistência aos antimicrobianos de cepas de *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Hadar* e *S. Virchow* isoladas de humanos e de alimentos de origem animal. Os resultados revelaram que a resistência foi mais comum em relação a *S. Typhimurium*, particularmente as pertencentes ao fagotipo 104.

Embora existam variações entre os autores em relação aos antimicrobianos testados, vários relatos também revelaram as resistências observadas neste estudo. Antunes et al.<sup>35</sup>, em avaliação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de 36 cepas de *Salmonella* oriundas de produtos derivados de aves, encontraram 36,0% delas resistentes à tetraciclina. Além disso, dentre os antimicrobianos testados em comum, foi observada resistência às drogas, por nós reveladas sensíveis, como o cloranfenicol (3,0%) e o sulfazotrim (3,0%).

Peresi et al.<sup>9</sup>, em análise de carcaças de frango, isolaram 87 cepas de *Salmonella*, sendo 1,1% resistente à tetraciclina. Ainda dentre os isolados são citados 3 (3,4%) resistentes à fosfomicina, 1 (1,1%) à gentamicina/sulfonamidas e 1 (1,1%) multirresistente à cefalotina/cefotaxima/cefuroxioma/tetraciclina.

Chung, Kim, Chang<sup>36</sup> avaliaram 41 isolados de *Salmonella* oriundos de 29 alimentos, amplamente consumidos na Coreia, no período de 1993 a 2001. Os resultados revelaram que elevado número dos isolados mostraram-se resistentes ou com resistência intermediária à tetraciclina e à ampicilina.

Sena et al.<sup>10</sup>, em estudo referente a 8 cepas de *Salmonella* isoladas a partir de queijo “tipo Coalho” comercializadas no período de janeiro a maio de 1997 em Recife-PE, encontraram também 12,5% delas resistentes à ampicilina e 25,0% à tetraciclina. Além destas, foram também relatadas 12,5% de resistência frente ao sulfazotrim e 12,5% à amicacina.

Os resultados obtidos por Bidóia et al.<sup>31</sup> em relação ao estudo do perfil de susceptibilidade a 29 isolados de *Salmonella* (18 de alimentos e 11 de matéria prima para ração animal) revelaram 22 (75,9%) resistentes à tetraciclina e 1 (3,4%) aos 3 antibióticos: gentamicina/tobramicina/tetraciclina, sendo esta oriunda de amostra de maionese envolvida em surto de DTA. Um total de 13,8% das cepas apresentou resistência intermediária à tetraciclina.

Peresi et al.<sup>20</sup> não evidenciaram perfil de resistência a nenhum antimicrobiano testado frente às cepas de *Salmonella* isoladas de queijos tipo “Minas Frescal”. Em relação aos antibióticos testados em comum a este estudo, foram as seguintes drogas que apresentaram o mesmo padrão de sensibilidade, ou seja, de 100,0%: ciprofloxacina, cloranfenicol, gentamicina, sulfazotrim, amicacina, imipenem, cefalotina, tobramicina e ceftazidima. Os mesmos índices de sensibilidade a alguns antibióticos foram também observados em outros estudos. Peresi et al.<sup>9</sup> citaram a ciprofloxacina, cloranfenicol, ceftazidima e sulfazotrim. Sena et al.<sup>10</sup> a ciprofloxacina, tobramicina, ceftazidima, gentamicina, cloranfenicol, amicacina e a ofloxacina e Antunes et al.<sup>35</sup> relataram a cefalotina, ceftazidima, gentamicina, tobramicina, ciprofloxacina e ofloxacina.

O desenvolvimento de resistência antimicrobiana em bactérias zoonóticas como *Salmonella* constitui um risco à saúde pública e animal, podendo comprometer o tratamento com antimicrobianos, no que se refere a dificuldade da escolha terapêutica em certas infecções, bem como a necessidade do uso de drogas mais onerosas. Portanto as observações de resistência enfatizam a necessidade de um uso prudente e crítico dos mesmos buscando a prevenção da emergência e da disseminação de microrganismos resistentes.

## REFERÊNCIAS

1. Moreno MA, Domínguez L, Teshager T, Herrero IA, Porrero MC, The Vav Network. Antibiotic resistance monitoring: the Spanish programme. *Int J Antimicrob Agents*. 2000; 14: 285-90.
2. Tollefson L, Fedorka-Cray PJ, Angulo FJ. Public health aspects of antibiotic resistance monitoring in the USA. *Acta Vet Scand Suppl*. 1999; 92:67-75.
3. Del Fiol FS, Mattos Filho TR, Groppo FC. Resistência bacteriana. *Rev Bras Med*. 2000; 57(10): 85-7.

Peresi, JTM et al. Susceptibilidade antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp. isoladas de alimentos envolvidos em surtos de doenças bacterianas transmitidas por alimentos, ocorridos na região noroeste do Estado de São Paulo, no período de abril de 1990 a dezembro de 2003. **Rev Inst Adolfo Lutz**, 65(2):112-117, 2006.

4. Domin MA. Highly virulent pathogens a post antibiotic era? *Br J Theat Nurs*. 1998; 8(2):14-8.
5. Miyamura S, Kozuma K, Nakagawa Y. An inhibitor of chloranfenicol acetyltransferase produced by *Streptomyces*. *J Antibiot*. 1979; 32:1217-26.
6. Murray BE. Can antibiotic resistance be controlled? *N Engl J Med*. 1994; 330(17):1229-30.
7. Wenzel RP, Edmond MB. Managing antibiotic resistance. *N Engl J Med*. 2000; 343(26):1961-3.
8. Costa FN, Lima RMS, Rabelo RN. Comportamento frente à ação de antimicrobianos de cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva, *Escherichia coli* e *Bacillus cereus* isoladas de derivados lácteos. *Hig Aliment*. 2002; 16(92/93):80-3.
9. Peresi JTM, Almeida IAZC, Lima SI, Fernandes SA, Tavechio AT, Gelli DS. *Salmonella*: determinação de sorotipos e resistência a agentes antimicrobianos de cepas isoladas de carcaças de frango comercializadas na região de São José do Rio Preto - SP. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 1999; 58(1):41-6.
10. Sena MJ, Cerqueira MMOP, Santos DA, Leocardio Filho G, Dias RS. Salmonelas isoladas de queijos tipo "coalho": caracterização sorológica e resistência a agentes antimicrobianos. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 1999; 58(1):13-7.
11. Tavechio AT, Fernandes SA, Neves BC, Dias AMG, Irino K. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella* Enteritidis in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1996; 38(5):315-22.
12. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JSC, Turk M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*. 1966; 45(4):493-6.
13. National Committee For Clinical Laboratory Standard. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing. Pennsylvania, 2003. (NCCLS document M2-A8 and supplemental tables M100-S13).
14. Amato Neto V, Levi GC, Lopes HV, Mendonça JS, Baldy JLS. Antibióticos na prática médica 5<sup>ed</sup>. São Paulo: Ed Roca; 2000. 304 p.
15. Mulligan ME, Murray-Leisure K, Ribner BS, Standiford HC, John J, Korvick J et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a consensus review of the microbiology, pathogenesis and epidemiology with implications for prevention and management. *Am J Med*. 1993; 94:313-28.
16. Tavares W. Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos 2<sup>ed</sup>. São Paulo: Ed Atheneu; 1996. 792p.
17. Ombui JN, Kimotho AM, Nduhiu JG. Antimicrobial resistance patterns and plasmid profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and meat. *East Afr Med J*. 2000; 77(9):463-7.
18. Gelli DS, Ribeiro EGA, Pacheco MR, Freitas AM, Esper MRR, Pisani B et al. Termorresistência e sensibilidade a antibióticos e quimioterápicos de cepas de *S. aureus* isoladas de materiais envolvidos em intoxicação por enterotoxina estafilocócica, no estado de São Paulo. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*. 1992; 10(1):23-34.
19. Oliveira CZF, Corbia ACG, Nascimento MGF, Lignon GB, Silva RVMA. Susceptibilidade antimicrobiana "in vitro", de bactérias do gênero *Staphylococcus*, isoladas de queijos minas. *Hig Aliment*. 1999; 13(61):30.
20. Peresi JTM, Graciano RAS, Almeida IAZC, Lima SI, Ribeiro AK, Carvalho IS. Queijo tipo Minas Frescal artesanal e industrial: qualidade microbiológica e teste de sensibilidade aos antimicrobianos. *Hig Aliment*. 2001; 15(83):63-70.
21. Rodrigues EAC, Mendonça JS, Amarante JMB, Alves Filho MB, Grinbaun RS, Richtmann R. Infecções hospitalares: prevenção e controle. São Paulo: Ed Sarvier; 1997. 669p.
22. Herold BC, Immergluck LC, Maranan MC, Lauderdale DS, Gaskin RE, Boyle-Vavra, S et al. Community acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk. *JAMA*. 1998; 279:593-8.
23. Kak V, Levine DP. Community acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infections: where do we go from here? *Clin Infect Dis*. 1999; 29:801-2.
24. Moreno F, Crisp C, Jorgensen JH, Patterson JE. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* as a community organism. *Clin Infect Dis*. 1995; 21:1308-12.
25. Boyce JM. Are the epidemiology and microbiology of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* changing? *JAMA*. 1998; 279(8):623-4.
26. Bernardi E, Armas RD, Caldeira MF, Ribeiro GA. Isolamento e perfil de sensibilidade de isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva provenientes de queijos colonial tipo Minas Frescal. In: Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 5, 2003, Campinas-SP. Anais.
27. Tauxe RV. Emerging foodborne diseases: an evolving public health challenge. *Emerg Infect Dis*. 1997; 3:425-34.
28. Téó CRPA, Souza CLG, Farah SMSS, Senff AM, Gouveia RG, Oliveira TCRM. Avaliação epidemiológica dos surtos de salmonelose ocorridos no Paraná entre janeiro de 1999 e junho de 2001. In: Simpósio Internacional de Segurança Microbiológica dos Alimentos, 2002, São Paulo-SP, Anais. p. 12.
29. Vaz CSL, Streck AF, Macagnan M, Canal CW. Resistência antimicrobiana em amostras de *Salmonella* Enteritidis isoladas de produtos de origem avícola na região sul do Brasil. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 22, 2003, Florianópolis-SC. Anais.
30. Araújo E, Pacheco MASR, Boni RF, Fonseca YSK, Gelli DS, Fernandes SA, Tavechio AT. Surtos alimentares por *Salmonella enteritidis*, associados ao consumo de alimentos à base de ovos em Sorocaba, SP. *Hig Aliment*. 1995; 9(40):24-6.
31. Bidóia AD, Guilhermetti E, Pádua RAF, Herrero F, Silva SC, Mikcha JM. Susceptibilidade a antimicrobianos de *Salmonella* spp isolada de alimentos e matéria-prima para ração animal. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 22, 2003, Florianópolis-SC. Anais.
32. Martel JL, Tardy F, Brisabois A, Lailier R, Coudert M, Chaslus DE. The French antibiotic resistance monitoring programs. *Int J Antimicrob Agents*. 2000; 14(4):275-83.
33. Lindsay EA, Lawson AJ, Walker RA, Ward LR, Smith HR, Scott FW et al. Role of electronic data exchange in an international outbreak caused by *Salmonella enterica* serotype *typhimurium* DT204b. *Emerg Infect Dis*. 2002; 8(7):732-4.
34. Threlfall EJ, Teale CJ, Davies RH, Ward LR, Skinner JA, Graham A et al. A comparison of antimicrobial susceptibilities in nontyphoidal salmonellas from humans and food animals in England and Wales in 2000. *Microb Drug Resist*. 2003; 9(2):183-9.
35. Antunes P, Réu C, Sousa JC, Peixe L, Pestana N. Incidence of *Salmonella* from poultry products and their susceptibility to antimicrobial agents. *Int J Food Microbiol*. 2003; 82(2):97-103.
36. Chung YH, Kim SY, Chang YH. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Salmonella* isolated from foods in Korea from 1993 to 2001. *J Food Prot*. 2003; 66(7):1154-7.

# Estudo comparativo entre os métodos *in vivo* e *in vitro* na análise toxicológica de produtos de higiene descartáveis e sua avaliação microbiológica

Comparative study between *in vivo* and *in vitro* toxicological methods and microbiological quality assessment in disposable hygienic products

RIALA6/1075

Lígia L. MIYAMARU\*, Maria C. SANTA BÁRBARA, Áurea S. CRUZ, Tamiko I.IKEDA, Harumi SAKUMA, Odair ZENEBON.

\*Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz Av. Dr. Arnaldo, 355 CEP.01246-902 - São Paulo – SP. Seção de Cosméticos e Produtos de Higiene-Divisão de Bromatologia e Química.

\*\* Este trabalho ganhou o 3º lugar do Prêmio VNU/Assoc. Brasileira de Cosmetologia.

Recebido: 10/03/2006 – Aceito para publicação: 30/08/2006

## RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram comparar os métodos *in vivo* e *in vitro* na avaliação da toxicidade dérmica e estimar a qualidade microbiológica de 60 amostras de produtos de higiene descartáveis comercializados na cidade de São Paulo. Nos testes de toxicidade *in vivo* foram utilizados o “Método de Draize” e o “Método Modificado por Magnusson e Kligman” e nos testes *in vitro* o Método de “difusão em agar”, empregando as linhagens celulares, NCTC clone 929 (ATCC- CCL1) e SIRC (ATCC-CCL-60). A análise microbiológica foi realizada de acordo com o “Bacteriological Analytical Manual On Line”, 2001. Os produtos analisados não apresentaram irritação dérmica primária, cumulativa e sensibilização cutânea, mas nos testes *in vitro*, foi observada em 18 amostras toxicidade leve à severa, com índice de zona (IZ) variando de 2,0 - 4,0 nas duas linhagens celulares testadas. A análise microbiológica apresentou número elevado de bactérias aeróbias mesófilas, resultados positivos para bolores, presença de *Enterobacter sp*, *Enterobacter agglomerans* e *Enterobacter cloacae*. De acordo com os resultados obtidos e para garantir a segurança da saúde do usuário recomenda-se que, além dos testes já mencionados pela legislação vigente, seja também preconizado teste de citotoxicidade *in vitro*, para os produtos de uso interno e externo. A realização prévia deste teste pode se constituir em mecanismo de triagem.

**Palavras Chave.** dermatite das fraldas, citotoxicidade, eritema, qualidade microbiológica.

## ABSTRACT

The purpose of this study was to compare both *in vivo* and *in vitro* methods evaluating toxicity and microbiological quality of 60 disposable hygienic products samples commercialized in the city of São Paulo. For *in vivo* toxicity testing, both “Draize”, and modified Magnusson-Kligman Method” were carried out, and “agar diffusion” was used for *in vitro* testing, employing NCTC clone 929 (ATCC-CCL1) and SIRC (ATCC-CCL-60) cell lines. Microbiological analysis was performed according to “Bacteriological Analytical Manual On Line”, 2001. The analyzed products neither caused primary skin rash, nor cumulative dermal rash, nor cutaneous sensitization, though on *in vitro* test, slight to severe toxicities were observed in 18 samples on both cell lines, with zone index (ZI) of 2.0 – 4.0. Microbiological analysis revealed high number of mesophilic aerobic microorganisms counting, positive results for molds, and presence of *Enterobacter sp*, *Enterobacter agglomerans* and *Enterobacter cloacae*. Based on the observed data in order to guarantee the consumer - health safety it should be stated the use of *in vitro* cytotoxicity test for both products of internal and external use, in addition to the tests referred by effective Brazilian laws. The preceding accomplishment of this test might be established as screening test.

**Key Words.** diaper dermatitis, cytotoxicity, eritema, microbiological quality.

## INTRODUÇÃO

Com o desenvolvimento tecnológico na área industrial, os produtos descartáveis para higiene pessoal adquiriram ampla aceitação pelo mercado consumidor. Entre estes produtos, os mais utilizados são fraldas descartáveis infantis e geriátricas, absorventes femininos de uso externo e interno, absorventes de leite materno, algodão hidrófilo e lenços umedecidos. Essa classe de produtos está dispensada de registro junto à ANVISA do Ministério da Saúde, porém sujeita ao regime de Vigilância Sanitária, sendo que o fabricante, importador ou distribuidor são responsáveis pelo seu controle.

A legislação brasileira<sup>1</sup> da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária exige somente os testes de irritação dérmica primária, cumulativa, sensibilização cutânea e análise microbiológica para os produtos acabados de uso externo e interno, e para as matérias primas de produtos de uso interno incluem também o teste de citotoxicidade *in vitro*. A avaliação *in vitro* vem apresentando crescente importância nos testes para detecção da toxicidade de biomateriais que entram em contato direto ou indiretamente com o ser humano, sendo que as culturas celulares indicam maior sensibilidade, reprodutibilidade, rapidez e menor custo em relação aos testes em animais<sup>2,3</sup>.

Como estes produtos podem gerar problemas de saúde pública, foi realizado um estudo para avaliar a sua qualidade sanitária. Além dos testes preconizados pela legislação vigente, foi incluído o teste de citotoxicidade *in vitro* para os produtos acabados de uso externo e interno, em razão dos frequentes relatos na literatura<sup>2</sup>, de dermatites em crianças e adultos, irritação ocasionada pelo “látex” das fraldas e de outros componentes utilizados no processo de fabricação.

A dermatite, popularmente, chamada de assadura, *stricto sensu* é ocasionada por contato com um irritante primário na região da fralda, afetando mais de 50% dos infantes entre o sétimo e décimo segundo mês de vida. Habitualmente, manifesta-se com quadro de leve intensidade como uma erupção eritematosa típica podendo também se apresentar de forma atípica, mais grave e com elementos eruptivos de outras dermatoses. A dermatite de “Jacquet” é uma forma clínica incomum e grave da dermatite de fralda<sup>4</sup>. Na maioria das vezes, este quadro dermatológico é decorrente da ação irritante do material constituinte da fralda combinada com a dos materiais biológicos (urina, suor, fezes e de outras secreções), também conhecida como dermatite amoniacal<sup>5,6,7</sup>. Uma vez instalada, a possibilidade de invasão local por germes existentes normalmente na pele ou veiculados pelos detritos aumenta consideravelmente, podendo um eritema ser transformado numa lesão mais grave, infectada por leveduras ou bactérias<sup>8</sup>. O fator isolado mais importante da dermatite de fraldas é a produção de amônia a partir da uréia, por atividade de certas bactérias. O pH da urina, após decomposição por bactérias urease-positivas, torna-se fortemente alcalino e irritante para a superfície cutânea que é normalmente ácida<sup>5,6,8,9</sup>. A fricção e

a maceração são fatores predisponentes freqüentemente necessários para o desenvolvimento dessa afecção. As fezes são consideradas o elemento principal envolvido na gênese da doença, em que as enzimas lipolíticas e proteolíticas fecais agem como fatores desencadeantes<sup>5,6,9</sup>.

Os objetivos deste trabalho foram comparar os métodos referentes aos testes de irritação dérmica primária e citotoxicidade para viabilizar a substituição do método *in vivo* pelo *in vitro*, possibilitando a diminuição do uso de animais em testes laboratoriais. Assim como avaliar a qualidade sanitária dos produtos higiênicos descartáveis disponíveis no comércio na cidade de São Paulo, quanto à qualidade microbiológica.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisadas 60 amostras de produtos de higiene, de diversas marcas, tais como fraldas descartáveis, absorventes higiênicos femininos de uso externo e interno, absorventes de leite materno, algodão hidrófilo e lenços umedecidos.

As avaliações *in vivo* foram feitas pelos ensaios de irritação dérmica primária e cumulativa, utilizando 6 coelhos albinos da raça Nova Zelândia, pesando de 2 a 2,5 Kg, sendo a irritação dérmica primária realizada com uma única aplicação e no ensaio de irritação dérmica cumulativa foram feitas 10 aplicações consecutivas. Os índices de irritação foram obtidos de acordo com o método de Draize<sup>1,10-13</sup>.

O ensaio de sensibilização cutânea foi realizado pelo método Modificado de Magnusson e Kligman<sup>1,13,14,15</sup>, utilizando 20 cobaias albinas de raça Swiss, pesando em torno de 300 gramas. Os resultados são considerados negativos quando nenhum dos animais apresenta reação macroscópica.

Para avaliação *in vitro*, foi realizado teste de citotoxicidade pelo método de difusão em agar<sup>1,2,3,16,17</sup>, utilizando linhagens celulares certificadas provenientes da American Type Culture Collection (ATCC).

As linhagens celulares NCTC clone 929 (ATCC-CCL-1), de tecido conjuntivo de camundongo e a SIRC (ATCC-CCL-60) de córnea de coelho foram semeadas em placas de Petri de 60 x 15 mm, na concentração de  $3,0 \times 10^5$  células/mL de meio mínimo de Eagle (MEM) com 10% de soro fetal bovino (SBF) sem antibiótico e incubadas durante 48 horas à 37 °C, em estufa com ambiente de 5% de CO<sub>2</sub>. Após a formação da monocamada celular, o meio líquido foi descartado e adicionado volume de 5 mL do meio sólido composto de partes iguais de MEM (duas vezes concentrado) e ágar (Bacto- Difco) a 1,8 % com 0,01% de vermelho neutro como corante vital.

As leituras das placas foram feitas macroscopicamente e microscopicamente, observando-se a presença do halo claro ao redor do material tóxico correspondente às células mortas, que não incorporaram o corante vital. Quando aplicável, os diâmetros dos halos resultantes do efeito citotóxico foram cuidadosamente medidos usando paquímetro calibrado e

classificados em índices de zona (IZ) de acordo com a Farmacopéia Americana<sup>17</sup>.

Todas as amostras foram testadas em triplicata e, como controle negativo e positivo, foram utilizados respectivamente disco de papel de filtro atóxico com 0,5 cm de diâmetro e fragmentos com 0,5 cm x 0,5 cm de látex tóxico.

Na análise microbiológica, uma peça inteira da amostra foi pesada em invólucro de plástico estéril e acrescentada água peptonada tamponada a 1% (APT 1%) em volume proporcional ao peso, para resultar na diluição de  $10^{-1}$  ou  $10^{-2}$ . Em seguida, as diluições foram semeadas para as seguintes determinações de acordo com Bacteriological Analytical Manual On Line<sup>18</sup>: contagem em placas de bactérias aeróbias mesófilas, pesquisa de coliformes totais, contagem de clostrídio sulfito redutor e contagem de bolores e leveduras. Após a semeadura, o invólucro plástico contendo a amostra e o diluente (APT 1%) foi incubado a 35 °C por 48 horas para enriquecimento e foram realizados os ensaios de pesquisa de coliformes totais, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### *In vivo*

Os resultados obtidos foram todos negativos para os testes de irritação dérmica primária, cumulativa e sensibilização cutânea.

### *In vitro*

No teste de citotoxicidade *in vitro* foi observada toxicidade variando de leve a severa, com índice de zona entre (2,0 – 4,0), nas duas linhagens celulares NCTC clone 929 e SIRC, em dez fraldas na região de elástico, uma fralda na região do adesivo, dois absorventes maternos na região externa e cinco amostras de lenços umedecidos, conforme mostra a Tabela 1.

Nas fraldas, observou-se que a região que mais apresentou toxicidade foi a do elástico, cuja matéria prima era o “látex”. Atualmente, as empresas de grande porte substituíram este material por “lycra”, porém existem pessoas com intuito de aumentar a renda, fabricam fraldas descartáveis em casa e desconhecem tal fato, comprometendo a qualidade de seus produtos.

No adesivo das fraldas, absorvente de leite materno e lenços umedecidos, supõe-se que a toxicidade apresentada possa estar relacionada à qualidade da cola, do material utilizado e à presença de fragrâncias.

### *In vivo x in vitro*

Na Farmacopéia Americana<sup>17</sup> o índice de toxicidade aceitável para os produtos hospitalares é até IZ=2 (leve toxicidade), e comparando os valores obtidos nos testes de irritação dérmica primária e teste de citotoxicidade, observou-se que 30% das amostras apresentaram efeito tóxico no teste de citotoxicidade *in vitro* nas duas linhagens celulares e 70% foram negativos tanto nos ensaios *in vitro* como *in vivo*, conforme mostram a Figura 1 e a Figura 2.

**Tabela 1.** Média dos diâmetros dos halos de toxicidade (cm) e sua classificação em índice de zona (IZ) obtidos nas diferentes amostras de produtos descartáveis para as linhagens celulares NCTC clone 929 e SIRC.

Amostras	NCTC clone 929		SIRC		
		Média (cm)	IZ	Média (cm)	IZ
Fraldas	1	0,68	3,0	0,63	3,0
	2	0,63	3,0	0,53	3,0
	3	0,57	3,0	0,67	3,0
	4	0,78	3,0	0,60	3,0
	5	0,43	2,0	0,10	2,0
	6	0,82	3,0	0,70	3,0
	7	0,80	3,0	0,80	3,0
	8	1,25	4,0	1,17	4,0
	9	0,85	3,0	0,80	3,0
	10	0,78	3,0	0,67	3,0
	11	0,78	3,0	0,67	3,0
Absorventes maternos	1	0,27	2,0	0,25	2,0
	2	0,27	2,0	0,25	2,0
Lenços umedecidos	1	0,13	2,0	0,13	2,0
	2	0,13	2,0	0,10	2,0
	3	0,27	2,0	0,00	2,0
	4	0,28	2,0	0,00	2,0
	5	0,13	2,0	0,10	2,0
Papel de Filtro	Controle -	0,00	0,0	0,00	0,0
Latex	Controle +	0,70	3,0	0,70	3,0

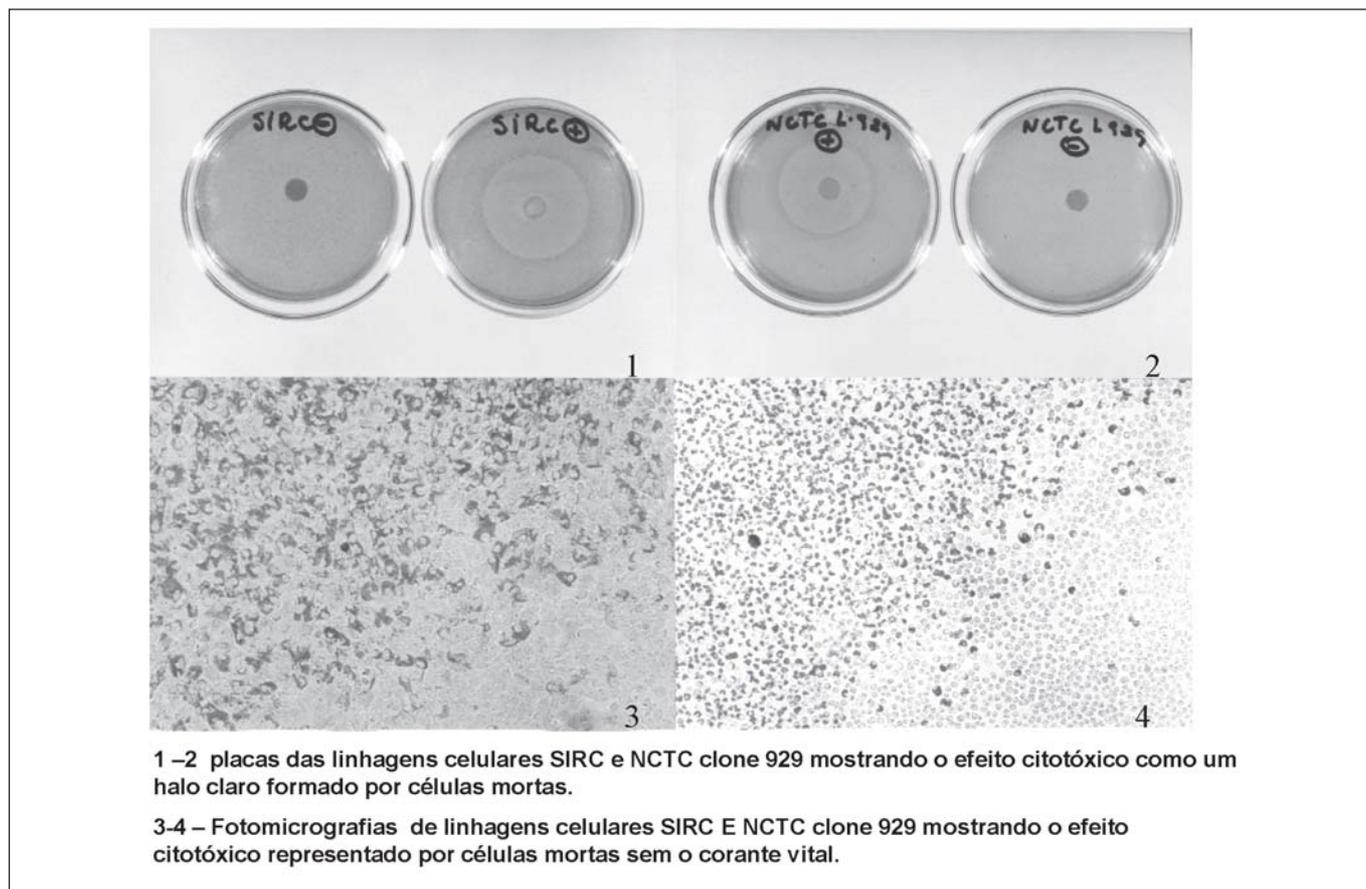


Figura 1. Método de citotoxicidade *in vitro*

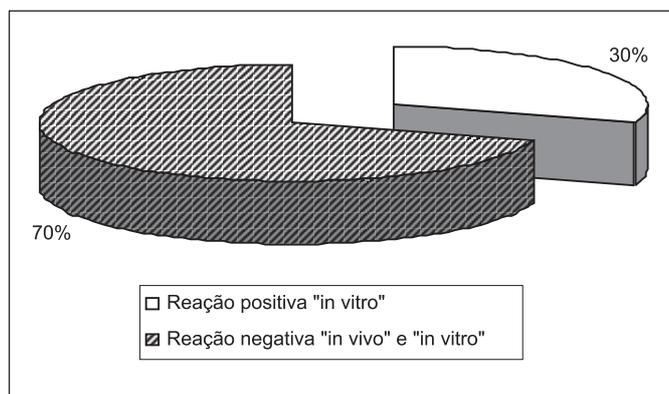


Figura 2. Porcentagem de amostras positivas no teste de toxicidade *in vitro*.

### Análise microbiológica

A análise microbiológica apresentou resultados positivos para bolores em quatro fraldas descartáveis industrializadas, contagens variando de  $1,1 \times 10^3$  a  $3,3 \times 10^3$  UFC/g e a presença de *Enterobacter* sp em algodão ortopédico, *Enterobacter agglomerans* em uma fralda de origem caseira e *Enterobacter cloacae* em algodão hidrófilo. Estas

contaminações podem ter ocorrido, provavelmente, durante o armazenamento e/ou devido à origem da matéria prima utilizada. O isolamento das bactérias *Enterobacter* sp, *Enterobacter agglomerans* e *Enterobacter cloacae* foi obtido após o enriquecimento em água peptonada tamponada a 1%, a partir do qual foi realizada a inoculação em caldo lauril sulfato, plaqueamento em ágar eosina azul de metileno, segundo Levine<sup>18</sup>, isolamento no meio IAL e posterior identificação bioquímica neste Instituto. Duas amostras de algodão ortopédico apresentaram contagem de bactérias aeróbias mesófilas ( $3,9 \times 10^4$  e  $4,2 \times 10^4$  UFC/g), acima do limite tolerado pela legislação em vigor<sup>1</sup>. Todas as amostras apresentaram pesquisa negativa para *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, clostrídio sulfito redutor e leveduras.

### CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos observou-se que além dos testes preconizados pela legislação brasileira vigente, o teste de citotoxicidade *in vitro* também deve ser recomendado para os produtos acabados de uso externo e interno, sendo

uma técnica rápida de baixo custo e alta sensibilidade, podendo ser usado como ensaio de triagem. Além disso, poderá evitar problemas de Saúde Pública garantindo maior segurança à saúde do usuário, pois os produtos de higiene são utilizados por tempo prolongado em crianças e adultos, podendo causar dermatites de contato e infecções.

## REFERÊNCIAS

1. Brasil. Portaria nº1480 de 1990 do Ministério da Saúde. Regulamento Técnico para o controle de produtos absorventes higiênicos descartáveis, de uso externo e intra-vaginal. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 7 jan.1991, Seção 1, p.295-301.
2. Cruz AS, Figueiredo CA, Ikeda TI, Vasconcelos ACE, Cardoso JB, Salles Gomes LF. Comparação de métodos para testar a citotoxicidade *in vitro* de materiais biocompatíveis. *Rev Saúde Pública* 1998;32(2):153-9.
3. Pinto TJA, Azevedo JC, Cruz AS. Comparative study of epithelial and fibroblastic cell lines as an alternative cytotoxicity test to the Draize Method. *JAOAC Int* 2000; 83(3): 665-8.
4. Zanini M, Wulkan C, Paschoal LHC, Paschoal FM. Erupção pápulo-ulcerativa na região da fralda: relato de um caso de dermatite de Jacquet. *An. Bras. Dermatol* 2003; 78(3).
5. Atherton DJ. The aetiology and management of irritant diaper dermatitis. *European Academy of Dermatology and Venereology. JEADV* 2001; 15(Suppl.1):1-4.
6. Atherton DJ. A Review of the Pathophysiology, prevention and treatment of irritant diaper dermatitis. *Curr Med Res Opin* 2004; 20(5):645-9.
7. Shin HT. Diaper dermatitis that does not quit. *Dermatol Ther* 2005;18(2): 124-35.
8. Kazaks EL, Lane AT. Diaper dermatitis *Pediatric Dermatology* 2000;47(4):909-19.
9. Wolf R, Wolf D, Tuzun B, Tuzun Y. Diaper dermatitis. *Clinics in Dermatology* 2000; 18(6):657-60.
10. American Society for Testing and Materials [ASTM]. F719. Standard practice for testing biomaterials in rabbits for primary skin irritation. Philadelphia: ASTM, 1996.
11. Draize JH. *Dermal Toxicity in Appraisal of the Safety of Chemicals in Foods, Drugs, and Cosmetics*. Association of Food and Drug Officials of the United States, Austin, Texas, 1959.
12. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Manual de irritação dérmica primária e repetida, Rio de Janeiro, 2001.
13. International Organization for Standardization [BS EN ISO] 10993-10. Biological evaluation of medical devices tests for irritation and sensitization. Geneva,1996.
14. American Society for Testing and Materials [ASTM], F 720-81. Standard practice for testing guinea pigs for contact allergens: guinea pigs maximization test. Philadelphia, 1996.
15. Magnusson B, Kligman, A. *Allergic contact dermatitis in the guinea pig*. Thomas CC, Springfield IL, 1970.
16. International Organization For Standardization [BS EN ISO] 10993-05: Biological evaluation of medical devices tests for *in vitro* cytotoxicity. Geneva, 1992.
17. UNITED. States Pharmacopeia. 28 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2005 p.2268-9.
18. Bacteriological Analytical Manual Online, 2001. Disponível em <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4.html>.

# Avaliação microbiológica de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)

## Microbiological evaluation of yerba-maté (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)

RIALA6/1076

Liane M. V. BARBOZA<sup>1\*</sup>, Nina WASZCZYNSKYJ<sup>1</sup>, Renato J. S. de FREITAS<sup>1</sup>

\* Endereço para correspondência: <sup>1</sup>TC/PPGTA – Centro Politécnico – Setor de Tecnologia – Jardim das Américas Caixa Postal 19011 – 81531-990 Curitiba- PR Fone/Fax: (41) 3361-3232  
Recebido: 26/01/2006 – Aceito para publicação: 30/08/2006

### RESUMO

O controle higiênico-sanitário dos alimentos é fundamental para o sucesso de qualquer empresa no ramo alimentício. O objetivo deste trabalho foi avaliar a contaminação microbiológica de amostras de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). As amostras foram do tipo cancheada folha verde e folha tostada. As análises foram realizadas de acordo com a Organização Mundial da Saúde e a Resolução ANVISA/MS (RDC Nº. 12/2001): contagem de bolores e leveduras (UFC/g), contagem de bactérias mesófilas (UFC/g), contagem de coliformes a 35° C (NMP/g), determinação do Número Mais Provável de coliformes a 45° C (*Escherichia coli*) (NMP/g) e pesquisa de *Salmonella* spp/25g. Como complemento foi determinada a atividade de água nas amostras. Os resultados de atividade de água revelaram valores entre 0,639 e 0,713g/100g. As amostras analisadas obtiveram resultados em conformidade à legislação vigente, demonstrando boas práticas de fabricação e qualidade da erva-mate ao consumidor.

**Palavras-Chave.** erva-mate, microbiologia, atividade de água.

### ABSTRACT

Food sanitary-hygienic control is fundamental for any food company having success. The present work aimed at analyzing yerba -mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) for assessing the occurrence of microbiological contamination. The analyzed samples were of two types green leaf and toasted leaf. The analyses were performed according to the World Health Organization and the Brazilian Resolution (ANVISA/MS, RDC Nº. 12/2001) guidelines: the yeast and molds counting (UFC/g), the mesophylic aerobic bacteria counting (UFC/g), the most probable number of total and fecal coliforms/*E. coli* (NMP/g), besides *Salmonella* spp/25g survey. Also, water activity was analyzed on yerba-maté samples. The results obtained from these analyses were in conformity to the effective legislation, showing the use of good product manufacturing practices, and the quality of maté available to consumers.

**Key Words.** yerba-maté, microbiology, activity of water.

### INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) é um dos produtos agroindustriais de grande importância econômica no sul do Brasil, sendo produzida nos Estados do Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), na safra de 2003, o maior produtor de erva-mate foi o Rio Grande do Sul, seguido pelo Paraná e Santa Catarina<sup>1-3</sup>.

A produção e comercialização do produto no país é regulamentada pelo Ministério da Saúde, Divisão de Alimentos (Portaria 464/97) e os critérios de qualidade encontram-se fixados na Resolução nº 302, de 07 de novembro de 2002, do Ministério da Saúde<sup>4,5</sup>.

Segundo a Resolução n. 302, de 07 de novembro de 2002, do Ministério da Saúde, erva-mate é o produto constituído exclusivamente pelas folhas e ramos, das variedades de *Ilex paraguariensis*, na forma inteira ou moída obtidos através de tecnologia apropriada<sup>4</sup>.

Os aspectos fundamentais da qualidade da erva-mate são: a identidade do produto, qualidade microbiológica, toxicologia, composição físico-química adequada e características sensoriais<sup>6,7</sup>.

O desenvolvimento microbiano nos alimentos é condicionado por diversos fatores ambientais, como temperatura e umidade relativa, denominados extrínsecos e por fatores intrínsecos, sendo os principais a Aa, pH, potencial redox e a composição química do alimento<sup>8</sup>.

A Aa é uma forma de expressar a quantidade de água em um alimento que se encontra disponível para reações metabólicas e o desenvolvimento de microrganismos. A Aa é uma análise importante na estocagem de alimentos desidratados<sup>9</sup>. Segundo Maltini et al.<sup>11</sup>, a Aa é um determinante para o desenvolvimento de microrganismos e para a maioria das reações de degradação dos alimentos de natureza química, física e enzimática.

De acordo com Mathlouthi<sup>10</sup>, para inibir a multiplicação de microrganismos é necessário que o alimento apresente baixa Aa.

A Aa determina os limites mínimos de água disponível para o desenvolvimento microbiano. A maioria das bactérias e fungos não se desenvolve em Aa menor que 0,91 e 0,80, respectivamente. Em geral, a Aa mínima para a produção de toxinas é freqüentemente maior que a Aa necessária para o desenvolvimento de microrganismos<sup>12,13</sup>.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica de amostras de erva-mate verde e tostada e a atividade de água dessas amostras, provenientes da região de São Mateus do Sul no Paraná.

## MATERIAL E MÉTODOS

A matéria-prima utilizada para a realização deste trabalho foi a erva-mate tipo cancheada industrial folha verde e folha tostada, proveniente da região de São Mateus do Sul-PR. As amostras foram coletadas no período de novembro de 2003 a março de 2004 e dezembro de 2004, processadas na unidade de São Mateus do Sul da Empresa Baldo S. A., Comércio, Indústria e Exportação, e codificadas como: (ECN) erva-mate cancheada nova, (ECNT) erva-mate cancheada nova tostada, (ECD) erva-mate cancheada descansada estocada por seis meses, (ECDT) erva-mate cancheada descansada tostada estocada por seis meses, (ECSFT) erva-mate cancheada safrinha

tostada processada em trocador de placas e (ECFT) erva-mate cancheada safrinha tostada processada no sistema tradicional, em secador de esteiras.

Foi utilizado o delineamento de blocos ao acaso com seis tratamentos e três repetições, para as seis amostras de erva-mate estudadas. A análise estatística foi realizada com o programa MSTATC (versão 2.10) da Michigan State University, submetendo os resultados à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey, no nível de 5% de probabilidade.

As amostras foram peneiradas para retirar a goma e o pó fino e na seqüência homogeneizadas e acondicionadas em filmes plásticos fechados hermeticamente em temperatura ambiente, ao abrigo da luz, e avaliadas, em triplicata, quanto à contagem de bolores e leveduras (UFC/g), contagem de bactérias mesófilas (UFC/g), contagem de coliformes a 35° C (NMP/g), determinação do Número Mais Provável de coliformes a 45° C (*Escherichia coli*) (NMP/g) e pesquisa de *Salmonella* spp/25g, de acordo com o Beuchat et al<sup>14</sup>, Morton<sup>15</sup>, Kornacki et al<sup>16</sup>, Andrews, et al<sup>17</sup>.

Como complemento à análise, determinou-se a atividade de água nas amostras, em triplicata, utilizando-se o higrômetro Decagon, da marca Aqua Lab, modelo CX2, código CFR 110, calibrado a 21° C e seguindo o método regulamentado pelo Departamento de Boas Práticas de Fabricação da Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos<sup>18</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos parâmetros microbiológicos das amostras de erva-mate analisadas são apresentados na Tabela 1.

A Resolução-RDC n. 12, de 2 de janeiro de 2001, da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)<sup>19</sup>, do Ministério da Saúde, estabelece para chá e produtos similares, obtidos por processamento térmico (torração e processos

**Tabela 1.** Média dos parâmetros microbiológicos das amostras de erva-mate.

DETERMINAÇÃO	ECN	ECNT	ECD	ECDT	ECSFT	ECFT
Contagem de bactérias mesófilas (UFC/g)	5,0 x 10 <sup>1</sup>	2,0 x 10 <sup>1</sup>	1,0 x 10 <sup>1</sup>	< 10	4,5 x 10 <sup>1</sup>	< 10
Contagem de coliformes a 35° C (NMP/g)	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
Contagem de coliformes a 45° C ( <i>Escherichia coli</i> ) (NMP/g)	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
Contagem de bolores e leveduras (UFC/g)	1,0 x 10 <sup>2</sup>	5,0 x 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>2</sup>	< 10 <sup>2</sup>	5,0 x 10 <sup>1</sup>	< 10 <sup>2</sup>
Pesquisa de <i>Samonella</i> spp/25g	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência

NOTA: ECN = erva-mate cancheada nova; ECNT = erva-mate cancheada nova tostada; ECD = erva-mate cancheada descansada; ECDT = erva-mate cancheada descansada tostada; ECSFT = erva-mate cancheada safrinha tostada (secagem em trocador de placas); ECFT = erva-mate cancheada safrinha tostada (secagem em secador de esteiras)

similares), consumidos após tratamento térmico (infusão e decocção), com ou sem adição de açúcar e outros ingredientes, ausência de *Salmonella* spp. em 25g de amostra e limite máximo de  $5 \times 10^3$  NMP/g para coliformes a 45° C.

A Organização Mundial de Saúde (OMS)<sup>20</sup> estabelece para chás consumidos na forma de infusão ou decocto as contagens de bactérias mesófilas com limite máximo de  $10^7$  UFC/g, e de bolores e leveduras com limite máximo de  $10^4$  UFC/g.

Verificou-se que todos os parâmetros microbiológicos atenderam tanto à legislação brasileira vigente<sup>19</sup>, como também ao estabelecido pela OMS<sup>20</sup>, revelando Boas Práticas de Fabricação (BPF).

Burgardt<sup>21</sup> determinou as características microbiológicas para erva-mate cancheada verde e encontrou população inferior a três NMP/g, para coliformes fecais e população de  $6,0 \times 10^2$  UFC/g para bolores e leveduras e *Salmonella* spp não foi detectada em 25g do produto.

Hermes e Hanefeld<sup>22</sup> avaliaram nove amostras de erva-mate ao longo de seis meses e encontraram, em média,  $5,0 \times 10^3$  UFC/g de bolores e leveduras, e ausência de coliformes totais, coliformes fecais e *Salmonella* spp.

Nietsche<sup>7</sup> determinou os parâmetros microbiológicos na erva-mate cancheada e encontrou para a contagem de coliformes a 45° C o valor de  $<3$  NMP/g, a contagem de bolores variou de  $< 10^2$  a  $4,8 \times 10^3$  UFC/g e ausência de *Salmonella* spp.

Borges et al.<sup>23</sup> avaliaram a contagem de fungos no controle de qualidade da erva-mate comercializada em Curitiba-PR e detectaram bolores e leveduras acima do permitido pela Resolução-RDC n.12 (ANVISA)<sup>19</sup>, em duas das cinco amostras analisadas.

Bordenave et al.<sup>24</sup> determinaram a qualidade microbiológica de 50 amostras de erva-mate cancheada de diferentes indústrias ervateiras e encontraram na contagem de bactérias mesófilas uma variação na ordem de  $< 10^2$  a  $10^5$  UFC/g, para contagem de bolores e leveduras os valores oscilaram entre  $2 \times 10$  e  $4 \times 10^4$  UFC/g, para coliformes totais os valores ficaram entre  $< 3$  e  $12 \times 10^3$  NMP/g e não foram detectados coliformes termotolerantes.

Santos<sup>25</sup> avaliou a estabilidade da erva-mate em embalagens plásticas de polietileno tereftalato (PET), durante 180 dias e encontrou os seguintes resultados: bactérias mesófilas uma variação de  $3,8 \times 10^3$  e  $1,1 \times 10^2$  UFC/g, bolores e leveduras uma variação de  $6,0 \times 10^2$  e  $< 10^2$  UFC/g, coliformes a 35° C ficaram entre 23 e  $< 3$  NMP/g, determinação do Número Mais Provável de coliformes a 45° C foi  $< 3$  NMP/g e ausência de *Salmonella* spp.

Com relação à Aa, que é a medida mais acurada para se determinar a habilidade de multiplicação microbiana, observou-se que os valores variaram de 0,639 a 0,713 (Tabela 2). Estes dados são inferiores aos valores críticos mínimos para o desenvolvimento microbiano e provavelmente, refletem boas condições de armazenamento.

**Tabela 2.** Teor médio de atividade de água de amostras de erva-mate cancheada.

Amostras	Aa(g/100 g)	Erro padrão
ECN	0,639 <sup>d</sup>	0,01
ECNT	0,642 <sup>cd</sup>	0,01
ECD	0,667 <sup>bc</sup>	0,01
ECDT	0,679 <sup>b</sup>	0,01
ECSFT	0,713 <sup>a</sup>	0,01
ECFT	0,710 <sup>a</sup>	0,01

NOTA: ECN = erva-mate cancheada nova; ECNT = erva-mate cancheada nova tostada; ECD = erva-mate cancheada descansada; ECDT = erva-mate cancheada descansada tostada; ECSFT = erva-mate cancheada safrinha tostada (secagem em trocador de placas); ECFT = erva-mate cancheada safrinha tostada (secagem em secador de esteiras); Letras minúsculas diferentes para cada amostra diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p<0,05).

De acordo com os dados microbiológicos e de Aa obtidos neste trabalho, observou-se que a baixa Aa influenciou diretamente na qualidade microbiológica, e que todos os parâmetros microbiológicos ficaram abaixo dos limites estabelecidos pela legislação vigente.

## CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo conclui-se que as amostras analisadas apresentaram-se dentro dos parâmetros estabelecidos pela legislação vigente e revelaram procedimentos adequados nas diversas etapas da cadeia produtiva: na colheita, durante o transporte, processamento e armazenamento, mantendo a qualidade do produto para o consumidor.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES e à Empresa Baldo S. A., Comércio, Indústria e Exportação, pelo apoio recebido.

## REFERÊNCIAS

1. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Quantidade produzida de erva-mate (folha) no Estado do Rio Grande do Sul. [citado 2005 Fev 12]. Disponível em: URL: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric/>.
2. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Quantidade produzida de erva-mate (folha) no Estado do Paraná. [citado 2005 Fev 12]. Disponível em: URL: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric/>.
3. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Quantidade produzida de erva-mate (folha) no Estado de Santa Catarina. [citado 2005 Fev 12]. Disponível em: URL: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric/>.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC n. 302, de 07 de novembro de 2002. Dispõe sobre o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade para erva-mate. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 08 de nov. 2002. p.50.

5. Rates SMK. Metilxantinas. In: Simões CMA, Schenkel EP, Gosmann G, Mello J. CPD, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia da planta ao medicamento 1. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/Editora UFSC, 1999. p. 723-32.
6. Corrêa S, Kist BB, Quintana A. Anuário brasileiro da erva-mate. Santa Cruz do Sul: Editora Pallotti, 2000, 64p.
7. Nietsche, K. Caracterização da qualidade da erva-mate cancheada [Dissertação de mestrado] Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2002. 96p.
8. Leitão MFF. Atividade de água e transformações microbiológicas de deterioração. In: I Seminário sobre Atividade de água em Alimentos. Campinas: ITAL, 1987: p.1-2.
9. Singh P, Heldman DR. Introduction to food engineering. California: Academic Press, 1993.
10. Mathlouthi M. Water content, water activity, water structure and the stability of foodstuffs. Food Control. 2001; 12(7):409-17.
11. Maltini E, Torreggiani D, Venir E, Bertolo G. Water activity and preservation of plant foods. Food Chem. 2003, 82(1):79-86.
12. Padula M, Oliveira LM. Embalagens para alimentos desidratados. In: ITAL. Desidratação de frutas e hortaliças. Campinas: ITAL; 1987. p. 284-338.
13. Sarantópoulos CIGL, Oliveira LM, Canavesi E. Requisitos de conservação de alimentos em embalagens flexíveis. Campinas: CETEA; 2001. 213 p.
14. Beachat LR, Cousin MA. Yeasts and molds. In: APHA. American Public Health Association. Compendium of methods for the microbiological of foods. 4. ed. Washington (DC): Frances Pouch Downes Keith Ito; 2001. p. 209-215.
15. Morton RD. Aerobic Plate Count. In: APHA. American Public Health Association. Compendium of methods for the microbiological of foods. 4. ed. Washington (DC): Frances Pouch Downes Keith Ito; 2001. p. 63-65.
16. Kornacki JL, Johnson JL. Enterobacteriaceae, Coliformes, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: APHA. American Public Health Association. Compendium of methods for the microbiological of foods. 4. ed. Washington (DC): Frances Pouch Downes Keith Ito; 2001. p. 69-82.
17. Andrews WH, Flowers RS, Silliker J, Bailey JS. *Salmonella*. In: APHA. American Public Health Association. Compendium of methods for the microbiological of foods. 4. ed. Washington (DC): Frances Pouch Downes Keith Ito; 2001. p. 357-380.
18. Decagon Devices Inc. Water activity meter: operator's manual. 3. ed. Pulman, WA: Decagon, 2001. 185 p.
19. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC n. 12, de 2 de janeiro de 2001. Dispõe sobre o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2 de Jan. 2001. p.1-6.
20. World Health Organization. Quality control methods for medical plant materials. Geneva: WHO; 1998. 115 p.
21. Burgardt AC. Desenvolvimento de uma bebida utilizando extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) [Dissertação de mestrado]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2000. 133 pp.
22. Hermes N, Hanefeld AO. Avaliação da qualidade da erva-mate produzida com tecnologia desenvolvida para escala de microindústria. Tecno-Lógica 2001; 5(1):9-27.
23. Borges LR, Pimentel IC, Beux MR, Talami A. Contagem de fungos no controle de qualidade da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) e isolamento de gêneros potencialmente micotoxigênicos. B. CEPPA 2002; 20(1):103-110.
24. Bordenave AS, Duce JA, Ybarra LR, Cañete LA. Correlacion de las cenizas y humedad de hojas de yerba mate y la calidad microbiologica de yerba mate canchada estacionada. In: 3º Congresso Sul – Americano da Erva-Mate. Chapecó: 1ª Feira do Agronegócio de Erva-Mate, 2003: 26-32.
25. Santos KC. Estabilidade da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) em embalagens plásticas [Dissertação de mestrado]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2004. 127 pp.

# Detecção de *Vibrio cholerae* O1 em ostras utilizando anticorpo monoclonal em ensaio de aglutinação

## Use of monoclonal antibody for detecting *Vibrio cholerae* O1 in oysters by means of agglutination test

RIALA6/1077

Christiane Asturiano RISTORI<sup>1</sup>, Ruth Estela Gravato ROWLANDS<sup>1</sup>, Miyoko JAKABI<sup>1</sup>, Dilma Scala GELLI<sup>1</sup>, Mônica CG SCOLA<sup>3</sup>, Elizabeth N de GASPARI<sup>2\*</sup>

\* Endereço para correspondência : <sup>2</sup>Seção de Imunologia, Instituto Adolfo Lutz, Av Dr Arnaldo, 355, Cerqueira César, 01246-902, São Paulo, SP.

<sup>1</sup> Seção de Microbiologia Alimentar <sup>3</sup>Seção de Coleção de Culturas, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

Recebido: 28/11/2005 – Aceito para publicação: 30/08/2006

### RESUMO

O *V. cholerae* sorogrupo O1 é o agente etiológico da cólera pandêmica, sendo considerado dentre os vibrios patogênicos ao homem, o mais importante. Os sintomas das infecções por esta bactéria variam de diarreia branda a doença grave podendo até levar a óbito. Dentre os alimentos marinhos, as ostras representam uma das principais vias na transmissão de cólera. Os métodos convencionais para detecção do *V. cholerae* O1 são laboriosos e demorados havendo, portando, a necessidade de implantar métodos rápidos, sensíveis, específicos, simples e de baixo custo. O objetivo deste estudo foi avaliar a técnica de aglutinação de partículas de látex sensibilizadas com anticorpo monoclonal (AcMo) na detecção de *V. cholerae* O1 em ostras, contaminadas laboratorialmente. A técnica de aglutinação com látex sensibilizado detectou  $1,2 \times 10^2$  UFC da bactéria (diluição 1/32). As amostras de ostras utilizadas para contaminação originalmente não continham *V. cholerae*, mas outras bactérias foram detectadas, tais como: *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas* spp. e outros vibrios. O presente estudo demonstrou que a detecção de *V. cholerae* em alimentos foi reduzida para 18 horas, considerando que pela metodologia convencional a análise é finalizada, em média, em 7 dias. O AcMo produzido apresentou uma sensibilidade e especificidade de 100% para *V. cholerae*.

**Palavras-Chave.** *V. cholerae*, anticorpo monoclonal, ostras, ensaio diagnóstico, reação de aglutinação

### ABSTRACT

*V. cholerae* serovar O1 is the etiologic agent responsible for pandemic cholera, and it is considered the most important human pathogenic Vibrio. The symptoms presented by patients affected by this bacterium vary from mild diarrhea to severe disease, and may even lead to death. Among the diverse types of seafood, the oysters pose as an important means for cholera transmission. Traditional methods used to detect *V. cholerae* are laborious and time-consuming, and there is an urgent need to establish a rapid, sensitive, specific, simple, and low-cost testing. The objective of this trial was, therefore, to assess the performance of a slide agglutination test using latex particles sensitized with specific monoclonal antibodies (MAB) for detecting *V. cholerae* O1 in experimentally-contaminated oysters. The slide agglutination test based on sensitized latex detected  $1.2 \times 10^2$  CFU of bacteria (dilution 1:32). Oyster samples used in the present study, for being experimentally contaminated, were originally free of *V. cholerae*, but other bacteria were found, such as: *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas* spp, and other vibrios. The present study demonstrated that the period of time needed to verify the food contamination with *V. cholerae* is 18 hours, taking in consideration that traditional methods require an average of 7-day period for getting the final results. The produced MAB presented 100% of specificity to *V. cholerae* O1.

**Key Words.** *V. cholerae*, monoclonal antibodies, oysters.

## INTRODUÇÃO

O *V. cholerae* sorogrupo O1 é o agente etiológico da cólera pandêmica, sendo considerado dentre os vibrios patogênicos ao homem, o mais importante e debilitante. Sete pandemias de cólera foram descritas desde 1817. A sétima pandemia iniciou em 1961 na Indonésia, disseminou-se pela Ásia e África atingindo a América Latina em 1991<sup>1</sup>.

A classificação do *V. cholerae* é baseada nos anticorpos somáticos (antígenos O) e são conhecidos pelo menos 206 sorogrupos<sup>2,3</sup>. O sorogrupo O1 é dividido em dois biótipos, o Clássico e o El Tor. Fatores antigênicos permitem a diferenciação desses dois biótipos em três sorotipos, Ogawa, Inaba e Hikojima, sendo este último raro. Em 1993, durante os surtos de cólera em Bangladesh, na Baía de Bengal e Índia detectou-se a presença de *V. cholerae* não O1<sup>4</sup>, mais tarde identificado como pertencente a um novo sorogrupo, o O139, chamado Bengal, como referência ao local da sua origem<sup>5</sup>.

Apesar do *V. cholerae* ser considerado parte da biota normal de áreas estuarinas e rios<sup>6,7</sup>, a natureza da sobrevivência e persistência de *V. cholerae* O1 toxigênico e O139 em ecossistemas aquáticos e os fatores relacionados com sua patogenicidade nestes ambientes não estão claros<sup>1</sup>. A sobrevivência pode ser decorrente da influência de fatores bióticos e abióticos, tais como: pH, temperatura, salinidade da água e associação específica da bactéria com plantas e animais aquáticos<sup>8</sup>.

A água constitui o principal veículo da cólera em áreas onde a doença é endêmica<sup>9</sup>, entretanto, os alimentos marinhos, principalmente as ostras, representam uma importante via de transmissão de *V. cholerae*<sup>10,11</sup>. O primeiro relato na literatura de transmissão de *V. cholerae* O1 biotipo El Tor por ingestão de ostras cruas foi descrito em 1986, na Flórida, EUA<sup>12</sup>. Surtos de cólera têm sido descritos mundialmente, assim como seu reaparecimento em regiões que já estavam livres<sup>13,14,15</sup>. No Brasil, de 1991 a 2001, foram descritos 168.598 casos e 2.036 óbitos. Em 2002 e 2003, não foram detectados casos confirmados de cólera. Entretanto, em Pernambuco foram confirmados 21 casos em 2004 e cinco em 2005<sup>16</sup>.

Os sintomas causados pela ingestão de *V. cholerae* O1 variam de diarreia branda a doença grave. A forma mais comum (*cholera gravis*) é causada pelas cepas do sorogrupo O1 produtoras de uma enterotoxina denominada toxina colérica (CT). Cepas não toxigênicas também podem causar a doença, porém de forma mais branda<sup>17</sup>.

A detecção de microrganismos patogênicos, em amostras de alimentos e água, é fundamental para minimizar e/ou evitar a ocorrência de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs). Os métodos tradicionais de cultura normalmente são demorados havendo, portanto, a necessidade de implantar métodos rápidos, sensíveis, específicos, simples e de baixo custo. Métodos rápidos, como a aglutinação com partículas de látex sensibilizadas com anticorpos monoclonais (AcMo), podem ser úteis para os Laboratórios de Saúde Pública na investigação, diagnóstico e prevenção de surtos de DTAs.

A primeira técnica para obtenção de AcMo de especificidade definida foi descrita por Kohler & Milstein (1975)<sup>18</sup>. Esta técnica, amplamente utilizada, baseia-se no fato de que cada linfócito B produz anticorpo de especificidade única. Consiste na fusão de células secretoras de anticorpo, isoladas de um animal imune, com células de mieloma, um tipo de tumor de linfócito B, não secretor de anticorpo, no qual foram induzidas falhas na via de síntese de nucleotídeos, tornando-os deficientes nas enzimas hipoxantina guanina fosforibosil transferase ou timidina quinase, o que faz com que não sobrevivam em meio seletivo contendo hipoxantina, aminopterina e timidina (HAT). Desta forma, somente os híbridos ou hibridomas sobrevivem, pois os linfócitos B morrem após uma a duas semanas em cultura<sup>19</sup>. As imunoglobulinas oriundas de um único clone possuem especificidade única.

O objetivo deste estudo foi avaliar a técnica de aglutinação com partículas de látex sensibilizadas com AcMo na detecção de *V. cholerae* O1 em ostras, contaminadas laboratorialmente.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Cepa

A cepa *V. cholerae* O1, não toxigênico, CETESB 16457, IAL 1965 foi obtida na Seção de Coleção de Culturas do Instituto Adolfo Lutz.

### Animais

Camundongos da linhagem BALB/C foram imunizados pela via subplantar com  $1 \times 10^2$  células inteiras de *V. cholerae*, inativadas com formalina 0,5% no volume de 10  $\mu$ L, previamente emulsificadas na mesma proporção em adjuvante completo de Freund (Sigma). Após 20 dias, os animais receberam uma dose reforço pela mesma via e a mesma quantidade de antígeno, embora a emulsão tenha sido feita em adjuvante incompleto de Freund (Sigma). Os camundongos foram sangrados pelo plexo oftálmico para análise, por meio do ensaio imunoenzimático (ELISA), da quantidade dos anticorpos produzidos antes da fusão. Utilizamos o protocolo técnico baseado em estudos para obtenção de AcMo em nosso laboratório<sup>20-24</sup>, com algumas modificações<sup>25</sup>. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de ética e pesquisa do Instituto Adolfo Lutz CTC/BM 44/99.

### Obtenção de células de linfonodos poplíteos

Foi utilizado um camundongo para a fusão celular. Três dias antes da fusão celular, que corresponde dois dias após ter sido realizada a última coleta da amostra de sangue, foi dado reforço contendo  $1 \times 10^2$  células íntegras de *V. cholerae* em solução salina. Os linfonodos poplíteos do camundongo imunizado foram retirados assepticamente e macerados com lâminas de microscopia com um dos lados do vidro esmerilhada em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco), suplementado com

L-glutamina (Gibco) a 1%, piruvato de sódio (Gibco) a 2%, meio não essencial MEM a 1%, gentamicina (Gibco) a 0,1% e HEPES (Gibco) a 1,5%. As células assim obtidas foram reservadas para a técnica de fusão celular.

O cultivo das células de mieloma P3X63-Ag8.653 foi realizado até atingirem a fase logarítmica de crescimento um dia antes da fusão (acertando a concentração para  $5 \times 10^4$  células/mL). Um dia antes da fusão foi obtido o *feeder layer* de macrófagos, injetando 5 mL de RPMI com SFB (soro fetal bovino) no peritônio de um camundongo. O lavado peritoneal foi diluído em 45 mL de meio e distribuído em placa de cultura de 96 orifícios. As placas foram incubadas a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> a 5%.

### Obtenção dos hibridomas (Fusão celular)

Os linfócitos e as células mielomatosas foram lavados separadamente utilizando o meio RPMI e centrifugados durante 5 minutos a 800xg. Os sobrenadantes foram descartados e foram adicionados 10 mL do meio, tanto no *pellet* de linfócitos como naquele das células de mieloma. Foi realizada contagem das células diluídas a 1:2 em *tryplan blue* (Gibco) a 0,1%. As células foram misturadas na proporção 1:1 (células de linfonodo/mieloma) e após centrifugação, foi realizada a fusão celular com o sedimento utilizando uma solução, previamente autoclavada, de 0,5 g de polietilenglicol 3500 (MERCK) diluída em 0,7 mL de PBS (pH 7,4), contendo 50 µL de dimetilsulfóxido (Sigma), gota a gota, por 1 min. a 37°C. Na seqüência, as células foram mantidas em repouso por 1,5 min a 37°C, foi adicionado 1 mL de RPMI com SFB, gota a gota por 1 min. a 37°C, e mais 20 mL de RPMI, gota a gota por 4 min. a 37°C. As células foram mantidas em repouso por 4 min. a 37°C. Em seguida foram centrifugadas em meio RPMI com SFB, contendo HAT a 3% (Gibco) na proporção de  $1 \times 10^6$  células por mL de meio. Após duas horas de incubação a 37°C, as células foram distribuídas em volume de 100 µL por orifício em placas contendo *feeder layers* de macrófagos e mantidas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

A primeira troca de meio foi realizada após 3 dias, as subseqüentes a cada 2 dias, e após uma semana o HAT foi substituído por hipoxantina e timidina (HT) (Gibco) a 2% e mantido por mais duas semanas, quando se passou a utilizar RPMI-SFB. A seleção dos clones por ELISA foi iniciada 10 dias após a fusão celular, quando os hibridomas já se apresentavam com bom crescimento (ocupando 1/3 do poço). O ELISA para a seleção dos clones foi feito com células íntegras de *V. cholerae*. Para a seleção foi utilizado conjugado anti-IgG de camundongo pelo interesse em obter AcMo do isótipo IgG. Os clones que apresentaram maior reatividade por ELISA foram submetidos à diluição limitante. As células selecionadas na reclonagem (2x) foram isotipadas e expandidas *in vitro* e *in vivo*. Os isótipos dos AcMo foram determinados por meio de ELISA. As placas foram sensibilizadas com 100 µL de Acs anti-IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 de camundongos diluídos a 1:1000 em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6 e incubados durante 16 h a 4°C. Na seqüência, as placas foram lavadas

com solução PBS-Tween 0,05% e bloqueadas por 1h com 200 µL de leite 5%. Repetidas as lavagens, foram incubadas com 100 µL de sobrenadante de cultura de células. Após 1h a 37°C foram feitas novas lavagens e adicionados 100 µL do conjugado de anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase na diluição 1:2000 em leite desnatado (Gloria-Brasil) 1%. Após a incubação de mais uma hora a 37°C, novas lavagens foram feitas, e a reação foi revelada com o substrato preparado com 10 µL de água oxigenada e 9 mL de uma solução de tampão (citrato-fosfato) contendo cromógeno 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB). A leitura foi feita após 15 minutos a 450 nm.

### Determinação do índice de avidéz dos anticorpos anti-bactérias íntegras de *V. cholerae*

O índice de avidéz (IA) do anticorpo 1E21B3 [IgG2a] para células íntegras de *V. cholerae* foi realizado basicamente com o mesmo procedimento utilizado para técnica de ELISA, sendo que os monoclonais foram incubados na ausência e na presença de tiocianato de potássio (KSCN) 1.5M em PBS (Sigma). O índice de avidéz foi expresso como a razão entre as médias das absorbâncias na presença de KSCN e na ausência de KSCN (com PBS)<sup>26</sup>.

### Especificidade do AcMo anti - *V. cholerae*

A especificidade dos AcMo anti - *V. cholerae* foi avaliada por *immunoblot*<sup>27</sup>. As preparações antigênicas, de células *V. cholerae* íntegras, em uma concentração de  $1 \times 10^8$  foram submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE<sup>28</sup>, com uma concentração de acrilamida de 13%, corado pelo método da prata, Comassie blue (Pharmacia). Para a análise por *immunoblot* os antígenos foram transferidos para uma membrana de nitrocelulose (BioRad). O anticorpo monoclonal selecionado foi diluído à 1:1000 e o conjugado anti-IgG (Sigma) diluído a 1:5000. Foi utilizado 3-Amino-9-ethyl carbazole (AEC) 0,4% PIERCE como substrato.

### Protocolo utilizado para a sensibilização de partículas de Látex com AcMo1E21B3

Uma alíquota de 0,75 mL de uma suspensão à 2,5% de partículas de látex (1µm de diâmetro) diluídas em PBS estéril foi centrifugada durante 6 min. a 7200xg em uma microcentrífuga. O sobrenadante foi removido e descartado. Em seguida foi acrescentado 0,75 mL de PBS e agitado (vortex) até o *pellet* se desprender completamente, sendo acrescentado mais 0,75 mL de PBS estéril. A solução foi centrifugada por mais 6 min. na mesma velocidade e o sobrenadante descartado. A seguir o *pellet* foi ressuspenso em uma solução de glutaraldeído 8% diluída em PBS. A suspensão foi agitada por 4h. Depois deste período foi acrescentado 0,75 mL de PBS, seguido de centrifugação a 7200xg/10min e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi ressuspenso em 1 mL de PBS e adicionado 0,2 mL de anticorpo monoclonal, na concentração de 1mg/mL,

purificado em coluna de Sepharose 4B-proteína A. A mistura foi agitada *overnight*, lentamente, a temperatura ambiente. O tubo foi completado com 0,5 mL de PBS, centrifugado 7200xg/10min e o sobrenadante descartado. Após este procedimento o sedimento foi ressuspensionado em 1,5 mL de uma solução a 0.2M de etanolamina, seguido de agitação a temperatura ambiente por 30 min. Essa fase é importante para bloquear os sítios das micropartículas de látex que não se ligaram o AcMo. A mistura foi centrifugada por 6 min. na mesma velocidade e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi ressuspensionado em 1,5 mL de albumina de soro bovino (BSA) e agitado 30 minutos a temperatura ambiente, para o bloqueio de sítios ativos remanescentes na partícula. A mistura foi submetida à nova centrifugação por 6 min. a 7.200xg e o sobrenadante descartado. No final do procedimento a amostra foi completada para 2,5 mL de tampão de estocagem. Os procedimentos utilizados estão de acordo com as instruções do fabricante (Polyscience - USA).

#### Amostras analisadas

As amostras de ostras foram provenientes do litoral norte do Estado de São Paulo (São Sebastião). Antes da realização dos testes, foi realizada a pesquisa de *V. cholerae* O1 nas ostras por metodologia convencional, segundo FDA<sup>29</sup>.

#### Contaminação das ostras

As ostras foram abertas assepticamente com auxílio de abridor de ostras em aço inox, previamente desinfetado. A parte comestível (tecido mole e intervalvar) foi retirada da concha e homogeneizada. Deste homogeneizado, foram pesados 25g e adicionado 225 mL de água peptonada alcalina (APA); esta alíquota foi dividida em dois frascos. Em um dos frascos foi adicionado 50 µL da cultura de *V. cholerae* (controle positivo) e o outro, sem a adição da bactéria, foi utilizado como controle negativo; ambos foram incubados a 35°C/18h.

#### Teste de aglutinação em látex sensibilizado com AcMo

A partir dos frascos (controle positivo e negativo) foram realizadas as seguintes diluições: 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 e 1/32. O teste de aglutinação foi realizado em uma placa por meio da adição de 20 µL de cada diluição e 20 µL de partículas de látex sensibilizadas. Após agitação (movimentos circulares), verificava-se a presença de aglutinação.

A quantificação de *V. cholerae* em cada diluição utilizada no ensaio foi realizada por semeadura em superfície no ágar tiosulfato-citrato-sais-biliares-sacarose (TCBS).

## RESULTADOS

#### O clone 1E21B3

O clone 1E21B3 foi selecionado e o sobrenadante de cultura de células foi precipitado com sulfato de amônio a

50%. O AcMo obtido após precipitação com sulfato de amônio foi purificado em coluna de Sepharose-4B-Proteína A<sup>22</sup>.

#### Análise de diferentes lotes do AcMo 1E21B3

Por meio de ELISA podemos observar boa reprodutibilidade da quantidade de anticorpos IgG2a produzidos para o clone 1E21B3 selecionado, produtor de AcMo para células íntegras de *V. cholerae* obtidas de diferentes partidas. Ascite foi produzida em camundongos<sup>22</sup>, a análise por meio de ELISA (Figura 1) mostra a reprodutibilidade dos lotes obtidos.

#### Especificidade e caracterização imunológica por SDS-PAGE e Immunoblot do AcMo produzido

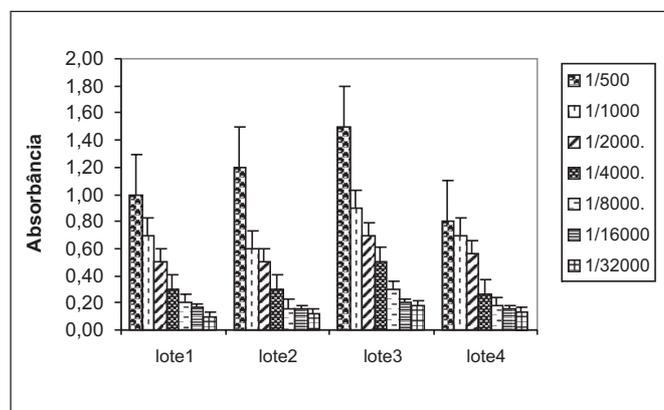
O perfil eletroforético de peptídeos de *V. cholerae* foi demonstrado utilizando o método de coloração por prata (Figura 2. 1.A). O AcMo 1E21B3 utilizado em nosso estudo reconheceu o antígeno de massa molecular de 4 kDa aproximadamente (Figura 2. 1.B). Na Figura 2. 2. podemos observar o perfil de antígenos de células íntegras de *V. cholerae* após separação eletroforética e coradas por *Commasie blue* R (Pharmacie). Antígenos na faixa de 2 a 180 kDa foram analisados.

#### Índice de avides

O clone selecionado do isótipo IgG2a, apresentou um índice de avides de 96%.

#### Análise do teste de aglutinação em látex sensibilizado com AcMo

A contagem de cada diluição de *V. cholerae* O1 foi de: 2,0x10<sup>3</sup> UFC, 1,0x10<sup>3</sup> UFC, 5,0x10<sup>2</sup> UFC, 2,5x10<sup>2</sup> UFC, 1,2x10<sup>2</sup> UFC para as diluições 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 e 1/32 respectivamente. O resultado foi positivo até a diluição de 1/32 (Figura 3. A). Importante salientar que na amostra



**Figura 1.** Análise de sobrenadante de cultura de células dos lotes (1 a 4) do AcMo 1E21B3 do isótipo IgG selecionado por meio de ELISA utilizando células íntegras de *V. cholerae*. Os resultados mostram a média de três ensaios independentes.

utilizada antes da contaminação não havia *V. cholerae*, mas foi detectada a presença de outras bactérias, tais como: *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas* spp e outros vibrios. A especificidade da reação de aglutinação foi de 100%.

## DISCUSSÃO

No amplo quadro da investigação científica na área da saúde observam-se inúmeras aplicações para os AcMo, pois estes anticorpos possuem especificidade única<sup>18</sup>, como também observado em estudos realizados em nosso laboratório<sup>30,31,32,33</sup>. Dentre estas destacam-se a identificação de tumores, de estruturas protéicas, em testes de identificação de antígenos de histocompatibilidade, técnicas de purificação de moléculas por cromatografia de afinidade, de marcadores fenotípicos únicos

para determinados tipos celulares e para análise funcional de moléculas secretadas ou de superfície celular<sup>34</sup>.

O local de administração de um antígeno determinará o local em que células são ativadas. A vantagem do método para a produção de anticorpo monoclonal utilizando linfonodos poplíteos permitiu a produção de um anticorpo monoclonal estável em um curto período de tempo para *V. cholerae*.

O emprego de AcMo se justifica por se tratar de imunoglobulina com especificidade única e como tal representa um excelente instrumento na identificação de estruturas. A utilização de misturas de anticorpos diferentes, muitas vezes limita sua aplicação, devido à múltipla especificidade para diferentes epítomos antigênicos e heterogeneidade da resposta imune humoral<sup>35</sup>.

O isolamento e a identificação de microrganismos patogênicos ao homem visam, principalmente, o monitoramento das espécies circulantes no meio ambiente e em alimentos, bem como o controle e prevenção destes microrganismos, para a caracterização dos perigos bacteriológicos nos alimentos, bem como seu controle<sup>36</sup>. No caso específico da cólera, dados internacionais têm demonstrado que sua introdução em um país dificilmente pode ser evitada. Entretanto, a disseminação pode ser controlada, quando a infraestrutura de saneamento básico é adequada e existe um sistema de vigilância epidemiológica das diarreias e monitoramento ambiental que permitam sua detecção precoce.

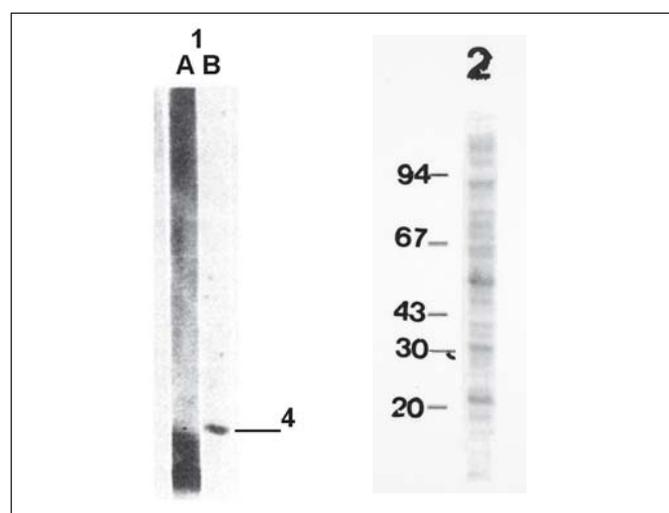
As reações de aglutinação utilizam partículas de látex que são sensibilizadas com antígenos ou anticorpos. Como toda prova de aglutinação, baseia-se no princípio de que as partículas sensibilizadas se aglutinam na presença de antígenos ou anticorpos. Pode ser utilizada como método de triagem, principalmente em estudos epidemiológicos, valendo salientar a especificidade do método.

O látex reativo utilizado é uma suspensão de partículas de tamanho uniforme sensibilizadas com AcMo específico para *V. cholerae*. As partículas de látex reagem prontamente formando a reação antígeno – anticorpo, perdendo o aspecto uniforme, iniciando a formação de uma malha.

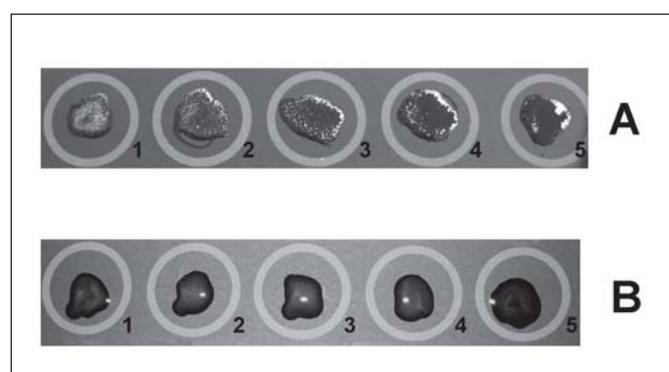
Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que foi possível detectar números de células de *V. cholerae* abaixo da dose infectante, que em indivíduos sadios é relativamente alta, em média,  $10^8$  UFC/g do alimento. Além disso, a detecção deste patógeno foi realizada em 18 horas.

Na metodologia convencional a detecção de *V. cholerae* em alimentos, leva em média de 7 a 10 dias. Portanto, a liberação do resultado demanda tempo. A Seção de Microbiologia Alimentar, do Instituto Adolfo Lutz Central, realiza monitoramento de *V. cholerae* O1 em amostras do litoral de São Paulo, desta forma a introdução de novas técnicas, como a de látex, irá diminuir o tempo e facilitar o trabalho.

A redução no tempo de diagnóstico deste patógeno permitirá que medidas de controle possam ser tomadas de forma rápida pelos órgãos competentes, prevenindo a disseminação da doença e surgimento de novos casos.



**Figura 2.** 1.a) SDS-PAGE de células íntegras de *V. cholerae* após coloração por meio da prata. 1.b) Immunoblot- Reatividade do AcMo 1E21B3. 2. SDS-PAGE de células íntegras de *V. cholerae* após coloração por Coomassie .



**Figure 3.** A) Reação de látex para *V. cholerae* : 20  $\mu$ L da amostra (positiva) diluída (1) 1/2, (2) 1/4, (3) 1/8, (4) 1/16 e (5) 1/32. B) amostra (negativa) diluída (1) 1/2, (2) 1/4, (3) 1/16 e (5) 1/32, adicionadas de 20 $\mu$ L de partículas de látex - AcMo para *V. cholerae*

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FAPESP, Projeto Temático 00/05834-7 e o Instituto Adolfo Lutz pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

1. Faruque SM, Albert MJ, Mekalanos JJ. Epidemiology, Genetics and Ecology of Toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62 (4): 1301-14.
2. Shimada T et al. Two strains of *Vibrio cholerae* non-O1 possessing somatic (O) antigen factors in common with *Vibrio cholerae* serogroup O139 synonym "Bengal". *Curr Microbiol* 1994; 29: 331-3.
3. Yamai S, Okitsu T, Shimada T, Katsube Y. Distribution of serogroups of *Vibrio cholerae* non-O1 non-O139 with specific reference to their ability to produce cholera toxin and addition of novel serogroups. *Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases* 1997; 71: 1037-45.
4. Albert MJ et al. Large epidemic of cholera-like disease in Bangladesh caused by *Vibrio cholerae* O139 synonym Bengal. *Lancet* 1993; 342: 387-90.
5. Shimada T et al. Outbreak of *Vibrio cholerae* non-O1 in Índia and Bangladesh. *Lancet* 1993; 341:1347.
6. Carvajal GH, Sanchez J, Ayala ME, Hase A. Differences among marine and hospital strains of *Vibrio cholerae* during Peruvian epidemic. *J Gen Appl Microbiol* 1998; 44(1):27-33.
7. Eyles MJ, Davey GR. *Vibrio cholerae* and enteric bacteria in oyster-producing areas of two urban estuaries in Australia. *Int J Food Microbiol* 1998; 6: 207-18.
8. Borroto RJ. La ecología de *Vibrio cholerae* serogrupo O1 en ambientes acuáticos. *Rev Panam Salud Publica* 1997; 1(1):3-8.
9. Varnam AH, Evans MG. *Foodborne pathogens*. London: Wolfe Publishing; 1991.
10. Tauxe RV, Mintz ED, Quick RE. Epidemiologic Cholera in the New World: Translating Field Epidemiology into New Prevention Strategies. *Emerg Infect Dis* 1995; 1(4):141-6.
11. Lipp EK, Rose JB. The role of seafood in foodborne diseases in the United States of America. *Rev Sci Tech Off Int Epiz Paris* 1997; 16(2):620-40.
12. Klontz KC, Tauxe RV, Cook WL, Riley WH, Wachsmuth K. Cholera after the consumption of raw oysters. *Ann Inter Med* 1991; 107(6): 846-8.
13. D'oro LC, Merlo E, Ariano E, Silvestri MG, Ceraminiello A, Negri E, La Vecchia C. La *Vibrio cholerae* Outbreak in Italy. *Emerg Infect Dis* 1999; 5(2):300-1.
14. Germani Y, Quilici ML, Glaziou P, Mattered D, Morvan J, Fournier JM. Emergence of Cholera in the Central African Republic. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998; 17: 888-90.
15. Tauxe RV. Emerging Foodborne Diseases: An Evolving Public Health Challenge. *Emerg Infect Dis* 1997; 3(4): 425-34.
16. Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). Cólera: a situação da doença no Brasil. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/svs/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=21688](http://portal.saude.gov.br/portal/svs/visualizar_texto.cfm?idtxt=21688). Acesso em: 28 de ago. 2006.
17. ICMSF. *Microorganisms in foods 5 – Microbiological Specifications of Food Pathogens*. London: Blackie Academic, 1996. 513p.
18. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256: 495-7.
19. Peterson NC. Advances in monoclonal antibody technology: genetic engineering of mice, cells, and immunoglobulins. *ILAR J* 2005; 46(3):314-9.
20. Belo EF, Coutinho LM, Ferraz AS, De Gaspari EN. Production of monoclonal antibody to subtype 9 of *Neisseria meningitidis* and the distribution of this subtype in Brazil. *Braz J Infect Dis* 2004; 8(6): 407-18.
21. De Gaspari EN, Zollinger W. Expression of class 5 antigens by meningococcal strains obtained from patients in Brazil and evaluation of two new monoclonal antibodies. *Braz J Infect Dis* 2001; 5(3):143-53.
22. De Gaspari EN. Production and characterization of a new monoclonal antibody against *Neisseria meningitidis*: study of the cross-reactivity with different bacterial genera. *Hybridoma* 2000; 19(6): 445-53.
23. Espindola NM, De Gaspari EN, Nakamura PM, VAZ, AJ. Production of monoclonal antibodies anti-*Taenia crassiceps* cysticerci with cross-reactivity with *Taenia solium* antigens. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2000; 42(3): 175-7.
24. De-Gaspari EN, Ribeiro-Filho AA, Zollinger WD. The use of filter paper monoclonal antibodies in a Dot-blot test for typing *Neisseria meningitidis* B. *Braz J Med Biol Res* 1994; 27(12):2889-93.
25. Holmdahl IR, Moran T, Andersson M. A rapid and efficient immunization protocol for production of monoclonal antibodies reactive with autoantigens. *J Immunol Methods* 1985; 83:379-84.
26. Chackerian B, Lowy DR, Schiller JT. Conjugation of a self-antigen to papillomavirus-like particles allows for efficient induction of protective autoantibodies. *J Clin Invest* 2001; 108:415-23.
27. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology*. 1992; 24:145-9.
28. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-5.
29. DePaola AJr, Kaysner CA. "Vibrio". In: FDA – Bacteriological Analytical Manual online. New York: AOAC International, 2001. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-9.html>. Acesso em: 10 de abr. 2005.
30. Carmo MAS. Estudo da imunogenicidade da proteína de classe 5C de *Neisseria meningitidis* B em camundongos imunizados pela via nasal. (Dissertação de Mestrado). São Paulo (SP): Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2005.
31. Coutinho, LMCC. Uso de anticorpos monoclonais na seleção de antígenos lipopolissacaríde da cepa epidêmica de B:4:P1.15 de *Neisseria meningitidis*: imunização intranasal. (Dissertação de Mestrado). São Paulo (SP): Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2002.
32. Seneme Ferraz A. Avaliação da resposta imune em coelhos pela via de imunização nasal com antígenos de *Neisseria meningitidis* B selecionados para os imunotipos L379<sup>+</sup> e L8<sup>+</sup> por meio de anticorpos monoclonais. (Dissertação de Mestrado). São Paulo (SP): Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2005.
33. Belo EFT. Expressão antigênica de LPS de cepas meningocócicas prevalentes no Brasil e produção de anticorpos monoclonais como subsídios para estudos epidemiológicos. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2002.
34. Ansell PR. Hybridoma technology: a view from the patent arena. *Immunol Today* 2000; 21(8): 357-8.
35. Bach JF, Fracchia GN, Chatenoud L. Safety and efficacy of therapeutic monoclonal antibodies in clinical therapy. *Immunol Today* 1993; 14:421-5.
36. Ristori CA. Bactérias patogênicas em ostras (*Crassostrea brasiliensis*) e água da região estuarina de Cananéia, litoral sul do Estado de São Paulo. (Dissertação de Mestrado). São Paulo (SP): Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2000.

# Soroprevalência de HIV, sífilis, hepatite B e C em mulheres do Centro de Ressocialização Feminino, Rio Claro, São Paulo

Seroprevalence of HIV, syphilis, and hepatitis B and C among women confined at Centro de Ressocialização Feminino of Rio Claro, São Paulo

RIALA6/1078

José Antonio Pistarín Berra<sup>1\*</sup>, Lílíana Brancacío Bacetti<sup>1</sup>, Alcione Alves Buzo<sup>2</sup>

\* Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Rua 10, 152, CEP 13501-090, Rio Claro, São Paulo, Fone/fax: (0XX19) 3524-3070. E-mail: pistarín@hotmail.com.

<sup>1</sup> Instituto Adolfo Lutz - Laboratório Regional de Rio Claro

<sup>2</sup> Serviço de Atendimento Especializado de Rio Claro-SAE/Rio Claro

Recebido: 06/04/2006 – Aceito para publicação: 02/08/2006

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi conhecer a soroprevalência de HIV, hepatites B e C e sífilis, em mulheres do Centro de Ressocialização Feminino de Rio Claro, SP. Foram analisados os resultados laboratoriais de 225 amostras de soro encaminhadas ao IAL - Rio Claro, entre março de 2003 e junho de 2004. Os marcadores sorológicos para as hepatites (HBsAg, anti HBsAg, anti HBc e anti HCV) e os anticorpos anti-HIV foram detectados por ELISA. Amostras positivas e/ou indeterminadas para HIV, foram submetidas às técnicas de Imunofluorescência Indireta e Western Blot. No imunodiagnóstico de sífilis foram utilizados os testes de VDRL e de TPHA. Foram detectadas as seguintes soropositividades: HIV - 3,6%; VDRL/TPHA - 3,0%; anti HCV - 7,5%; HBsAg - 1,3%; anti -HBsAg - 20,1%; anti-HBc - 8,5%. Cerca de 63 % das amostras positivas para HIV apresentaram soropositividades concomitantes para: sífilis (01); anti HCV (02); HBsAg (01) e HBsAg/anti HCV (01). As amostras analisadas foram de mulheres de 18 a 61 anos de idade, sendo 70,2% pertencentes à faixa etária de 21 a 40 anos. O presente estudo reforça a importância do diagnóstico precoce das DST/aids em mulheres ingressantes nas instituições, minimizando a disseminação das doenças dentro e fora do sistema prisional.

**Palavras-Chave.** soroprevalência, HIV, sífilis, hepatites B e C, mulheres encarceradas (reeducandas)

## ABSTRACT

This study presents the seroprevalence rates of HIV, syphilis and hepatitis B and C viruses among female individuals confined at Centro de Ressocialização Feminino of Rio Claro (CRF-RC), São Paulo State. A total of 225 serum samples sent from CRF-RC, during the period from March 2003 to June 2004, were analysed at Rio Claro Regional Laboratory of Instituto Adolfo Lutz. For determining hepatitis B and C markers, and for HIV screening testing commercially available ELISA reagents kits were employed. HIV positive and indeterminate samples were tested by IFI and/or Western Blot. Syphilis laboratory markers were detected by means of VDRL and TPHA assays. The prevalence value found for HIV and syphilis were 3.6% and 3.0%, respectively, and for hepatitis B and C markers were: 1.3% (HBsAg); 20.1% (anti-HBsAg); 8.5% (anti-HBc), and 7.5% (anti-HCV). About 63% of HIV positive samples also showed positivity for hepatitis B and C markers and/or syphilis. This study emphasizes the relevance in performing serological testing for STD among individuals confined in prisons or jails in order to avoid or to minimize the STD transmission to other persons who live in or outside of a penal system.

**Key Word.** female inmate, seroprevalences of, HIV, syphilis, hepatitis B and C.

## INTRODUÇÃO

Vários estudos têm apresentado evidências significativas de que populações confinadas em presídios, centros de ressocialização e outros, estão mais expostas a contraírem doenças infecto-contagiosas (DST/Aids; Hepatites, Sífilis e outras), em relação à população em geral, devido ao acúmulo dos fatores de risco: envolvimento com drogas injetáveis, superpopulação e promiscuidade. A alta rotatividade (transferência) dos indivíduos entre as unidades prisionais funciona como fator de disseminação e propagação das doenças. Além disto os indivíduos pertencem, de uma maneira geral, a grupos populacionais desfavorecidos e expostos a riscos múltiplos, carentes de programas de saúde, sociais e educacionais, e que muitas vezes ingressam no sistema em condições precárias de saúde<sup>1-6</sup>.

O controle da disseminação de doenças infecto-contagiosas envolvendo tais indivíduos apresenta muitas dificuldades, pois estes não se encontram isolados da sociedade mantendo vínculos com a população interna e externa, decorrente do tipo de pena, permissão de visitas íntimas, término da sentença, reincidência, transferência de unidade prisional e outros<sup>5</sup>.

A Organização Mundial da Saúde (OMS)<sup>3,5</sup> recomenda a realização destes estudos, em particular nas populações carcerárias, para que o poder público possa formular/implementar políticas de saúde, relacionadas com a prevenção e o tratamento, minimizando a disseminação das DST e do HIV<sup>3,5</sup>.

No Sistema Penitenciário Brasileiro existem cerca de 230.000 pessoas cumprindo penas, sendo que mulheres representam, aproximadamente, 3,7% do total de detentos no país. A população feminina confinada constitui um grupo particularmente vulnerável as DSTs, pois geralmente apresenta comportamento relacionado com tráfico e uso de drogas ilícitas, álcool e prostituição<sup>3</sup>.

O Estado de São Paulo mantém cerca de 40% (~ 131.000) do total de presos do país, possuindo 134 unidades prisionais, 21 centros de ressocialização masculinos (CR) e 4 centros de ressocialização femininos (CRF)<sup>7</sup>.

O Centro de Ressocialização Feminino de Rio Claro (CRF- RC) foi inaugurado em 27 de julho de 2002, possuindo 120 vagas distribuídas nos diferentes tipos de regime (regime fechado, aberto e semi-aberto). O objetivo da unidade é criar condições para a reabsorção das reeducandas pela sociedade desenvolvendo atividades educacionais e de alfabetização, oficinas de trabalhos manuais (tricô, crochê, artesanatos), teatro, dança e salão de beleza, apoio psicológico e outras, em parceria com a Organização não Governamental (ONG/ PARC)<sup>7</sup>.

O objetivo do presente estudo foi conhecer a soroprevalência de HIV, marcadores de hepatites B e C e sífilis, em mulheres do Centro de Ressocialização Feminino de Rio Claro - SP.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material

Foram analisados os resultados dos testes sorológicos para diagnóstico de HIV, sífilis, hepatite B e C, realizados pelo Instituto Adolfo Lutz - Laboratório Regional de Rio Claro, no período de março de 2003 a junho de 2004, em 225 amostras de soro de mulheres do Centro de Ressocialização Feminino de Rio Claro.

### Métodos

Os exames laboratoriais foram realizados utilizando as seguintes metodologias:

**AIDS / HIV** – A sorologia para triagem de anticorpos anti -HIV foi realizada por dois ensaios de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) distintos, em paralelo, de procedência, princípios metodológicos e/ou antígenos virais diferentes<sup>8</sup>: ABBOTT-MUREX (Murex HIV -1.2.0. – Central Road Temple Hill Dartford Kent – Inglaterra) e ORGANON-TÉCNICA (Virinostika HIV Uniform II plus O –Boxtel –Holanda), registrados no Ministério da Saúde. As amostras cujos resultados foram positivos ou indeterminados foram retestadas e submetidas aos testes confirmatórios, utilizando-se a reação de Imunofluorescência Indireta -IFI (Bio-Manguinhos / Fio Cruz - Rio de Janeiro–RJ) e Western-Blot (Genelabs-Diagnóstics (HIV Blot 2.2 Singapor – Singapura).

### Sífilis

Foram aplicados dois testes distintos para o diagnóstico de sífilis: VDRL (*Veneral Disease Research Laboratories Tests*) - RPR BRAS – Laborclin, Pinhais-Pr, Br, para pesquisa de anticorpos anti-treponêmicos. Amostras que apresentaram reações com aspecto grumoso ou granulação grosseira foram submetidas à titulação com diluições seriadas. Amostras, cujos resultados foram positivos ou indeterminados para VDRL, foram submetidas ao teste TPHA, teste treponêmico de hemaglutinação passiva (Syphagem TPHA - Biokit, Barcelona-Espanha), para a detecção de anticorpos específicos, em soros diluídos 1/20. Foram consideradas amostras positivas as que apresentaram resultados reagentes para VDRL, em títulos maiores ou iguais à 1/8 e TPHA reagente, em soros diluídos 1/20. Resultados TPHA reagentes para títulos menores ou iguais 1/4 foram excluídos deste estudo por necessitarem de coleta de novas amostras para definição do diagnóstico, pois podem representar infecção recente ou cicatriz sorológica<sup>1,9,10</sup>.

### Hepatite B

Foram aplicados testes laboratoriais para 03 marcadores distintos: Anti -HBsAg - (DiaSorin, ETI-AB-AUK-3, Saluggia -Vercelli- Itália); Anti-HBc total – (DiaSorin, ETI-AB-COREK-2, Saluggia-Vercelli- Itália) e HBsAg – (DiaSorin ETI -MAK-3 - Saluggia-Vercelli – Itália).

### Hepatite C

O diagnóstico de hepatite C foi realizado através da detecção de anticorpos contra antígeno HCV-anti-HCV total – (DiaSorin ETI - AB -HCVK -3 -Madri- Espanha).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos exames laboratoriais para os diferentes marcadores sorológicos encontram-se apresentados na Tabela 1.

Embora não possam ser generalizados, os resultados obtidos podem ser inferidos como sendo parte do perfil de mulheres que estão cumprindo pena de reclusão no Estado de São Paulo. Em relação à população analisada: a idade variou entre 18 e 61 anos; 70,2 % pertenciam à faixa etária de 21 a 40 anos; 31,0 % tinham o ensino fundamental completo; 95,0 % cumpriam pena por crimes relacionados ao uso e tráfico de drogas; 89,0 % cumpriam pena em regime fechado e 8,0 % em regime semi-aberto.

A prevalência encontrada para HIV foi de 3,6 %, valor bastante superior ao estimado pelo Ministério da Saúde para a população brasileira de 0,5 %<sup>11</sup> e inferior ao relatado em estudos realizados em indivíduos do Sistema Penitenciário do Estado do Rio de Janeiro<sup>5</sup>, na Penitenciária Feminina do Carandiru - SP<sup>2</sup> e na Penitenciária Feminina do Butantã – SP<sup>6</sup>, os quais detectaram prevalências de 7,5 %, 14,5 % e 13,9 %, respectivamente. Setenta e cinco por cento (75,0 %) das amostras soropositivas para HIV pertenciam à mulheres com idade entre 31 a 40 anos.

A prevalência de sífilis determinada foi 3,0%. Entre populações encarceradas investigações mostram resultados bastante diversos: Penitenciária Feminina do Carandiru -SP<sup>2</sup> (5,7 %); Sistema Prisional Brasileiro<sup>3</sup> (18,1 %).

A prevalência do marcador de hepatite C (anti HCV) entre as reeducandas (7,6 %) foi superior ao índice da região Sudeste (1,43 %) e do Estado de São Paulo (1,42 %)<sup>12</sup> e para doadores de sangue do Hemocentro de Ribeirão Preto<sup>13</sup> (1,15 %); bastante inferior ao detectado no Sistema Prisional Brasileiro<sup>3</sup> (34,1 %) e em pacientes de hemodiálise (52,0 %)<sup>14</sup>.

Os resultados dos testes realizados para os marcadores de hepatite B revelaram prevalência de 23,5 % para pelo menos um dos 3 marcadores testados. A prevalência dos marcadores HBsAg, anti-HBsAg e anti-HBc, isoladamente, foi de: 0,9 %; 13,8 % e 2,2 %. A prevalência relatada em indivíduos submetidos a exames de sangue nas unidades de saúde de Ribeirão Preto<sup>15</sup> foi de 0,3 %, 15,0 % e 2,0 %, respectivamente. Entre doadores de sangue do Estado de Santa Catarina foram detectadas prevalências de 0,64 % para HBsAg e 5,35 % para anti – HBc<sup>16</sup>.

A prevalência isolada do marcador anti-HBsAg (13,8 %) entre as reeducandas foi superior à encontrada entre os trabalhadores do Hospital Universitário de Natal<sup>17</sup> (5,2 %), enquanto que a presença isolada de anti - HBc (2,2 %) entre as reeducandas, foi inferior à encontrada entre os trabalhadores do Hospital Universitário de Natal (8,1 %) e entre os profissionais de hemodiálise de Goiânia<sup>18</sup> (3,3 %).

Em 6,2 % das amostras foi detectada a prevalência concomitante de anti-HBc e anti – HBsAg, marcadores estes que demonstram evidências sorológicas de infecção prévia pelo HBV.

A prevalência do marcador HBsAg (1,3 %), encontrada no presente estudo, indica baixo nível de circulação do vírus da hepatite B entre as reeducandas; valor próximo aos detectados no Estado de São Paulo (1,04 %)<sup>12</sup> e na região Sudeste do Brasil (0,8 %)<sup>16</sup> e inferior ao índice de 2,9 % encontrado em trabalhadores do hospital universitário de Natal<sup>17</sup>. As variações encontradas na literatura indicam que a prevalência do vírus pode variar de acordo com a região do país, atividade profissional e modo de vida da população.

Entre as 8 reeducandas soropositivas para HIV foram detectadas as seguintes concomitâncias de marcadores: HIV/ HBsAg – 01 amostra; HIV/sífilis – 01 amostra; HIV/anti HCV – 02 amostras ; HIV/HBsAg/anti HCV – 01 amostra; nenhum marcador – 03 amostras. Os valores de prevalências concomitantes (37,5 %) detectados para HIV/anti HCV e HIV/ HBsAg foram superiores aos encontrados em pacientes HIV positivos tratados na Divisão de Doenças infecciosas, da Universidade de São Paulo<sup>19</sup>, de 17,7 % e 5,7 %, respectivamente. Em outro estudo realizado com pacientes soropositivos para

**Tabela 1.** Resultados obtidos nos testes sorológicos aplicados em 225 amostras provenientes do Centro de Ressocialização Feminino de Rio Claro, São Paulo.

Marcadores	Reagente		Indeterminado		Negativo	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<b>HIV</b>	08	3,6	1	0,4	216	96,0
<b>VDRL *</b>	07	3,0	-	-	218	97,0
<b>TPHA</b>	12	5,3	-	-	213	94,7
<b>Anti – HBsAg</b>	46	20,1	2	0,9	178	79,0
<b>Anti – HBc</b>	19	8,5	-	-	206	91,5
<b>HBsAg</b>	3	1,3	1	0,4	221	98,3
<b>Anti – HCV</b>	17	7,5	1	0,5	207	92,0

\* As amostras reagentes para VDRL (títulos  $\geq 1/8$ ) apresentaram os resultados de TPHA reagentes (diluição 1/20)

HIV no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto<sup>20</sup> a prevalência do marcador HBsAg encontrada foi 8,5 %.

## CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo podem colaborar na avaliação de questões de saúde no sistema prisional e para a saúde pública, mostrando a necessidade da implementação de políticas públicas de assistência à saúde voltadas ao diagnóstico e tratamento precoce das doenças, em particular as DSTs e Aids, minimizando a transmissão dentro e fora das unidades do sistema prisional do estado.

## AGRADECIMENTOS

Aos técnicos do Laboratório de Sorologia e Imunologia do Instituto Adolfo Lutz – Laboratório Regional de Rio Claro pela realização dos ensaios laboratoriais.

À Dra Irani, Diretora do Centro de Ressocialização Feminino de Rio Claro, pela pronta e imediata colaboração.

## REFERÊNCIAS

1. Berra JAP, Bacetti LB, Ramos SDP. Prevalência de sífilis em caminhoneiros usuários da Rodovia Anhanguera, SP 330, Brasil. *Bol Inst Adolfo Lutz*. 2003;13(3):4-5.
2. Lopes F, Latorre MRDO, Pignatari ACC, Buchalla CM. Prevalência de HIV, papilomavirus humano e sífilis na Penitenciária Feminina da Capital, São Paulo, 1997-1998. *Cad. Saúde Pública*.1999;17(6):1473-80.
3. Massad E, Rozman M, Azevedo RS, Silveira ASB et al. Seroprevalence of HIV, HCV and syphilis in Brazilian prisoners: Preponderance of parenteral transmission. *Eur J Epidemiol*.1999;15: 439-45.
4. Miranda AE, Merçon-De-Vargas PR, Viana MC. Saúde sexual e reprodutiva em penitenciária feminina, Espírito Santo, Brasil. *Rev. Saúde Pública*. 2004;38(2):255-60.
5. Rio De Janeiro. Superintendência de Saúde da Secretaria de Estado de Direitos Humanos – SEDHU - RJ. Perfil dos internos na “porta-de-entrada” do Sistema Penitenciário do Rio de Janeiro nos últimos 5 anos (1996-2000). Disponível em: URL: <http://www.supersaude.rj.gov.br/pesquisas.htm>. Acesso em: 12 ago 2003.
6. Strazza L. Estudo da vulnerabilidade à infecção pelo HIV, em detentas da Penitenciária Feminina do Butantã – SP avaliada por técnicas sorológicas e pela técnica do TAT. 2003. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003. Disponível em: URL: <http://www.saudetotal.com.br/dim/sexseg/tese%20%>>. Acesso em: 20 jan. 2004.
7. São Paulo. Secretaria da Administração Penitenciária. Disponível em: URL: <http://www.admpenitenciaria.sp.gov.br>. Acesso em: 12 ago 2004.
8. Brasil. Portaria nº 59, de 30 de janeiro de 2003 do Ministério da Saúde. *Diário Oficial da União*, 22 jan. 2003. Seção 1, n.22, p.87-89.
9. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Infecções por espiroquetas. In: Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC, editors. *Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido*. 5ª ed. Rio de Janeiro: Medsi Editora Médica e Científica Ltda; 2001. p. 965-75.
10. Wallach J. Doenças Infecciosas. In: Wallach J. *Interpretação de Exames de Laboratório*, 6ª ed. Rio de Janeiro: Medsi Editora Médica e Científica Ltda, 1999, p. 821-29.
11. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Coordenação Nacional de DST e Aids. *A Experiência do Programa Brasileiro de Aids 2002*. Brasília, 30 p. (Série Programa Nacional, n.2).
12. São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde. Centro de Vigilância Epidemiológica. *Guia de Orientações Técnicas Hepatite B e C*, 2002; p.5.
13. Valente VB. Estudo da distribuição dos marcadores sorológicos das hepatites B e C entre doadores de sangue do Hemocentro de Ribeirão Preto, SP. Disponível em: URL: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/17/17139/tde>. Acesso em: 19 nov. 2004.
14. Medeiros MTG, Lima JMC, Lima JWO, Campos HH, Medeiros MMC, Coelho-Filho, JM. Prevalência e fatores associados à hepatite C em pacientes de hemodiálise. *Rev. Saúde Pública*.2004;38(2):187-93.
15. Miranda, LVG, Passos, ADC, Figueiredo, JFC, Gaspar, AMC, Yoshida, CFT. Marcadores sorológicos de hepatite B em indivíduos submetidos a exames de sangue em unidades de saúde. *Rev. Saúde Pública*.2000;4(3):286-91.
16. Rosini N, Mousse D, Spada C, Treitinger A. Seroprevalence of HbsAg, anti-HBc and anti-HCV in Southern Brazil, 1999-2001. *B. J. I. D*. 2003;7(4):262-67.
17. Fernandes JV, Braz RFS, Neto FVA., Silva MA., Costa NF, Ferreira AM. Prevalência de marcadores sorológicos do vírus da hepatite B em trabalhadores do serviço hospitalar. *Rev Saúde Pública*.1999;33(2):1-13.
18. Lopes CLR, Martins RMB, Teles SA, Almeida ES, Maggi PS, Yoshida CFT. Perfil soropidemiológico da infecção pelo vírus da hepatite B em profissionais das unidades de hemodiálise de Goiânia – Goiás, Brasil Central. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2001;34(6): 543-48.
19. Mendes-Corrêa MCJ, Baroni AA, Cavalheiro NP, Tengan FM, Guastini C. Prevalence of hepatitis B and C in the sera of patients with HIV infection in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop.S. Paulo*. 2000;42(2):81-5.
20. Souza MG, Passos ADC, Machado AA, Figueiredo JFC, Esmeraldino LE. Co-infecção HIV e vírus da hepatite B: prevalência e fatores de risco. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2004;37(5):391-95.

# Distribuição dos genótipos do HCV em pacientes das regiões de Botucatu, Bauru e Assis, SP, Brasil

## HCV genotypes distribution in patients from Botucatu, Bauru and Assis, São Paulo State, Brazil

RIALA6/1079

Sílvia M. CORVINO<sup>1\*</sup>, Rita M.S. HENRIQUES<sup>2</sup>, Rejane M.T. GROTTTO<sup>2</sup>, Maria Inês de M.C. PARDINI<sup>2</sup>

\* Endereço para Correspondência: <sup>1</sup> Instituto Adolfo Lutz, Laboratório I de Sorocaba, Rua Gino Cariola, 88. Jd. Paraíso, Botucatu, São Paulo, CEP18609-60, fone 0 XX (14) 38116234 R: 214, e-mail: silma\_cor@yahoo.com.br

<sup>2</sup> UNESP- Faculdade de Medicina, Laboratório de Biologia Molecular / Hepatites Virais, Botucatu, São Paulo.

Recebido: 26/06/2006 – Aceito para publicação: 30/08/2006

### RESUMO

Com objetivo de avaliar a distribuição dos genótipos do HCV em pacientes de Botucatu, Bauru, Assis e regiões, foram analisadas 1.018 amostras assim distribuídas: Botucatu (508), Bauru (415) e Assis (95) com sorologia anti-HCV reagente pela técnica ELISA (*Enzyme - linked immunosorbent assay*) e detectadas por Biologia Molecular RT-PCR (*reverse transcription Polymerase Chain Reaction - Roche®*). Genótipos foram determinados pela tecnologia LiPA (*Line probe assay - Bayer*) que permite detecção de 6 genótipos e subtipos mais comuns. Distribuição dos genótipos na região: genótipo 1 (62,9%), genótipo 3 (34,5%), genótipo 2 presente nas regiões de Botucatu e Bauru (2,1%), genótipo 5 em Botucatu (0,2%). Distribuição dos subtipos: Região de Botucatu - subtipos: 1a (25,0%), 1b (29,3%), 1a/1b (3,5%), 2b (0,6%), 3a (35,0%), 5a (0,2%). Região de Bauru - subtipos: 1a (31,1%), 1b (27,2%), 1a /1b (2,4%), 2 b (1,9%), 2 a/ 2c (0,2%), 3a (32,3%). Região de Assis - subtipos: 1a (26,3%), 1b (26,3%), 1a /1b (2,1%), 3a (41,1%). A técnica utilizada não permitiu a diferenciação dos subtipos em 5,1% das amostras. A distribuição dos genótipos nestas regiões foi similar às outras regiões do Brasil e do mundo ocidental (Europa Ocidental e Américas) apresentando algumas diferenças regionais relativas aos subtipos, como presença de genótipo africano (5) na região de Botucatu.

**Palavras - Chave.** HCV, Genótipos, Subtipos.

### ABSTRACT

Hepatitis C is an infectious disease with variable clinical evolution, generally slow and progressive, caused by a RNA virus termed HCV (hepatitis C virus). This virus presents a structure composed by an external envelop, protein core, and a single strand RNA with approximately 9,5 Kb. RNA virus usually present a high mutation level resulting in diverse genomic sequences, and owing to these various genotypes and subtypes are evolved. HCV genotypes 1, 2 and 3 have been worldwide disseminated, being types 4 and 5 specially in Africa, and type 6 has been found in Asia. In Brazil the mostly frequent genotypes are 1, 2, and 3. The present study evaluated 1.018 plasma samples anti-HCV positive on ELISA assay, and HCV RNA positive by means of RT-PCR (Roche®). These plasma samples were sent from following cities of São Paulo state: Botucatu (N=508), Bauru (N= 415), and Assis (N= 95). Genotyping was performed by means of LiPA (Line probe assay - Bayer) which allows to analyze six HCV genotypes, and the most common subtypes. HCV genotypes regional distribution was 62.9% of genotype 1, and 34.5% of genotype 3. Genotype 2 was found in Botucatu and Bauru regions only in a frequency of 2.1%, and genotype 5 was shown in Botucatu (0.2%) only. HCV subtypes distribution was as follow: in Botucatu region – subtype 1a (25%), 1b (29.3%), 1a/1b (3.5%), 2b (0.6%), 3a (35.0%), 5a (0.2%); in Bauru region – subtypes 1a (31.1%), 1b (27.2%), 1a /1b (2.4%), 2 b (1.9%), 2 a/2c (0.2%), 3a (32.3%); in Assis region – subtypes 1a (26.3%), 1b (26.3%), 1a /1b (2.1%), 3a (41.1%). The used genotyping technique did not allow to perform the subtypes characterization in 4.1% of samples. The HCV genotypes distribution in these São Paulo state regions was similar to those observed in other Brazilian and world sites, although some regional differences on HCV subtypes were observed, such as the occurrence of African genotypes (5 and 5a) in Botucatu region.

**Key Words.** HCV, Genotype, subtype.

## INTRODUÇÃO

A Hepatite C é uma doença infecciosa, com evolução variável, geralmente lenta e progressiva, que acomete o fígado, lesando-o de maneira irreversível evoluindo de hepatite crônica, para cirrose hepática e hepatocarcinoma. O intervalo médio entre a infecção e o desenvolvimento de hepatite C crônica é de aproximadamente 10 anos, com praticamente a mesma média para as evoluções seguintes<sup>1</sup>.

Considerada uma das maiores epidemias do século XXI, sua prevalência mundial é estimada em 3% , sendo no Brasil 1,23% entre doadores de sangue<sup>2,3</sup>.

O agente etiológico da Hepatite C (*HCV - Hepatitis C virus*) é um vírus RNA, do Gênero *Hepacivirus*, Família *Flaviviridae* (*National Center Biotechnology Information*)<sup>4</sup> com diâmetro de 55 a 65 nm, identificado por Biologia Molecular em 1989<sup>5,6</sup>.

A estrutura genômica do HCV está bem caracterizada e é composta de um envelope externo (membrana celular contendo proteínas virais E1 e E2), um core viral (p 21) e uma fita simples e linear da molécula de RNA, contendo aproximadamente 9.500 nucleotídeos. Esta fita contém uma única e longa fase aberta de leitura (*ORF – Open Reading Frame*) que codifica uma proteína com cerca de 3.000 aminoácidos. Essa proteína é clivada por proteases virais e do hospedeiro em pelo menos 10 proteínas estruturais e não estruturais<sup>2,7,8,9</sup>.

O reservatório natural e fonte de infecção é o homem doente (clínica ou subclínicamente) ou o portador assintomático<sup>10</sup>.

A principal via de transmissão é a parenteral (transfusão de sangue e hemoderivados), embora transmissão sexual, vertical, percutânea direta (usuários de drogas injetáveis, aplicação de tatuagens, acidentes perfuro-cortantes) em profissionais da saúde possam ocorrer<sup>10</sup>.

A hepatite C é a hepatite viral mais comumente transmitida por sangue. Os grupos de maiores riscos são pessoas que recebem sangue em transfusão, pacientes em diálise e toxicômanos. O advento de testes sorológicos de 2ª e 3ª geração na seleção de doadores de sangue reduziu de maneira significativa o risco de transmissão por unidade de sangue transfundido. No Brasil a obrigatoriedade de triagem de doadores de sangue para hepatite C data de 1993<sup>10</sup>, porém no Estado de São Paulo essa triagem é obrigatória desde 1992, Portaria CVS-10, 1992.

Como na maioria dos vírus, a ausência da atividade de reparo da enzima conduz a uma alta taxa de mutação espontânea, caracterizando diferentes seqüências genômicas levando à descrição de vários tipos (genótipos) e diferentes subtipos. Alguns genótipos têm distribuição geográfica característica, e podem ser associados a determinadas vias de transmissão<sup>11</sup>.

Os testes de genotipagem mais utilizados detectam os seis (6) tipos mais freqüentes e os diversos subtipos. Os genótipos 1, 2 e 3 têm distribuição mundial, os tipos 4 e 5 são encontrados principalmente na África e o tipo 6 é normalmente detectado na Ásia<sup>12,13</sup>. De acordo com Consenso proposto em 2005 sobre o

sistema de nomenclatura dos genótipos do HCV<sup>14</sup>, os genótipos considerados anteriormente como 7, 8, 9 e 11 foram classificados como subtipos do genótipo 6, enquanto o genótipo 10 foi classificado como subtipo do genótipo 3<sup>14</sup>, sendo mais comumente encontrados na Tailândia, Vietnã, e Indonésia<sup>13</sup>. No Brasil os genótipos mais freqüentes são 1, 2 e 3<sup>3,12,13</sup>.

Inúmeros estudos em todo mundo têm como objetivo a cura da hepatite C. Atualmente dois tipos de tratamento vêm sendo utilizados, o interferon convencional ou peguulado associado ou não a ribavirina<sup>2,15</sup>. A utilização de um ou outro tratamento foi normatizado no Brasil pelo programa de Hepatites Virais do Ministério da Saúde na Portaria nº 863/02<sup>2</sup>, que estabeleceu o tratamento com interferon convencional e/ou ribavirina para portadores de genótipos 2, 3, enquanto portadores do genótipo 1 devem ser tratados com interferon peguulado e/ou ribavirina. Neste contexto, a determinação laboratorial do genótipo do HCV no paciente infectado é essencial para auxiliar o clínico na escolha da terapia a ser instituída<sup>13</sup>.

O objetivo deste trabalho foi determinar a freqüência e distribuição dos genótipos / subtipos do HCV em pacientes com hepatite C crônica nas regiões de Botucatu, Bauru e Assis, atendidos pelo Hemocentro de Botucatu.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Casuística

Foram incluídos neste estudo 1018 pacientes, com sorologia anti-HCV positiva, acompanhados nas diferentes Unidades de Saúde das regiões de Botucatu (508), Bauru (415) e Assis (95), integrantes do Programa Estadual de Hepatites Virais, da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, no período de agosto de 2002 a maio de 2005. Todos os pacientes apresentaram solicitação médica para a realização da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) e genotipagem para o HCV.

### Metodologia

A detecção do RNA viral foi realizada por RT - PCR utilizando Kit *Cobas Amplicor® HCV Monitor Test, v.2.0 - Roche Diagnóstica* enquanto a determinação do genótipo foi realizada analisando a região não traduzida ultra conservada 5' UTR com o Kit *Versant™ HCV Genotyping Assay (LiPA - Line Probe Assay) – Bayer Corporation*, que permite a determinação de 6 diferentes genótipos e subtipos mais comuns.

Em ambas as técnicas foram seguidas as orientações preconizadas pelos fabricantes.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando a distribuição dos genótipos na população estudada observamos a predominância do genótipo 1 (62,9%), seguida pelo genótipo 3 (34,5%) e uma freqüência menor do

genótipo 2 (2,1%) presente apenas nas regiões de Botucatu e Bauru. Já o genótipo 5 (0,2%) esteve presente apenas na região de Botucatu, enquanto que genótipos mistos (1 e 3) foram encontrados em 0,4% da população estudada, correspondente a região de Bauru (Tabela 1).

O resultado observado para o genótipo 1 (62,9%) na região estudada, mostra-se concordante com a frequência deste genótipo no Estado de São Paulo. Jardim et al.<sup>16</sup> encontraram uma frequência de 64,7% na região de São José do Rio Preto, enquanto Bassit et al.<sup>17</sup> observaram uma frequência de 62,9% na cidade de São Paulo.

O genótipo 3 aparece com uma frequência mais elevada na região de Assis (41,1%) enquanto que nas regiões de Botucatu e Bauru é de 35,0% e 32,3%, respectivamente. Estes dados apontam uma variação regional deste genótipo pois Jardim et al.<sup>16</sup> encontraram 26,5% em São José do Rio Preto enquanto Bassit et al.<sup>16</sup> encontraram valores semelhantes (31,3%) aos das regiões de Botucatu e Bauru. Já para o genótipo 2 (2,1%) este estudo revelou uma frequência inferior à que tem sido encontrada no Estado de São Paulo: Jardim et al.<sup>16</sup> encontraram 8,8% em São José do Rio Preto, enquanto Bassit et al.<sup>17</sup> encontraram 4,3% na cidade de São Paulo.

Embora o genótipo 4 esteja presente no Estado de São Paulo<sup>17</sup> este não foi encontrado na população estudada. O presente estudo revela a presença do genótipo 5 apenas na região de Botucatu, embora este já tenha sido encontrado em outras regiões do Estado de São Paulo<sup>18</sup>.

De modo geral, os genótipos nas regiões estudadas seguem o mesmo padrão do Estado de São Paulo<sup>18</sup> e outros estados brasileiros<sup>17,19,20,21,22</sup> ou seja, uma maior frequência do genótipo 1 seguido pelo 3 e 2, observando-se a presença dos genótipos 4 e 5 de prevalência africana, nos estados do Rio de Janeiro e São Paulo<sup>17,18,23</sup>.

A frequência de genótipos nas regiões de Botucatu, Bauru e Assis assemelha-se as mais comumente encontradas no mundo ocidental<sup>13</sup>, levando a crer que o grande movimento migratório no século passado seja responsável pela diversidade de genótipos observados. Nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro observa-se a presença dos genótipos 4 e 5, oriundos provavelmente das regiões sul e central da África<sup>13,17</sup>.

Neste estudo observamos que a distribuição geral dos subtipos do HCV das regiões estudadas apresenta predominância dos subtipos 1a (27,6%), 1b (28,2%) e 3a (34,5%) (Tabela 2).

**Tabela 1.** Distribuição dos genótipos do HCV em pacientes portadores crônicos pertencentes às regiões de Botucatu, Bauru e Assis, no período de 08/2002 a 05/2005.

Genótipos	Regiões						Total	
	Botucatu		Bauru		Assis		Nº	%
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<b>1</b>	319	62,8	265	63,9	56	59,0	640	62,9
<b>2</b>	9	1,8	12	2,9	0	0,0	21	2,1
<b>3</b>	178	35,0	134	32,3	39	41,1	351	34,5
<b>5</b>	2	0,4	0	0,0	0	0,0	2	0,2
<b>Misto (1 e 3)</b>	0	0	4	1,0	0	0,0	4	0,4
<b>Total</b>	508	100,0	415	100,0	95	100,0	1018	100,0

**Tabela 2.** Distribuição dos subtipos do HCV em pacientes portadores crônicos pertencentes às regiões de Botucatu, Bauru e Assis, no período de 08/2002 a 05/2005.

Subtipos	Regiões						Total	
	Botucatu		Bauru		Assis		Nº	%
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<b>1</b>	25	4,9	13	3,1	4	4,2	42	4,1
<b>1a</b>	127	25,0	129	31,1	25	26,3	281	27,6
<b>1b</b>	149	29,3	113	27,2	25	26,3	287	28,2
<b>1 a / 1 b</b>	18	3,5	10	2,4	2	2,1	30	3,0
<b>2</b>	6	1,2	3	0,7	0	0,0	9	0,9
<b>2b</b>	3	0,6	8	1,9	0	0,0	11	1,1
<b>2a/2c</b>	0	0,0	1	0,2	0	0,0	1	0,1
<b>3a</b>	178	35,0	134	32,3	39	41,0	351	34,5
<b>5</b>	1	0,2	0	0,0	0	0,0	1	0,1
<b>5a</b>	1	0,2	0	0,0	0	0,0	1	0,1
<b>Misto (1e3)</b>	0	0,0	4	1,0	0	0,0	4	0,4
<b>Total</b>	508	100,0	415	100,0	95	100,0	1.018	100,0

O subtipo 1a é mais freqüente na região de Bauru (31,1%), 1b na região de Botucatu (29,3%), enquanto o subtipo 3a apresenta uma freqüência maior na região de Assis (41,1%), sendo esta última superior às médias normalmente encontradas nos estados brasileiros<sup>17-21,23</sup>

A classificação em subtipos pode ocasionalmente ser limitada pela falta de variações das seqüências específicas de subtipos na 5'UTR, podendo ocorrer padrões não identificáveis<sup>24</sup>. Assim a metodologia utilizada não permitiu a diferenciação dos subtipos em 5,1% dos pacientes, sendo identificado apenas os genótipos 1 (4,1%), 2 (0,9%) e 5 (0,1%). Observamos também a presença de genótipos mistos (1 e 3) em 0,4% dos pacientes.

As variações genéticas, subtipos e quasispécies do HCV são responsáveis não apenas pelo escape do sistema imunológico<sup>25-28</sup>, mas também podem estar relacionadas à suscetibilidade ao tratamento<sup>29,30</sup>. Assim, a determinação dos subtipos e quasispécies são extremamente úteis para orientação na escolha do tratamento adequado. Neste contexto, os dados obtidos com este trabalho poderão compor um banco de dados com informações sobre subtipos regionais do HCV.

## REFERÊNCIAS

1. Nadler J. AIDS : etiologia. In: Veronesi R, Foccacia SR, editores. Tratado de Infectologia. São Paulo: Atheneu; 1996 p.83-6.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Portaria n° 863, de 4 de novembro de 2002, Protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas: Hepatite Viral Crônica C [acesso 2003 apr 08] Disponível em: URL: <http://www.grupoesperanca.org.br>.
3. Grupo de Estudos da Sociedade de Hepatologia. Epidemiologia da infecção pelo Vírus da Hepatite C no Brasil, 2005a [cited 2005 ago]. Available from: URL: [www.sbhepatologia.org.br](http://www.sbhepatologia.org.br).
4. National Center for Biotechnology Information - Taxonomy browser; taxonomy ID:11103. Hepatitis C virus [cited 2003 april 08] Available from: URL: <http://www.ncbi.nlm.gov/Taxonomy/Browser>.
5. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood born non-A, non-B hepatitis genome. *Science* 1989; 244:359-62.
6. Conte VP. Hepatite crônica por Vírus C. *Arq Gastroenterol* 2000; 37:187-94.
7. Silva MD. Hepatite C e testes diagnósticos. *Cad. de Farn* 2001; 17:111-5.
8. Barteuschlager R, Lohmann V. Replication of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 2000; 81:1631-48.
9. Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM. Structural Biology of Hepatitis C virus. *Hepatology* 2004;39(1):05-19.
10. Brasil. Secretaria de Estado da Saúde. Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac". Guia de orientações técnicas Hepatites B e C. São Paulo; 2002.
11. Bravo R, Soriano V, Garcia Samaniego J, Gonzalez J, Castro A, Colmenero M, et al. Prevalence of the genotypes of the hepatitis C virus in Spanish drug addicts with chronic hepatitis C. Spanish Group for the Study of Viral Hepatitis in HIV Positive Patients. *Rev Clin Esp* 1996; 196:673-7.
12. Busek S, Oliveira G. Molecular epidemiology of the hepatitis C virus in Brazil. *Genet Mol Res* 2003; 2:117-23.
13. Janis and friends hepatitis C support web site. Genotypes. Information on treatment according to genotype [serial on line] 2005b [cited 2005 sept 16]. Available from: URL: <http://janis7hepc.com/genotypes.htm>.
14. Peter S, Bukh J, Combet C, Deléage G, Enotomo N, Feinstone S, et al. Consensus proposal for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 2005;42: 962-73.
15. Grupo vontade de viver de apoio aos portadores do vírus da hepatite C. Tratamento usual [serial on line] 2005b [cited 2005 sept 16]. Available from: URL: [www.vontadedeviver.org.br](http://www.vontadedeviver.org.br).
16. Jardim ACG, Fachinni RM, Sanchez FE, Carvalho Salles AB, Souza FP, Zanetto DM, et al. Identification and genotyping of the Hepatitis C virus in individuals from a blood center. *J Braz Soc Virol* 2004; 9:155 -6.
17. Bassit L, Ribeiro dos Santos G, Silva LC, Takei K, Villaca P, David Neto E, et al. Genotype distributions of hepatitis C virus in São Paulo, Brazil: rare subtype found. *Hepatology* 1999; 29:994-95.
18. Spina AMM, Souza AT, Fernandes RB, Gushiken EKK, Ferraz M., Corvino SM, et al. Hepatitis C virus genotypes in the state of Sao Paulo, Brazil. In: Abstract of the 12<sup>th</sup> International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses Montreal, 2005: P-08.
19. Oliveira MLA, Bastos FI, Sabino RR, Paetzold U, Schreier E, Pauli G et al. Distribution of HCV genotypes among different exposure categories in Brazil. *Braz J Med Biol Res* 1999; 2:79-282.
20. Paraná R, Vitvitski L, Berby F, Portugal M, Cotrim HP, Cavalcanti A. et al. HCV infection in northeastern Brazil: unexpected high prevalence of genotype 3a and absence of African genotypes. *Arq Gastroenterol* 2000; 37:213-6.
21. Wanderlei Silva DM, Gonzaga RS, Rodart IF, Lopes GB, Braga JHM, Ramalho Neto CE. and Reis MG. Distribution of Hepatitis C virus genotypes in Alagoas state, Brazil. *J Braz Soc Virol* 2004; 9:154-5.
22. Oliveira RV, Fialho MV, Espírito-Santo MP, Silva LDA, Yoshida CFT, Lampe E. Comparison of hepatitis C virus genotypes tested by line probe assay (LiPA) and nucleotide sequencing analyses. *J Braz Soc Virol* 2004; 9:156.
23. Lampe E, Espírito-Santo MP, Oliveira JM, Oliveira RV, Fialho MV, DeAlmeida AJ, et al. Genomic variability of hepatitis C virus strains from states of Bahia, Goiás and Rio de Janeiro, Brazil. *J Braz Soc Virol* 2004; 9:156.
24. Guia de orientação técnica: HCV Genotype Assay (LiPA) Versant™ Bayer©, GO4622 Rev.0, 2002;13.
25. Kato N, Sekiya H, Ootsuyama Y, Nakazawa t, Hijikata M, Ohkoshi S, et al. Humoral immune response to hypervariable region 1 of the putative envelope glycoprotein (gp70) of hepatitis C virus. *J Virol* 1993; 67:3923-30.
26. Taniguchi S, Okamoto M, Sakamoto M, Kojima M, Tsuda F, Tanaka T, et al. A structurally flexible and antigenically variable N-terminal domain of the hepatitis C virus E2/NS1 protein: implication for a escape from antibody. *Virology* 1993; 195:297-301.
27. Bukh J, Miller RH, Purcell RH. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin Liver Dis* 1995; 15:41-63.
28. Sakai A, Shuichi K, Honda M, Matsushita E, Kobayashi K. Quasispecies of hepatitis C virus in serum and in three different parts of the liver of patients with chronic hepatitis. *Hepatology* 1999; 30:556-61.
29. Simmonds P, Mellor J, Sanchez Tapias JM, Alberti A, Priet J, Colombo M, et al. Epidemiological, clinical and therapeutic associations of hepatitis C types in western European patients. *J Hepatol* 1996; 24:517-24.
30. Brechot C. The direct interplay between HCV NS5A protein and interferon transduction signal: from clinical to basic science. *J Hepatol* 1999; 30:1152-54.

# Uterine cytopathology in a public health laboratory: impact from 20 years data (1984-2003)

## Citopatologia uterina em laboratório de saúde pública: impacto dos dados de 20 anos (1984-2003)

RIALA6/1080

Luzia Setuko Umeda YAMAMOTO<sup>1\*</sup>, Simone SAITO<sup>2</sup>, Sonia Maria Miranda PEREIRA<sup>1</sup>, Maria Lucia UTAGAWA<sup>1</sup>, Adhemar LONGATTO-FILHO<sup>1</sup>

\* Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz, Av Dr Arnaldo, 355, 7º, Cerqueira César, CEP 01246-902 - São Paulo, SP, Brazil, e-mail: lyamamot@ial.sp.gov.br

<sup>1</sup> Cytology Section of the Division of Pathology, Instituto Adolfo Lutz - São Paulo, SP

<sup>2</sup> Cytology Section trainee of the Division of Pathology.

Recebido: 08/06/2006 – Aceito para publicação: 18/08/2006

### ABSTRACT

The objective of this study was to identify the distribution of cytological diagnosis by means of Pap test on pre-neoplastic and neoplastic lesions from women at different age group in the period of 20 years. Retrospective survey of cytological cervicovaginal diagnoses was done to achieve this goal. Diagnoses results from 1,020,853 cytological samplings on Pap test, were studied according to age groups. In the period of 20 years from 1984 to 2003 the distribution of cervicovaginal cytological diagnoses according to age was analyzed four intervals of 5 year - (four quinquennia). Of analyzed cytological samples 27,314 (2.68%) were unsatisfactory, 980,985 (96.09%) were negative, and 12,554 (1.23%) resulted in squamous intraepithelial lesions and cancer. LSIL peak was observed within the four quinquennia and in the 20-24 age group, HSIL was most frequent in the 30-34 year age group, and SCC/ADENO Ca were present in women above 50 years old. In women of 15-19 years of age, a clear-increase in LSIL frequency was observed in four quinquennia, of 66 (9.19%) in the first quinquennium, 109 (9.83%) in the second, 441 (17.46%) in the third, and 467 (15.97%) in the last one. The outcome of the uterine cervix cancer prevention programs can be measured by the high frequency of LSIL type lesions in the past five years, and the data disclosed in the present study are in accordance with the data reported by the others from another continuous uterine cervix cancer prevention programs.

**Key Words.** screening, cervix cytology, Pap smear, age group.

### RESUMO

O objetivo deste estudo foi identificar a distribuição dos diagnósticos citológicos pelo método de Papanicolaou das lesões pré neoplásicas e neoplásicas nos diferentes grupos etários no período de 20 anos. Foram utilizados dados retrospectivos dos diagnósticos citológicos cérvico-vaginais realizados no período de 1984 a 2003 no Setor de Citologia Oncótica. A distribuição dos diagnósticos de 1.020.853 amostras citológicas foi analisada por faixa etária em quatro intervalos de 5 anos (4 quinquênios). Das amostras analisadas, 27.314 (2,68%) casos foram inadequados, 980.985 (96,09%) foram negativos e 12.554 (1,23%) lesões intraepiteliais e câncer. Neste período, o pico de LSIL foi observado entre a faixa etária dos 20-24 de idade, HSIL foi mais freqüente no intervalo entre 30-34 anos de idade, e SCC/ADENO Ca foram acima dos 50 anos de idade. Nas mulheres entre 15-19 anos de idade foi observado acentuado aumento na freqüência de LSIL nos quatro quinquênios, de 66 (9,19%) no primeiro, 109 (9,83%) no segundo, 441 (17,46%) no terceiro e 467 (15,97%) no último. A qualidade dos programas de prevenção de câncer de colo uterino pode ser medido pela freqüência das lesões do tipo LSIL. Os resultados do presente estudo são concordantes com os de outros programas contínuos e importantes para evitar a mortalidade em virtude dessas lesões.

**Palavras-Chave.** rastreamento, citologia cervical, Método de Papanicolaou, faixa etária.

## INTRODUCTION

Systematic examination of uterine cervical using the Pap test smears has been recognized as the most efficient method to detect neoplastic lesions and to identify neoplastic conditions; the Pap test, to date, seems to be the most reliable test to be applied in large populations. Continuous efforts in education to optimize the index levels of sensitivity and specificity have been made around the world, focusing strategies in diagnostic assurance quality control. Discussions on morphologic parameter evaluation have also helped to improve such quality strategies<sup>1,2,3</sup>. The results show more significant protection factors in the women correlated to the number of tests performed<sup>4</sup>.

Many of the assurance and control strategies involve studies based on data observed in routine conditions which means that many subjects of cytological studies arose from the large data results<sup>5</sup>. Retrospectively, such data show frequencies of diagnosis distributed by age group that may reflect epidemiological conditions of geographic area; and also reveals a tendency of Cytology Laboratories as being more conservative or not discriminative of lesions in low or high-grade classification.

The objective of this study was to verify the distribution of cytological diagnoses of Pap tests in cancer and pre cancerous lesions in different age groups over 20 years, and to discuss the importance of such data as being strategic to cancer prevention prognosis in São Paulo, Brazil.

## MATERIAL AND METHODS

The samples were examined at the Division of Pathology of Instituto Adolfo Lutz over a period of 20 years (1984 to 2003). The slides were fixed on Carbowax or absolute alcohol and stained with Papanicolaou method in samples collected with Ayres' spatula and/or cytobrush. A total of 1,020,853 cases were examined during the past 20 years. The diagnoses were compiled in intervals of 5 years, and analyzed in 4 groups: 177,975 through 1984-1988; 318,751 through 1989-1993; 294,673 through 1994-1998 and 229,454 through 1999-2003. During the period of the

study, diagnoses were made according to the WHO classification 1984<sup>6</sup> and the Health Ministry in Brazil 1993<sup>7</sup>. Presently, the results were re-classified according to Bethesda System 2001<sup>8</sup>.

For the statistical analyses we used the Chi-Square test and test for likelihood ratios. Diagnoses of normal and inflammatory conditions were classified as negative. All inconclusive samplings and cases without age data were excluded from these analyses.

## RESULTS

A total of 1,020,853 cases were examined over 20 years. The diagnostic classification used during this period at the Instituto Adolfo Lutz - Cytology Laboratory has not considered the analysis of the causes of inadequate samplings (2.68%); however, the selective criteria were similar to that used by the Bethesda System which recommends the internal quality control to be in accordance with at least two observers.

We reported 27,314 (2.68%) unsatisfactory samples; 980,985 (96.09%) negative (normal and inflammatory); 2,518 (0.25%) ASC/AGC; 7,277 (0.71%) LSIL; 2,429 (0.24%) HSIL and 330 (0.03%) squamous cell carcinoma (SCC) and adenocarcinoma (adenoca) (Table 1). From 1,020,853 the distribution of the diagnoses was grouped according to age, except 12,554 (1.23%) that lacked this information. From the cases classified as "unsatisfactory sample" age frequency was predominant in the 50-plus-age group. The age of the negative (normal and inflammatory) cases ranged from 20 to 35 years.

Considering the period September 98 to August 99 we have the following information, in 66,212 cases, 4.39% were inadequate samplings having as main causes: 55.43% poor fixing, 16.43% poor fixing and purulence, 20.72% purulence, 5.15% hemorrhagic, 1.5% scarce material e 0.76% thick material<sup>9</sup>. Still within this period, cases of ASC/AGC were undervalued because such were included in the inflammatory cytology group requiring the test to be repeated within a 6-month period or, they were reported as inconclusive atypical cells (Table 2).

**Table 1.** Distribution of 1,020,853 cytological diagnoses during the period 1984-2003 (4 quinquennia) realized at Instituto Adolfo Lutz.

DIAGNOSES	84-88		89-93		94-98		99-03		TOTAL	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Unsatisfactory	3,780	2.12	8,233	2.58	4,579	1.55	10,722	4.67	27,314	2.68
Negative	172,987	97.20	308,822	96.89	286,729	97.30	212,447	92.59	980,985	96.09
ASC/AGC	-	-	4	0.001	215	0.07	2,299	1.0	2,518	0.25
LSIL	718	0.41	1,109	0.35	2,526	0.87	2,924	1.28	7,277	0.71
HSIL	431	0.24	455	0.14	572	0.19	971	0.42	2,429	0.24
SCC / AdenoCa	59	0.03	128	0.04	52	0.02	91	0.04	330	0.03
<b>TOTAL</b>	<b>177,975</b>	<b>100</b>	<b>318,751</b>	<b>100</b>	<b>294,673</b>	<b>100</b>	<b>229,454</b>	<b>100</b>	<b>1,020,853</b>	<b>100</b>

(p= 0,001 Chi Square Test)

The group with the largest number of LSIL was from 20 to 24 years (Table 3), corresponding to 21.85% of 7,277 cases; HSIL frequency was larger in the 30-34 year age group, which means 17.62% from 2,429 HSIL cases (Table 4). And finally the smear SCC/ADENO Ca was predominant in the 50-plus-age group or 48.79% of the 330 cases diagnosed (Table 5).

LSIL lesions showed a frequency enhanced in the teenage group (15-19 years), arising from 9.19% and 9.83 to 17.46% and 15.97% in 5-year groups respectively. Statistically we reported a significant association between age and ASC/AGC ( $p=0,001$ ) and LSIL ( $p=0,001$ ). We found a significant difference of HSIL ( $p=0,066$ ) during the year, but not in SCC/ADENO Ca group ( $p=0,333$ ).

### DISCUSSION

Throughout the past 20 years many programs were undertaken against cervical cancer mortality. It's worth pointing

out that the Public Health System offers cervical cancer control procedures to women from 20 to 30 years with much more frequency, as there is spontaneous demand for family planning or even prenatal follow-up care, making this age group to be of the largest concentration. On the other hand, Nascimento et al<sup>10</sup> observed in São Paulo City - Brazil through distribution analyses as per economic and demographic characteristics, that only 36% of the women between 15 and 24 years old acknowledged having done the Pap test.

In 2000 the Brazilian Health Ministry implemented the SISCOLO program in our laboratory. In 2004 and 2005, 2.57% and 3.00% respectively ASC and AGC cases were detected as per data from the annual report of the Division of Pathology.

The literature shows that the concentration of approximately 90% of the LSIL and HSIL cases is found in the age group of 15 to 39, thus occurring before 35 years of age and in women of 50 or older, the LSIL frequency decreases and the occurrence of cervical cancer increases with age<sup>11,12</sup>. We have observed in our study that, from the total of 1,020,853 samplings

**Table 2.** Distribution of 2,518 cytological diagnoses of ASC/AGC by age group in the period 1989 - 2003 (3 quinquenia).

Age	89-93		94-98		99-03		TOTAL	
	n	%	n	%	n	%	n	%
<14	-	-	6	2.79	10	0.44	16	0.64
15-19	-	-	17	7.91	235	10.22	252	10.01
20-24	-	-	20	9.30	380	16.53	400	15.88
25-29	1	25	35	16.28	329	14.31	365	14.50
30-34	-	-	26	12.09	283	12.31	309	12.27
35-39	-	-	27	12.56	261	11.35	288	11.44
40-44	2	50	18	8.37	231	10.05	251	9.97
45-49	-	-	20	9.30	209	9.09	229	9.09
>50	1	25	46	21.40	361	15.70	408	16.20
<b>TOTAL</b>	<b>4</b>	<b>100</b>	<b>215</b>	<b>100</b>	<b>2,299</b>	<b>100</b>	<b>2,518</b>	<b>100</b>

( $p=0,001$  Chi Square Test)

**Table 3.** Distribution of 7,277 cytological diagnoses of LSIL by age group in the period 1984 - 2003 (4 quinquenia).

Age	84-88		89-93		94-98		99-03		TOTAL	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<14	6	0.84	8	0.72	21	0.83	29	0.99	64	0.88
15-19	66	9.19	109	9.83	441	17.46	467	15.97	1,083	14.88
20-24	128	17.83	236	21.28	584	23.12	642	21.96	1,590	21.85
25-29	152	21.17	239	21.55	430	17.02	500	17.10	1,321	18.15
30-34	135	18.80	189	17.04	337	13.34	405	13.85	1,066	14.65
35-39	79	11.0	134	12.09	240	9.50	316	10.81	769	10.57
40-44	59	8.22	68	6.13	196	7.76	216	7.39	539	7.41
45-49	34	4.73	57	5.14	125	4.95	146	4.99	362	4.97
>50	59	8.22	69	6.22	152	6.02	203	6.94	483	6.64
<b>TOTAL</b>	<b>718</b>	<b>100</b>	<b>1,109</b>	<b>100</b>	<b>2,526</b>	<b>100</b>	<b>2,924</b>	<b>100</b>	<b>7,277</b>	<b>100</b>

( $p=0,001$  Chi Square Test)

**Table 4.** Distribution of 2,428 cytological diagnoses of HSIL by age group in the period 1984 - 2003 (4 quinquenia).

Age	84-88		89-93		94-98		99-03		TOTAL	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<14	1	0.23	-	-	3	0.52	2	0.21	6	0.25
15-19	12	2.78	16	3.52	30	5.25	30	3.09	88	3.62
20-24	64	14.85	44	9.67	69	12.06	110	11.33	287	11.81
25-29	84	19.49	76	16.70	95	16.61	153	15.76	408	16.80
30-34	77	17.87	88	19.34	97	16.96	166	17.10	428	17.62
35-39	69	16.01	64	14.07	91	15.91	146	15.03	370	15.23
40-44	45	10.44	55	12.09	62	10.84	102	10.50	264	10.87
45-49	38	8.82	42	9.23	46	8.04	104	10.71	230	9.47
>50	41	9.51	70	15.38	79	13.81	158	16.27	348	14.33
<b>TOTAL</b>	<b>431</b>	<b>100</b>	<b>455</b>	<b>100</b>	<b>572</b>	<b>100</b>	<b>971</b>	<b>100</b>	<b>2,429</b>	<b>100</b>

(p= 0,066 Chi Square Test)

**Table 5.** Distribution of 330 cytological diagnoses of SCC/ADENO Ca by age group in the period 1984-2003 (4 quinquenia).

Age	84-88		89-93		94-98		99-03		TOTAL	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15-19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20-24	1	1.70	1	0.78	-	-	1	1.10	3	0.91
25-29	4	6.78	5	3.91	3	5.77	1	1.10	13	3.94
30-34	7	11.86	10	7.81	1	1.92	3	3.30	21	6.36
35-39	6	10.17	13	10.16	9	17.31	13	14.28	41	12.42
40-44	5	8.48	13	10.16	9	17.31	12	13.19	39	11.82
45-49	13	22.03	18	14.06	6	11.54	15	16.48	52	15.76
>50	23	38.98	68	53.12	24	46.15	46	50.55	161	48.79
<b>TOTAL</b>	<b>59</b>	<b>100</b>	<b>128</b>	<b>100</b>	<b>52</b>	<b>100</b>	<b>91</b>	<b>100</b>	<b>330</b>	<b>100</b>

(p= 0,333 Chi Square Test)

analyzed, 12,554 (1.23%) represent the distribution of pre-neoplastic and neoplastic lesions (Table 1: p=0,001), being that, in the 15-19 age group the distribution of the LSIL frequency presented a clear increase from 9.19% (1984-1988) and 9.83% (1989-1993) to 17.46% (1994-1998) and 15.97% as well as a gradual increase in the 20-24 year age group (17.83%, to 23.12 and 21.96%) (Table 3: p=0,001). In posterior age groups besides those considered of larger frequency, decrease was observed in LSIL from 25 years of age or above, as well as in HSIL from 30 or above as shown in Table 4: p=0,066; this same tendency was observed in invasive carcinoma (Table 5: p=0,333), where a clear increase was seen in the age group of 50 or higher, in agreement with the literature<sup>4,13</sup>.

Rates of incidence and mortality in Brazilian women by such neoplasia are the highest concerning malignant tumors<sup>14</sup>. Taking into consideration the long detectable pre-clinical period, the temporal mortality tendency suggests that the covering of preventive tests on the feminine population has been low in the past<sup>9</sup>.

Our results are in accordance with other reports from cervical cancer long-term prevention programs. If detected early

through the Pap test, pre-neoplastic and neoplastic lesions of the uterine cervical are qualified for prevention and cure, and chiefly to avoid mortality by such lesions. Fender et al<sup>15</sup> found amongst all tests completed, 1.94% pathologic test through (LSIL, HSIL and Ca) cytology. Our data relate to 0.98% (Table 1) and, 1.12% for others<sup>8</sup>. The identification of CIN lesions largely depends on quality of the sampling (presence or not of cells representative of squamocolumnar junction - JEC), Shirata et al.<sup>16</sup> observed that the frequency of CIN detection on the smear with JEC representation was 10 times more frequent in those than in smears with no JEC, thus demonstrating the importance of an adequate collection.

Among adolescents, early sexual activity and multiple sexual partners, two of the major risk factors for cervical cancer are facts that involve social, cultural and educational factors. A well-conducted sexual education program for adolescent students may be an important way to prevent increase in HPV infections and SIL lesions among the young population<sup>17,18</sup>. We came to the conclusion that these data reinforce the importance of implementing early cervical Pap smear screening in the sexually

active population due to the progressive and high frequency of LSIL lesions during the last ten years. Additionally, we are able to suggest screening programs with priority for the women within the age group of 25 to 40 due to the high frequency of HSIL observed; and also due to the gradually increase cases of invasive carcinomas in this group.

#### ACKNOWLEDGMENT

The authors express their special thanks to Mariete S. Teixeira for her monthly reports for this study.

#### REFERENCES

1. Committee of cancer experts of the "Europe Against Cancer" Program European Guidelines for quality assurance in cervical cancer screening. *Eur J Cancer* 1993; 29A:S1 - S19.
2. Di Loreto C, Maeda MYS, Utagawa ML, Longatto-Filho A, Alves VAF. Quality Warranty in Cytopathology: Aspects of the cyto-histologic correlation. *Rev Ass Med Brazil* 1997; 43(3):195-8.
3. Yamamoto LSU, Alves VAF, Maeda MYS, Longatto-Filho A, Utagawa ML, Eluf-Neto J. A morphological protocol and guide-list on uterine cervix cytology associated to papillomavirus infection. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2004; 46(4):189-93.
4. Eluf-Neto J, Booth M, Muñoz N, Bosch FX, Meijer CJLM, Walboomers JMM. Human papillomavirus and invasive cervical cancer in Brazil. *Br J Cancer* 1994; 69:114-9.
5. Ferraz MGMC, Agnol MD, di Loreto C, Pirani WM, Utagawa ML, Pereira SMM, Sakai YI, Feres CL, Shih LWS, Yamamoto LSU, Rodrigues ROL, Shirata NK, Longatto-Filho A. 100% Rapid rescreening for quality assurance in a quality control program in a public health cytologic laboratory. *Acta Cytol* 2005; 49(6):639-43.
6. Organización Mundial de la Salud. Manual de normas y procedimientos para el control del cancer del cuello uterino. Washington pp.16, 1994.
7. Ministério da Saúde do Brasil. Seminário sobre nomenclatura e controle de qualidade dos exames citológicos e prevenção do câncer cérvico-uterino. Rio de Janeiro, 1993.
8. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright Jr T, Young N. The 2001 Bethesda System. Terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 2002; 287(16): 2114-9.
9. Fagundes MCS, Hardt LL, Saito S, Yamamoto LSU, Longatto-Filho A, Utagawa ML. Amostra inadequada em screening de esfregaços cérvico-vaginais: as principais causas. *Laes & Haes* 2001; 22(128): 94-100.
10. Nascimento CMR, Eluf-Neto J, Rego RA. Cobertura do Teste de Papanicolaou no município de São Paulo e características das mulheres que realizaram o teste. *Bol Oficina Sanit Panam* 1996; 121: 491-500.
11. Gupta PK. Benign Proliferative Reactions, Intraepithelial Neoplasia, and Invasive Cancer of the Uterine Cervix. In: Bibbo, M. *Comprehensive Cytopathology*. Philadelphia, Pennsylvania, Ed Saunders Company pp 125-60, 1997.
12. Mount SL, Papillo JL. A study of 10,296 pediatric and adolescent Papanicolaou smear diagnoses in Northern New England. *Pediatrics* 1999; 103: 539-44.
13. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic risk to Humans. Human Papillomaviruses. Vol 64, Lyon: International Agency for Research on Cancer pp 82 -231, 1995.
14. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2000.
15. Fender M, Schaffer P, Dellenbach P. Peut-on et faut-il organiser le dépistage du cancer du col de l'utérus en France? *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 1998; 27: 683-91.
16. Shirata NK, Pereira SMM, Cavaliere MJ, Longatto-Filho A, Utagawa ML, Shih LWS, Maeda MYS. Celularidade dos esfregaços cérvico-vaginais: importância em programas de garantia de qualidade em citopatologia. *J bras Ginec* 1998; 108(3): 63-6.
17. Utagawa ML, Pereira SMM, Cavaliere MJ, Maeda MYS, Shih LWS, Shirata NK. Cervical intraepithelial neoplasia in adolescents: study of cytological finding between 1987 and 1995 in São Paulo State – Brazil. *Arch Gynecol Obstet* 1998; 262: 59-64.
18. Utagawa ML, Pereira SMM, Cavaliere MJ, Shirata NK. Lesões precursoras de câncer do colo uterino em adolescentes: impacto em saúde pública. *Folha Médica* 2000; 4 (119): 55-8.

ISSN 0073-9855



9 770073 985009