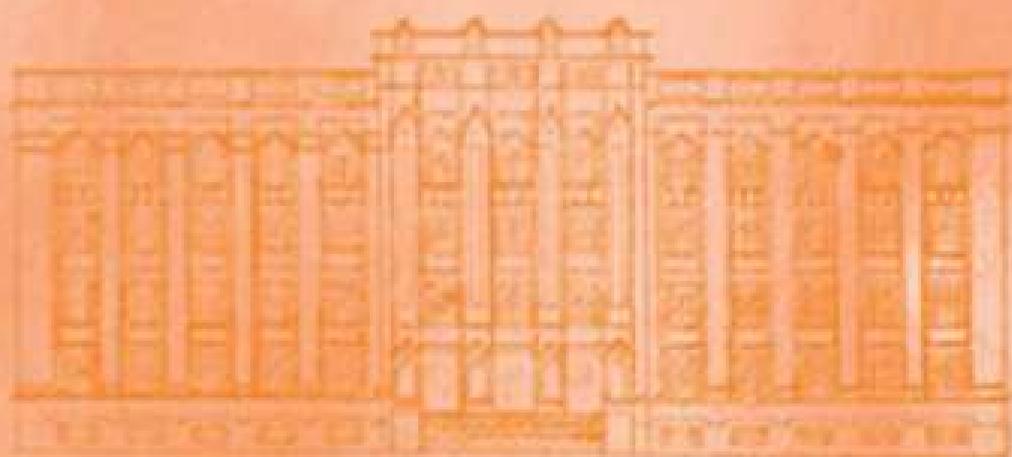


REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

ISSN 0073-9855
RIALA6



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

Volume 72 número 4, 2013



Coordenadoria de Controle de Doenças
Instituto Adolfo Lutz

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Volume 72 número 4, 2013
outubro - dezembro 2013

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

INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Diretor Geral do Instituto Adolfo Lutz

Hélio Hehl Caiaffa Filho

Editor Chefe

Pedro Luiz Silva Pinto

Editor Adjunto

Adriana Bugno

Editores Assistentes

Neuza Kasumi Shirata Iso
Aurea Silveira da Cruz Garçon
Christiane Asturiano Ristori Costa
Gisele Letícia Alves
Iracema de Albuquerque Kimura
Jacqueline Tanury Macruz Peresi
Lucile Tiemi Abe Matsumoto
Márcia Liane Buzzo
Raquel dos Anjos Fazioli
Sérgio Dovidauskas
Virginia Bodelão Richini Pereira
Thales de Brito
Lílian Nunes Schiavon
Sylia Rehder

Núcleo de Acervo

Rocely Aparecida Bueno Moita

Conselho Editorial / Editorial Board

Adele Caterino-de-Araújo, São Paulo, Brasil.
Alexandre Januário da Silva, Atlanta, EUA.
Antonio Ruffino Netto, Ribeirão Preto, Brasil.
Bernadette Dora G. de Melo Franco, São Paulo, Brasil.
Delia Rodrigues Amaya, Campinas, Brasil.
Elizabeth de Souza Nascimento, São Paulo, Brasil.
Elizabeth Castañeda, Bogotá, Colômbia.
Eliseu Alves Waldman, São Paulo, Brasil.
Fernando C. Schmitt, Porto, Portugal.
Gordon S. Shephard, Cape Town, África do Sul.
Guilherme Prado, Belo Horizonte, Brasil.
Hans P. van Egmond, Bilthoven, Holanda.
Heitor Franco de Andrade Junior, São Paulo, Brasil.
John Gilbert, York, UK.
Juan Carlos Palomino, Antuérpia, Bélgica.
Lígia Bicudo de Almeida Muradian, São Paulo, Brasil.

Luz Elena Cano Restrepo, Medellín, Colômbia.
Maria José Mendes Gianini, Araraquara, Brasil.
Marluce Bibbo, Pennsylvania, EUA.
Martin Emilio Munk, Copenhagen, Dinamarca.
Myrna Sabino, São Paulo, Brasil.
Paul W. Flinn, Kansas, EUA.
Pedro Paulo Chieffi, São Paulo, Brasil.
Regina Maura Bueno Franco, Campinas, Brasil.
Susana Córdoba, Buenos Aires, Argentina.
Terezinha de Jesus Andreoli Pinto, São Paulo, Brasil.
Thales de Brito, São Paulo, Brasil.
Vanessa Yardley, London, UK.
Venâncio Avancini Ferreira Alves, São Paulo, Brasil.
Vera Akiko Maihara, São Paulo, Brasil.
Vera Lucia Garcia Calich, São Paulo, Brasil.

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

1941
2013, 72(4)

ISSN 0073-9855 CDD₁₆ 614.07205

RIALA 6
ISSN 1983-3814 versão *on line*
ISSN 2176-3844 CD-ROM

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

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

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

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

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

Portal de Revistas Saúde SP

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

Cartas ao editor:

Endereço / Address

Núcleo de Acervo

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

Tel/ Fax. + 55 11 3068-2869

E-mail: rial@saude.sp.gov.br

Rev Inst Adolfo Lutz. 2013; 72 (4)

■ ARTIGO DE REVISÃO/ REVIEW ARTICLE

- 1573 Biorrepositórios e Biobancos: inovação estratégica em Saúde Pública**
Biorepository and Biobank: strategic innovation in the Public Health Service
Juliana Mariotti GUERRA, Neuza Kasumi SHIRATA, Lidia Midori KIMURA, Suely NONOGAKI.....261-267
- 1574 *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) em alimentos de origem animal: uma revisão sistemática**
Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin: A systematic review
Ellayne Souza CERQUEIRA, Rogeria Comastri de Castro ALMEIDA268-281

■ ARTIGO ORIGINAL/ORIGINAL ARTICLE

- 1575 Avaliação da qualidade das baciloscopias realizadas na Rede de Laboratórios de Tuberculose da Região Metropolitana da Baixada Santista/SP**
Quality assessment of Sputum-Smear Microscopy performed by the Tuberculosis Laboratory Network of the Metropolitan Region of Baixada Santista/SP
Adriana Cavalcante SANTIAGO, Felipe Araújo de Souza FERREIRA, Andréa Gobetti Coelho BOMBONATTE, Clemira Martins PEREIRA, Liliana Aparecida ZAMARIOLI.....282-287
- 1576 Tuberculose, HIV e coinfeção por TB/HIV no Sistema Prisional de Itirapina, São Paulo, Brasil**
Tuberculosis, HIV and TB/HIV co-infection in the Prison System of Itirapina, São Paulo, Brazil
Dalva Cristina Girello AILY, José Antonio Pistarín BERRA, Angela Pires BRANDÃO, Erica CHIMARA288-294
- 1577 Doença de Chagas: situação vetorial no município de Limoeiro do Norte – CE, no período de 2006 a 2009**
Chagas Disease: vector status in the city of Limoeiro do Norte – CE, during the period from 2006 to 2009
Arduina Sofia Ortet de Barros VASCONCELOS, Erlane Chaves FREITAS, Mônica Coelho ANDRADE, Marli Maria LIMA, Laíse dos Santos PEREIRA, Kátia Cristina Moraes Soares GOMES, Helena Lutécia Luna COELHO, Maria de Fátima OLIVEIRA295-301
- 1578 Avaliação do treinamento de manipuladores de alimentos de restaurantes comerciais pelo ensaio ATP-bioluminescência**
Evaluation of food handlers training in commercial restaurants by using ATP bioluminescence methodology
Carolina Conti TAKAHASHI, Priscila Espescht AMARAL, Lays Cristina Linhares SANTOS, Junia Dias CONTIM, Uelinton Manoel PINTO, Cristiane Vilas Boas NEVES, Sônia Maria de FIGUEIREDO302-308
- 1579 Avaliação das atividades antiproliferativa e antioxidante em frutos de *Campomanesia pubescens***
Evaluation of antioxidant and antiproliferative activities in fruits of *Campomanesia pubescens*
Claudia Andrea Lima CARDOSO, Marcos José SALVADOR, João Ernesto CARVALHO, Roberta Gomes COELHO309-315
- 1580 Estudo das propriedades físico-químicas da glibenclamida e excipientes que influem sobre resultados do ensaio de dissolução para medicamento similar e genérico**
Effect of the physicochemical properties of glyburide on the results of dissolution test for generic and similar drugs
Euclides Quintino da Silva FILHO, José Luiz Neves de AGUIAR, André Luis Mazzei ALBERT, Armi Wanderley NOBREGA.....316-321

■ COMUNICAÇÃO BREVE/BRIEF COMMUNICATION

1581 Tendência do perfil dos consumidores de azeite de oliva

Tendency of the olive oil consumers profile

Lillian Bittencourt DUTRA, Maria Sônia Lopes DUARTE, Eliana Carla Gomes de SOUZA..... 322-326

1582 Compostos bioativos e atividade antioxidante de pseudofrutos de caju arbóreo do Cerrado

Bioactive compounds and antioxidant activity of arboreal cashew pseudo-fruit from Cerrado

Maressa Stephanie Ovidio ALVES, Aline Medeiros ALVES, Maria Margareth Veloso NAVES..... 327-331

■ NOTA CIENTÍFICA/ SCIENTIFIC NOTE

1583 Validation of methodology for determining As, Pb and Cd in fish by using ICP-MS: Preliminary studies

Validação de método para análise de As, Pb e Cd em peixe por meio de ICP-MS: Estudos preliminares

Lidiane Raquel Verola MATAVELL, Luciana Juncioni de ARAUZ, Maria de Fátima Henriques CARVALHO, Paulo TIGLEA..... 332-335

■ COLABORADORES 336-338

■ INSTRUÇÕES AOS AUTORES 339-344

Biorrepositórios e Biobancos: inovação estratégica em Saúde Pública

Biorepository and Biobank: strategic innovation in the Public Health Service

RIALA6/1573

Juliana Mariotti GUERRA*, Neuza Kasumi SHIRATA, Lidia Midori KIMURA, Suely NONOGAKI

*Endereço para correspondência: Núcleo de Patologia Quantitativa, Centro de Patologia, Instituto Adolfo Lutz. Avenida Doutor Arnaldo nº 355, 7º andar, Laboratório 705, Cerqueira César, CEP 01246-902, São Paulo/SP. Tel.: 11-3068-2874, fax 11-3068-2871. E-mail: jumariotti.vet@gmail.com

Recebido: 31.07.2013 - Aceito para publicação: 22.10.2013

RESUMO

Os avanços tecnológicos das últimas décadas catalisaram transformações sociais e econômicas, que influenciaram decisivamente nos padrões da morbimortalidade populacional. No Brasil, a heterogeneidade deste padrão é muito visível e complexa, em função de sua grande extensão territorial, do significativo número de habitantes e das diferenças socioeconômicas e culturais. Com o aumento da expectativa de vida e o envelhecimento da população brasileira, observa-se o aparecimento cada vez mais frequente de doenças crônicas não transmissíveis. As mudanças climáticas e as condições higiênico-sanitárias, ainda deficientes em algumas regiões, podem propiciar o recrudescimento das doenças infectocontagiosas. Em face dessas transformações, faz-se necessário que o sistema de vigilância epidemiológica seja reestruturado para adequar aos novos cenários epidemiológicos, identificar novos riscos, prever e conter a expansão de áreas com riscos preexistentes de disseminação, propagação e redução das doenças. Um dos pontos cruciais desta reestruturação é o armazenamento correto e adequado das amostras biológicas, por meio da criação de biorrepositórios e biobancos, que possibilitará a aplicação de novas tecnologias para detecção, investigação e respostas às situações de surtos, epidemias e pandemias, com benefícios à pesquisa e assistência na área de saúde. Esta revisão demonstra a importância dos biobancos e biorrepositórios em Saúde Pública.

Palavras-chave. bancos de tecidos, vigilância epidemiológica, doenças transmissíveis, biologia molecular.

ABSTRACT

Technologic improvements of the last decades have accelerated the social and economic transformations, which played a decisive role on the population morbid-mortality patterns. In Brazil, however, the heterogeneity of this pattern is quite visible and complex, due to its large territory, high inhabitant numbers and socioeconomic and cultural differences. Owing to the increase of life expectation, a rise and a frequent non-transmissible chronic diseases occurrence were observed. Climatic changes and deficient sanitary conditions in some regions may induce the resurgence of infectious diseases. In view of these changes, the system of epidemiological surveillance has to be compelled to restructure and to adapt to the new epidemiological scenarios, to identify the new risks, to predict and to restrain the spread of risk areas with preexisting dissemination, spread and for reducing diseases. One of the crucial points of this restructuring is the correct and proper storage of biological samples by producing bio-repositories and biobanks, in order to apply the new technologies for detecting, investigating and responding to outbreaks, epidemics and pandemics, with clear benefits to healthcare research and assistance. The present review aimed at demonstrating the importance of biobanks and biorepositories for Public Health.

Keywords. tissue banks, epidemiological surveillance, communicable disease, molecular biology.

INTRODUÇÃO

Os avanços técnicos e científicos observados na última década criaram novos paradigmas, sobretudo na área da saúde. Até recentemente, os geneticistas eram como os primeiros cartógrafos traçando os limites litorâneos apenas com bússolas e blocos de anotações. O mapa do genoma humano, como um mapa antigo do mundo, foi esboçado com traços tortos e incertos. No ano de 2000, a conclusão do Projeto Genoma Humano trouxe mudanças, produzindo o primeiro esboço molecular do corpo humano. Com o tempo, este rascunho pôde tornar-se um atlas detalhado de prevenções, diagnósticos e curas para os mais variados tipos de doença.

Esse alavanque do conhecimento, principalmente nas áreas de genética, terapia celular, biologia molecular e bioinformática, mudou os rumos da pesquisa básica, clínica e translacional, gerando uma crescente necessidade de armazenamento de materiais biológicos e informações clínicas relativos aos mesmos em biobancos e biorrepositórios^{1,2}.

Pesquisas com biobancos e biorrepositórios são essenciais para identificar características biológicas que auxiliem nas investigações das relações entre o risco e o desenvolvimento das várias doenças infecciosas e crônico-degenerativas. Assim, o objetivo dessa revisão é demonstrar a importância dos Biobancos e Biorrepositórios para o desenvolvimento de pesquisas que propiciem um efetivo planejamento de estratégias para os Programas de Prevenção em Saúde Pública.

Conceito

Algumas vezes os termos "biobanco" e "biorrepositório" são erroneamente utilizados como sinônimos para descrever a infraestrutura e os procedimentos relacionados à coleta, processamento, armazenamento e utilização de material biológico na pesquisa em saúde. Uma explicação para tal uso seria que o termo "biobanco" é relativamente novo. Segundo Elger e Caplan³, a primeira vez que tal termo apareceu no PubMed foi em 1996, no artigo de Loft e Poulsen⁴ - Risco de câncer e danos oxidativos do DNA em homens - da revista *Journal of Molecular Medicine*, mas esse termo não foi usado com frequência até 2000. Ainda a palavra é empregada para expor uma gama de repositório de material biológico humano.

A Organização Mundial de Saúde⁵ define biobanco como uma coleção organizada de material

biológico humano e informações associadas, coletados prospectivamente e armazenados para fins específicos de pesquisa conforme recomendações e/ou normas técnicas, éticas e operacionais pré-definidas. Os materiais biológicos são gerenciados pelo biobanco e compartilhados em projetos e pesquisa colaborativos. Já o biorrepositório, por sua vez, é definido como um prédio, sala ou container no qual são armazenados espécimes biológicos, seja para uso clínico ou de pesquisa. Um biorrepositório pode ser uma organização formal ou uma coleção informal de materiais no freezer de um pesquisador.

A Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD)⁶ usa o termo "Centro de Recursos Biológicos" (BRC) para abranger não apenas os repositórios, mas também os prestadores de serviços relacionados com a investigação que coletam material biológico e informações associadas relevantes. A Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (IARC) usa o termo desenvolvido pela OECD⁷, com foco nas coleções de espécimes humanos, para pesquisa de câncer. Contudo, as questões éticas levantadas quando amostras biológicas e as informações associadas são usadas na pesquisa em saúde, diferem quando se trata da aquisição sistemática de bioespécimes humanos vislumbrando um futuro uso em relação coleta de amostras, limitada por um pesquisador para abordar uma questão que já foi estabelecida.

No Brasil, a Resolução 441/2011 do Conselho Nacional de Saúde⁸ considera biobanco uma coleção organizada de material biológico humano e informações associadas, coletado e armazenado para fins de pesquisa, conforme regulamento ou normas técnicas, éticas e operacionais pré-definidas, sob responsabilidade e gerenciamento institucional, sem fins comerciais. O biorrepositório, por sua vez, é uma coleção de material biológico humano, coletado e armazenado ao longo da execução de um projeto de pesquisa específico, conforme regulamento ou normas técnicas, éticas e operacionais pré-definidas, sob responsabilidade institucional e sob gerenciamento do pesquisador, sem fins comerciais. À primeira vista, podem parecer sutis as diferenças entre as definições, porém as implicações éticas e operacionais revelam com maior profundidade a discrepância entre biobancos e biorrepositórios.

O armazenamento de materiais biológicos humanos e animais em biobancos e biorrepositórios é considerado uma atividade prioritária e estratégica para

pesquisa em biomedicina^{5,9} e definido como um dos temas de inovação em saúde pública pelo Ministério da Saúde¹⁰.

Classificação e tipos

Os biobancos e biorrepositórios podem abrigar uma gama de materiais biológicos - fluídos corporais (sangue, urina, líquido), células, tecidos parafinados e moléculas (DNA, RNA e proteínas) – e diferirem segundo o objetivo da amostragem¹¹.

Os biorrepositórios são constituídos a partir de um projeto específico sob responsabilidade do coordenador da pesquisa. Já os biobancos, podem ser dirigidos pelo governo, organizações sem fins lucrativos e empresas privadas e ter propósitos clínicos (transplantes, transfusões de sangue, diagnósticos genéticos), de pesquisas (estudos de farmacogenética, investigação de doenças neurodegenerativas, de gêmeos homozigóticos, populações isoladas), legais, educacionais e outros¹².

Existem vários tipos de biobancos cujas classificações variam consoante os autores. Por exemplo, de acordo com OECD - Guidelines on Human Biobanks and Genetic Research Databases⁶, Riegman et al.¹³, Tutton¹⁴, os biobancos podem ser de três tipos: 1) biobancos populacionais; 2) biobanco para estudos epidemiológicos de doenças específicas e 3) biobancos para biomarcadores de doenças específicas. Por sua vez, Harris e seus colaboradores¹⁵ classificam os biobancos de acordo com a sua finalidade. Segundo a tipologia dos autores, os biobancos podem incluir: 1) amostras residuais colhidas durante intervenções de cuidados de saúde, com finalidades terapêuticas e/ou de diagnóstico, incluindo neste grupo as colheitas de amostras de tumores; 2) amostras colhidas durante ensaios clínicos; 3) amostras colhidas para projetos de investigação específicos; e 4) amostras colhidas para biobancos populacionais. Por outro lado, Zielhuis¹⁶, simplificando a classificação, refere a existência de apenas dois tipos: os populacionais e os clínicos.

Estudos prospectivos, em grande escala, possuem várias vantagens para quantificação fidedigna e abrangente dos efeitos combinados de estilo de vida, meio ambiente, genótipo e outros determinantes das doenças. Em particular, eles permitem o estudo de uma ampla gama de condições, que evitam viés de memória como em caso de exposições avaliadas antes do desenvolvimento da doença, e permitem a investigação de fatores afetados pelo progresso da doença e consequente tratamento.

Em contraste, biobancos clínicos, concentrados em categorias específicas de doença, permitem estudos de casos-controle eficientes (por exemplo, para investigar interações gene-ambiente), bem como estudos de prognósticos- por exemplo, para investigar interações gene-tratamento^{1,5,6}.

Aplicações

Nos últimos anos, as inovações tecnológicas na área da saúde permitiram a análise de um grande número de dados obtidos através de diversos biomarcadores simultâneos, possibilitando o desenvolvimento de linhas de pesquisa para identificação e aplicação de fatores de risco, exposição, detecção precoce, diagnóstico, prognóstico e terapêutico em diferentes situações clínicas. Adicionalmente, extensivos esforços em busca de novas drogas de alvo molecular e novos processos diagnósticos para a indicação e monitoramento de seu uso vêm sendo desempenhado pelo meio acadêmico e iniciativas farmacêuticas privadas¹.

Isso fortaleceu uma nova área do conhecimento biomédico, conhecida como medicina translacional calcada na integração das ciências básicas, ciências sociais e ciências políticas com o objetivo de aperfeiçoar os cuidados aos pacientes e desenvolver medidas preventivas que não devem ser esgotadas somente pela provisão de recursos proporcionados pelos Serviços de Saúde¹⁷.

Para a rápida progressão desses estudos, o acesso a materiais biológicos e produtos moleculares de alta qualidade, bem documentados com informações clínicas é um ponto crucial, principalmente durante o processo de validação dos achados produzidos pela pesquisa experimental¹.

Do ponto de vista clínico e assistencial, o armazenamento de diferentes tipos de materiais biológicos humanos, como sangue periférico, urina ou fragmentos de tecidos biopsiados, promove condições para que os mesmos possam se beneficiar de inovações tecnológicas e desenvolvimentos de novas moléculas em medicina personalizada¹⁶. Em muitos casos, é importante para os pacientes e seus familiares que outros testes, anteriormente inexistentes, sejam oferecidos. A aplicação destes ensaios é sempre mais efetiva, se realizada na amostra do paciente afetado, ao invés de algum familiar, sendo este um requisito imprescindível para realização da maioria dos exames. Dessa maneira, o benefício de algumas novas técnicas somente é possível caso as

amostras dos pacientes tenham sido armazenadas em condições adequadas¹.

Atualmente, uma grande variedade de biobancos estão em funcionamento em universidades, hospitais, empresas e entidades sem fins lucrativos em todo o mundo. Alguns exemplos incluem^{18,19}: United Kingdom Biobank, Duke Biobank, University of Pennsylvania Tumor Tissue Bank, Biorepository Vector Nacional Gene – Indiana University School of Medicine, Mayo Clinic Biobank, Da Vinci European Biobank, Genetic Alliance Biobank, Washington University Translational Cardiovascular Biobank, focados principalmente no estudo de doenças crônicas não-transmissíveis.

Nessa mesma linha, no Brasil, encontra-se o Biobanco do Hospital A.C. Camargo e o Banco Nacional de Tumores do Instituto Nacional do Câncer, ambos relacionados à pesquisa em oncologia, que juntos já colecionam mais de 80.000 amostras de aproximadamente 20.000 pacientes²⁰. Além disso, outras instituições também apresentam repositórios de materiais biológicos (Hospital das Clínicas de Porto Alegre, Laboratório de Neurociências, Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, Hospital das Clínicas de Curitiba) focados no estudo de doenças psiquiátricas e degenerativas cerebrais, cardiovasculares e metabólicas^{1,21}.

No entanto, o desenvolvimento dos sistemas de transporte, a globalização comercial, o movimento populacional, as mudanças climáticas e ambientais são alguns dos fatores que têm favorecido, nas últimas décadas, a dispersão de microorganismos. Mundialmente, uma em cada três mortes é causada por doenças infecciosas ou de notificação, como HIV/AIDS, sarampo, malária, tuberculose, sendo que mais de 75 % dessas mortes ocorrem em países em desenvolvimento²². Porém, apenas 10 % das pesquisas mundiais abordam essas enfermidades. Entre 1975 e 1999, aproximadamente 1 % das novas drogas disponíveis eram utilizadas para doenças tropicais e tuberculose²³.

No Brasil, no ano de 2001, as doenças infecciosas e parasitárias representaram a segunda causa de internações na Região Nordeste, e a terceira e quarta causas de internações, respectivamente, nas Regiões Sul e Sudeste²⁴. Apesar de algumas enfermidades apresentarem tendência declinante em sua incidência como a poliomielite, a coqueluche, o tétano neonatal, muitas outras doenças emergentes e reemergentes dominaram o cenário da saúde brasileira. Uma definição adequada para essas enfermidades é descrita pelo CDC – Center

for Disease Control - EUA²⁵ como doença infecciosa clinicamente distinta, que tenha sido recentemente reconhecida, ou uma doença conhecida cuja incidência esteja aumentando em um dado lugar ou entre uma população específica, respectivamente.

O acesso a biobancos e biorrepositórios de materiais biológicos oriundos de pacientes com doenças infecciosas, associado a informações clínicas detalhadas tem valor imensurável tanto para fins de pesquisa como de assistência direta a pacientes, com óbvios benefícios para toda sociedade e grande impacto no âmbito da Saúde Pública¹.

Nesse cenário, destaca-se o Biobanco espanhol de HIV^{26,27}, que armazena diversos materiais biológicos de pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida, voltado para estudos translacionais na área, além dos diversos consórcios multicêntricos para pesquisa em tuberculose²⁸, também armazenando sangue, soro, escarro e outros tecidos de pacientes infectados. Poucos biobancos nacionais foram estabelecidos nos países em desenvolvimento como Chinese Kadoorie²⁹, o Mexican Biobank³⁰ e o Gambian National DNA Bank³¹. Estes teriam um grande potencial para pesquisa em doenças infecciosas e parasitárias, mas exploram pouco as amostras biológicas com essas suspeitas, sendo que grande parte dos estudos foi baseado em casos de tuberculose e malária^{28,32}.

Desafios

Um grande esforço vem sendo realizado pela comunidade científica internacional durante os últimos anos, a fim de normatizar processos para coleção de amostras biológicas¹. Países, como a Dinamarca³³ na década de 1990 e a Espanha³⁴ em 2007, estabeleceram normas legais específicas para esse tipo de atividade de pesquisa. A Organização Mundial da Saúde e várias outras instituições têm proposto diretrizes com a mesma finalidade³⁵⁻³⁸.

No Brasil, as diversas Resoluções de Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, em destaque, RDC n°67/08³⁹, RDC n°220/06⁴⁰, RDC n°33/06⁴¹ e RDC n°29/08⁴² estabelecem o funcionamento de bancos de tecidos oculares, musculoesqueléticos e células germinativas. Além disso, a Resolução 441/2011⁸ do Conselho Nacional de Saúde estabeleceu uma normatização para uso e armazenamento de material biológico humano com finalidade de pesquisa.

No entanto, apesar de todos esses esforços e da clara relevância da estruturação de biorrepositórios

e biobancos para acompanhar o desenvolvimento biotecnológico mundial, a normatização, mesmo em nível internacional, ainda é uma atividade que permanece relativamente fragmentada¹. As dificuldades apontadas na literatura nesse quesito incluem: (a) dificuldades logísticas individuais e regionais; (b) heterogeneidade nos protocolos para coleta, transporte, armazenamento e processamento pré-analítico das amostras; (c) falta de consistência e consenso na coleção de dados, anotação de espécimes e normas de uso das amostras depositadas^{1,13,43,44}.

No entanto, para tentar contornar essas dificuldades algumas instituições internacionais estão ativamente engajadas em conduzir e normatizar atividades relacionadas aos biobancos e biorrepositórios em uma escala global, com a meta final de qualificar a pesquisa biomédica promovendo interações entre as organizações envolvidas em armazenamento de materiais biológicos mundialmente, considerando as necessidades de desenvolvimento científico e tecnológico, a adequação bioética da utilização dessas amostras e o respeito aos Direitos Humanos^{1,45,46,47,48}.

No que concerne às questões éticas, um dos pontos fundamentais da discussão é relativo ao termo de consentimento livre e esclarecido dos pacientes. Enquanto que para biorrepositórios a Resolução CNS 441/11⁰⁸, complementando a Resolução CNS 347/05⁴⁹, prevê o uso de um formulário específico para o projeto em andamento, sendo necessária nova autorização para outras pesquisas; para Biobancos a mesma permite termos mais abrangentes e generalistas para o uso do material em estudos futuros.

Os biobancos e os biorrepositórios requerem infraestrutura com instalações adequadas para manutenção das amostras e mecanismos de segurança de acesso e controle de temperatura local, além de uma equipe técnica muito bem treinada^{48,49}. Além disso, equipamentos para o processamento das amostras devem ser contemplados juntamente com os protocolos e processos determinados por cada instituição. Do ponto de vista gerencial, as informações relativas às amostras devem ser organizadas e arquivadas permitindo o levantamento de dados para pesquisa e novos exames assistenciais futuros¹.

Logo, a estruturação e a manutenção de biobancos apresentam um custo operacional perene e caro. Tais despesas não financiam a pesquisa em si, mas custeiam a estrutura e os instrumentos que auxiliarão

no desenvolvimento da pesquisa. Mesmo sendo primordiais, tais custos não são facilmente cobertos por órgãos de financiamentos de pesquisas, universidades ou outras fontes, que tendem a financiar a pesquisa básica ou aplicada diretamente na forma de reagentes e insumos. Assim, qualquer biobanco precisa ter um modelo de financiamento sólido que permite tanto a sua configuração inicial, quanto sua operação ao longo do tempo. Ele também precisa se encaixar no sistema nacional de inovação. Sendo assim, uma das principais ações de governança de um Biobanco é desenvolver uma estratégia para ligar a rede da pesquisa à dos potenciais financiadores e apoiadores dessa estrutura. Para isso, os biobancos podem seguir um modelo empresarial, muitas vezes através de parcerias público-privadas; um modelo biossocial, em que grupos de pacientes ativistas promovem, financiam e facilitam a criação e o funcionamento do biobanco, ou um modelo público, onde o biobanco é mantido principalmente por meio do repasse de verbas estatais e de organizações de financiamento de pesquisa sem fins lucrativos⁵⁰.

Considerações Finais

Em suma, a estruturação e manutenção de repositórios de informações e materiais biológicos geram inúmeros desafios para as mais diversas áreas do conhecimento, contemplando questões relativas às condições ideais de armazenamento destes materiais biológicos e suas informações associadas desde o ponto de vista da gestão energética, dos recursos humanos, das condições técnicas, de compartilhamento e dos aspectos éticos, legais e sociais.

REFERÊNCIAS

1. Ashton-Prolla P, Clausell N, Fernandes MS, Matte U, Bittelbrunn AC, Melissa Prade Hemesath MP, et al. Biobanco do Hospital de Clínicas de Porto Alegre: aspectos técnicos, éticos, jurídicos e sociais. *Rev HCPA*. 2009;29(1):74-9.
2. Bravo E, Napolitano M, Santoro F, Belardelli F, Federici A. The Italian hub of population biobanks as a potential toll for improving public health stewardship. *Biopreserv Biobank*. 2013;11(3):173-5.
3. Elger BS, Caplan AL. Consent and anonymization in research involving biobanks: differing terms and norms present serious barriers to an international framework. *Embr Rep*. 2006;7(7):661-6.
4. Loft S, Poulsen HE. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J Mol Med*. 1996;74:297-312.
5. World Health Organization (WHO) -IARC. Common minimum technical standards and protocols for biological resource centres dedicated to cancer research. Lyon: WHO; 2007.
6. Organisation for Economic Cooperation and Development -OECD.

- Guidelines on Human Biobanks and Genetic Research Databases. Paris, OECD (ed.), 2009. [acesso 2013 Jun 28]. Disponível em: [http://www.oecd.org/science/biotech/44054609.pdf].
7. OECD Best Practice Guidelines for Biological Resource Centers - General Best Practice Guidelines for all BRCs. Paris, OECD (ed.), 2007. [acesso 2013 Jun 28]. Disponível em: [http://www.oecd.org/dataoecd/7/13/38777417.pdf].
 8. Brasil. Ministério da Saúde. CNS. Resolução CNS nº 441, de 12 de maio de 2011. Armazenamento e utilização de material biológico humano com finalidade de pesquisa. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 18 set. 2011. Seção 1, p.60.
 9. Organisation for Economic Cooperation and Development-OECD. Biological Resource Centers: underpinning the future of life sciences and biotechnology. OECD Ed. 1-66, 2001.
 10. Ministério da Saúde -MS. Organização Pan-Americana da Saúde 2011. [acesso 2013 Mai 28]. Disponível em: [http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/inovacao_temas_estrategicos_saude_publica_v1.pdf].
 11. Canazzo L, Tozzo P, Pegoraro R. Biobank research on oncological residual material: a framework between the rights of the individual and the interest of society. *BMC Med Ethics*. 2013;14(17):3-7.
 12. Sak J, Pawlikowski J, Goniewicz M, Witt M. Population biobanking in selected European countries and proposed model for a Polish national DNA bank. *J Appl Genet*. 2012;53(2):159-65.
 13. Riegman PHJ, Morente MM, Betsou F, de Blasio P, Geary P, Marble Arch Working group. Biobanking for better Healthcare. *Mol Oncol*. 2008;213-22.
 14. Tutton R. Banking expectations: reflections on the promises of biobanks. *Personal Med*. 2007;4:436-9.
 15. Harris JR, Burton P, Knoppers BM, Biedsoe AJ, Brookes AJ, Budin-Ljosne I, et al. Toward a roadmap in global biobanking for health. *Eur J Hum Genet*. 2012;20(11):1105-11.
 16. Zielhuis GA. Biobanking for epidemiology. *Public Health*. 2012;126(3):214-6.
 17. Feldman A. Does Academic Culture Support Translational Research? CTS: Clinical and Translational. *Science*. 2008;1(2):87-8.
 18. Parchomovsky G, Mattioli M. Quasi-Patents and Semi-Patents in Biobanking. In: Pascuzzi G, Izzo U, Macilotti M, editors. Comparative issues in the Governance of Research Biobanks. Italy: Springer; 2013.p.251-66.
 19. Yamada KA, Patel AY, Ewald GA, Whitehead DS, Pasque MK, Silvestry S, et al. How to build an integrated biobank: the Washington University translational cardiovascular biobank & repository experience. *Clin Transl Sci*. 2013;6(3):226-31.
 20. Marodin G, França P, Rocha JC, Campos AH. Biobanking for health research in Brazil: present challenges and future directions. *Rev Panam Salud Pública*. 2012;31(6):523-8.
 21. Aquino EM, Barreto SM, Bensenor IM, Carvalho MS, Chor D, Duncan BB, et al. Brazilian longitudinal study of adult health (ELSA-Brasil): objectives and design. *Am J Epidemiol*. 2012;175(4):315-24.
 22. Sgaier SK, Jha P, Mony P, Kurpad A, Lakshmi V, Kumar R, et al. Public health. Biobanks in developing countries: needs and feasibility. *Science*. 2007;318:1074-5.
 23. Trouiller P, Oliaro P, Torreile E, Orbinski J, Laing R, Ford N. Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. *Lancet*. 2002;359:2188-94.
 24. Barreto ML, Carmo EH. Padrões de adoecimento e de morte da população brasileira: os renovados desafios para o Sistema Único de Saúde. *Ciênc Saúde Colet*. 2007;12:1779-90.
 25. Center for Disease Control and Prevention -CDC. Addressing emergency infection disease threats: a prevention strategy for the United States. Atlanta: CDC;1994.
 26. García-Merino I, de las Cuevas N, Jiménez JL, Gallego J, Gómez C, Prieto C, et al. The Spanish HIV BioBank: a model of cooperative HIV research. *Retrovirology*. 2009;6-27.
 27. García-Merino I, de las Cuevas N, Jiménez JL, Garcia A, Gallego J, Gómez C, et al. Pediatric HIV BioBank: a new role of the Spanish HIV BioBank in pediatric HIV research. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2010;26(2):241-44.
 28. Betsou F, Parida SK, Guillerm M. Infectious diseases biobanking as a catalyst towards personalized medicine: *Mycobacterium tuberculosis* paradigm. *Tuberculosis*. 2011;91(6):524-32.
 29. Chen Z, Lee L, Chen J, et al. Cohort profile: the Kadoorie Study of Chronic Disease in China. *Int J Epidemiol*. 2005;34(6):1243-9.
 30. Tapia-Conyer R, Kuri-Morales P, Alegre-Díaz J, Whitlock G, Emberson J, Clark S, et al. Cohort profile: the Mexico City Prospective Study. *Int J Epidemiol*. 2006;35:243-9.
 31. Sirugo G, Schim van der Loeff M, Sam O, Nyan O, Pinder M, Hill AV, et al. A national DNA bank in The Gambia, West Africa, and genomic research in developing countries. *Nat Genet*. 2004;36:785-6.
 32. Gajalakshmi V, Peto R, Kanaka RTS, Jha, P. Smoking and mortality from tuberculosis and other diseases in India: retrospective study of 43000 adult male deaths and 35000 controls. *Lancet*. 2003;362:507-15.
 33. Almind G, Nielsen L, Pedersen NS, Riis P. Health science information banks - biobanks. Copenhagen: The Danish Medical Research Council; 1996.
 34. Rocha AC, Seoane JA. Alternative consent models for biobanks: the new Spanish law on of Biological Materials for biomedical research. *Bioethics*. 2008;22(8):440-7.
 35. Campbell JD, Skubitz APN, Somiari SB, Sexton KC, Pugh RS. International Society for Biological and Environmental Repositories (ISBER). 2008 Best Practices for Repositories: Collection, Storage, Retrieval and Distribution Research. *Cell Preser Technol* [Internet]. 2008;6:3-58. Disponível em: [http://www.isber.org/Pubs/BestPractices2008.pdf].
 36. National Cancer Institute -NCI. Best Practices for Specimen resources. NCI, Bethesda, 2007. [acesso Jul 22]. Disponível em: [http://biospecimens.cancer.gov/global/pdfs/NCI_Best_Practices_060507.pdf].
 37. Organisation for Economic Cooperation and Development-OECD. Best Practice Guidelines for Biological Resource Centers - General Best Practice Guidelines for all BRCs. Paris, OECD (ed.), 2007. [acesso 2013 Mai]. Disponível em: [http://www.oecd.org/dataoecd/7/13/38777417.pdf].
 38. Fan CT, Lin JC, Lee CH. Taiwan Biobank: a project aiming to aid Taiwan's transition into a biomedical island. *Pharmacogenomics*. 2008;9(2):235-46.

39. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 67, de 30 de setembro de 2008. Dispõe sobre o regulamento técnico para o funcionamento de banco de tecidos oculares de origem humana. [acesso 2013 Set]. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/2227e580474597539fccdf3fbc4c6735/RDC_67_08.pdf?MOD=AJPERES].
40. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 220, de 27 de dezembro de 2006. Dispõe sobre o regulamento técnico para o funcionamento de bancos de tecidos e musculoesqueléticos e de bancos de pele de origem humana. [acesso 2013 Set]. Disponível em: [<http://www.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a5d8d680474597419facdf3fbc4c6735/RDC+Nº+220-2004.pdf?MOD=AJPERE>].
41. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 33, de 17 de fevereiro de 2006. Aprova o regulamento técnico para o funcionamento de bancos de células e tecido germinativo. [acesso 2013 Set]. Disponível em: [<http://www.brandsus.com.br/legislacoes/anvisa/legislacoes/rdc/13647-33.html?q=>].
42. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 29, de 12 de maio de 2008. Aprova o Regulamento técnico para o cadastramento nacional dos Bancos de Células e Tecidos Germinativos (BCTG) e o envio da informação de produção de embriões humanos produzidos por fertilização in vitro e não utilizados no respectivo procedimento. [acesso 2013 Set]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/bc7c12804986e3528e5aff4ed75891ae/RDC_29_2008.pdf?MOD=AJPERES].
43. Beishon M. How Europe is taking on the big biobank challenge. *Cancer World*. 2008; 20-6.
44. Rose H. From hype to mothballs in four years: troubles in the development of large-scale DNA biobanks in Europe. *Community Genet*. 2006;9(3):184-9.
45. Public Population in Genomics and Society Repository Informations Tolls (P3G). [acesso 2013 Jun]. Disponível em: [<http://www.p3gobservatory.org/repository/manualIntro.htm>].
46. Forum for International Biobanking Organization -FIBO. [acesso 2013 Mai]. Disponível em: [<http://www.isber.org/newsletters/December2008.pdf>].
47. UNESCO International Declaration about Human Genetic Data. *Law Hum Genome Rev* 2003;19:239-53.
48. Meijer I, Molas-Gallart J, Mattsson P. Networked research infrastructures and their governance: the case of biobank. *Scien Publ Policy*. 2012;39:494-9.
49. Conselho Nacional de Saúde. Resolução CNS 347, de 13 de janeiro de 2005. Regulamentação do armazenamento e utilização de material biológico humano no âmbito de projetos de pesquisa. [acesso 2013 Out]. Disponível em: [http://www.portalsbc.com.br/pdfs_legislacao/Resolu%C3%A7%C3%A3o%20CNS%20N%C2%BA%20347-2005.pdf].
50. Herbert Gottweis and Georg Lauss. Biobank governance: heterogeneous modes of ordering and democratization. *J Community Genet*. 2012;3(2):61-72.

***Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) em alimentos de origem animal: uma revisão sistemática**

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin: A systematic review

RIALA6/1574

Ellyne Souza CERQUEIRA, Rogeria Comastri de Castro ALMEIDA*

*Endereço para correspondência: Escola de Nutrição, Universidade Federal da Bahia, Av. Araújo Pinho n° 32, Canela, Salvador, BA, Brasil, CEP: 40.110-160. Tel.: +55 71 3283 7737; fax: +55 71 3283 7705. E-mail: rogerianut@gmail.com
Recebido: 08.08.2013 - Aceito para publicação: 17.12.2013

RESUMO

Staphylococcus aureus resistente à meticilina (MRSA) é uma das principais causas de infecção em humanos, e está bem documentado o acometimento desta bactéria em indivíduos hospitalizados. Contudo, o relato de colonização e infecção de indivíduos na comunidade, sem contato prévio com o ambiente hospitalar, sugere outras fontes de contaminação, como o emprego de fármacos na pecuária, o que induz a colonização por MRSA em animais de produção e consequente contaminação de produtos cárneos. O objetivo do presente estudo foi de compilar e analisar as publicações científicas sobre a ocorrência de MRSA em alimentos. Neste contexto, foi realizada uma revisão de literatura sistemática nas bases de dados Lilacs, Medline e Pubmed, e selecionados os artigos publicados no período de 2000 a 2013. Observou-se número significativo de estudos em que foram analisadas diversas amostras. Foi encontrada grande variação nas prevalências de MRSA, bem como nas metodologias utilizadas para análise. O MLST tipo ST398, comumente encontrado em suínos, foi o mais isolado nas amostras analisadas nos diferentes estudos. No entanto, as linhagens ST8 e ST5, pertencentes à biovariedade humana, foram também frequentemente detectados, o que sugere que os manipuladores de alimentos têm também sido a fonte de contaminação da carne por MRSA.

Palavras-chave. MRSA, alimentos, resistência.

ABSTRACT

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a major cause of infections in humans and onset of this bacterium in hospitalized individuals has been well documented. However, a report on MRSA colonization and infection of individuals in the community, without prior contact with hospital environment, suggests the occurrence of other sources of contamination, such as the use of drugs in livestock, causing colonization of production animals with MRSA, and resulting in contamination of meat products. This study aimed at compiling and analyzing the scientific publications on the occurrence of MRSA in foods. A systematic review of the literature was performed in Lilacs, Medline and Pubmed databases, and the articles published from 2000 to 2013 were selected. A significant number of studies involving different samples was observed. Wide variations on the MRSA prevalence were found, and also on the methodologies used for the analyses. The MLST strain ST398 is commonly detected in pigs, and it was the most isolated bacterium from samples analyzed in different studies. ST8 and ST5 strains, belonging to human biovar, have also been frequently isolated, suggesting that food handlers have been a source for meat contamination with MRSA.

Keywords. MRSA, foods, resistance.

INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus resistente à metilina (MRSA) é uma das principais causas de infecção para humanos. Até 1980, os relatos de MRSA consistiam em casos isolados, mas após 1982 cepas epidêmicas foram descritas como multirresistentes, com capacidade de colonizar e causar surtos de infecções em todo o mundo, tornando-se uma causa amplamente conhecida de morbimortalidade¹.

O termo MRSA é usado para designar as linhagens de *S. aureus* que não respondem ao tratamento com antibióticos β -lactâmicos². Caracterizam-se como cepas que possuem o gene *mecA* ou demonstram uma concentração inibitória mínima (CIM) à oxacilina mais alta do que 4 mg/L. Entretanto, alguns isolados clínicos são *mecA*-positivos e susceptíveis à oxacilina³. O gene *mecA* é responsável pela codificação da proteína de ligação à penicilina (PBP2a) que funciona como um alvo alternativo resistente à inibição pelo antibiótico, permitindo a formação da camada de peptídeoglicano da parede celular, impedindo a morte bacteriana⁴.

A aquisição de MRSA por indivíduos hospitalizados é bem documentada. Fatores de risco para contaminação nosocomial por MRSA incluem hospitalização prévia, duração da hospitalização, uso prévio de antibiótico, entre outros⁵. Contudo, registros de infecções comunitárias graves, especificamente em indivíduos que não foram hospitalizados e nem estiveram em contato com profissionais da saúde, ou mesmo com doentes colonizados, sugerem outras formas de contaminação por MRSA, como, por exemplo, o emprego desses fármacos na pecuária. O contato direto do homem com os animais, a exposição às fontes ambientais contaminadas com resíduos da produção pecuária e, principalmente, os alimentos de origem animal, constituem meios de transferência de MRSA para humanos^{6,7}.

A maioria dos animais domésticos abriga a espécie *S. aureus*. Esta é uma importante causa de infecções na criação de gado, aves, suínos, entre outros, tornando-se fonte de prejuízos econômicos na agropecuária. Assim, é comum o uso de antibióticos, com fins terapêuticos, profiláticos, ou como estimulador de crescimento. Porém, seu uso indiscriminado na pecuária pode estimular o aparecimento de resistência na população bacteriana⁷.

Como consequência da colonização e infecção por MRSA em animais de produção, destaca-se a possibilidade de contaminação dos produtos cárneos

destinados ao consumo⁸. Estudos recentes relatam o isolamento de linhagens de MRSA em alimentos de origem animal, incluindo carne suína, gado bovino, frango, entre outros, além de queijo bovino, leite e outros produtos derivados⁹.

Devido à semelhança entre os antibióticos utilizados em seres humanos com os utilizados nos animais, torna-se evidente a correlação entre a problemática da resistência bacteriana na pecuária com a saúde humana¹⁰. Se linhagens resistentes a drogas são transferidas para humanos através do consumo de produtos de origem animal contaminados, elas podem colonizá-los e transferir a sua resistência aos antimicrobianos¹¹.

Ações no cuidado com a saúde humana já são realizadas objetivando o uso racional de antibióticos, contudo, o mesmo não acontece no setor da pecuária. No Brasil, a regulamentação do uso de antibióticos em animais compete ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e à Secretaria de Defesa Agropecuária. O Programa Nacional de Controle de Resíduos no Leite (PCRL), criado em 1999 por este Ministério, tem a finalidade de regulamentar o controle e a vigilância dos resíduos em alimentos de origem animal. Suas ações visam evitar a violação dos limites máximos permitidos de resíduos (LMR) e de coibir o uso de substâncias proibidas. Todavia, apesar de todos os esforços, não é possível fiscalizar toda a produção, cabendo aos produtores e às empresas prezarem pela qualidade do produto¹⁰.

Destaca-se a importância em demonstrar a presença cada vez mais frequente de MRSA em alimentos de origem animal, a fim de alertar às autoridades de saúde pública e da agropecuária sobre a necessidade de adoção de medidas de controle. Essas medidas devem ser adotadas tanto no manejo de animais, quanto em toda cadeia produtiva de alimentos, visando à minimização da contaminação dos alimentos com cepas de MRSA, e, conseqüentemente, a diminuição do risco de transmissão desse micro-organismo à espécie humana.

A presente revisão sistemática objetivou compilar e analisar as publicações científicas sobre a presença de MRSA em alimentos de origem animal. A revisão sistemática contribui para entender melhor as rotas de transmissão, prevenção da propagação de MRSA em tais alimentos. Esse tipo de revisão é importante para o campo de estudo – somente com a incorporação de novos conhecimentos/compilação bibliográfica torna-se possível o ajustamento à nova realidade e a busca por melhorias contínuas. A revisão cita fontes fiáveis e atuais.

MATERIAL E MÉTODOS

Realizou-se uma revisão de literatura sistemática sobre *Staphylococcus aureus* resistente à Metilina (MRSA) em alimentos de origem animal. O recurso prático de análise foi a coleta de artigos publicados em três bases de dados, Lilacs, Medline e Pubmed. A busca foi conduzida no período de dezembro de 2012 a fevereiro de 2013, utilizando a combinação dos descritores MRSA, carne bovina, carne suína, frango, leite, queijos, peixe e seus correspondentes na língua inglesa.

As publicações foram pré-selecionadas a partir dos títulos que mencionassem resistência antimicrobiana em *S. aureus* presentes em algum gênero alimentício de origem animal. Em seguida, procedeu-se com a leitura da metodologia dos diversos estudos, a fim de selecionar aqueles que atendessem aos seguintes critérios, previamente especificados: estudos experimentais cuja metodologia envolvesse isolamento de MRSA em alimentos de origem animal, publicados no período de 2000 a 2013. Foram excluídos estudos repetidos entre as diferentes bases de dados; que não foram publicados em modelo de artigo; revisões e aqueles cuja metodologia incluísse análise de humanos e/ou animais.

A análise dos estudos foi realizada a partir da sumarização das informações em instrumento contendo os itens: autor, ano de publicação, amostra, metodologia utilizada e principais resultados encontrados.

RESULTADOS

Através da pesquisa nas bases de dados, foram identificadas 82 publicações científicas relacionadas à MRSA em alimentos de origem animal (Figura 1), sendo três no Lilacs, 40 no Medline e 39 no Pubmed. Cinquenta e seis artigos foram excluídos por estarem repetidos entre as diferentes bases, porque eram cartas, dissertação ou notas, ou por falta de acesso ao texto completo. O remanescente de 25 artigos foi analisado a partir de leitura das metodologias e sete foram excluídos devido à inclusão de humanos e animais *in vivo* no quadro de amostragem. Assim, um total de 19 artigos foram incluídos nesta revisão.

Descrição dos estudos

Uma sumarização está demonstrada na Tabela 1. A maioria dos estudos foi realizada nos Estados Unidos (3/15; 8 %) e Holanda (3/15; 8 %). Os alimentos de origem animal analisados com maior frequência foram amostras

de carne suína em sete (36,8 %) das 19 pesquisas incluídas nessa revisão, seguidas pelas amostras de carne bovina e de leite, que foram avaliadas em seis estudos (31,6 %), separadamente; frango em cinco (26,3 %); peru e peixe em três estudos (15,8 %), separadamente; produtos cárneos em quatro (21,1 %); produtos lácteos em dois (10,5 %); carne de carneiro em um (5,3 %) e dois estudos (10,5 %) relataram analisar amostras de carne, mas não especificaram a espécie.

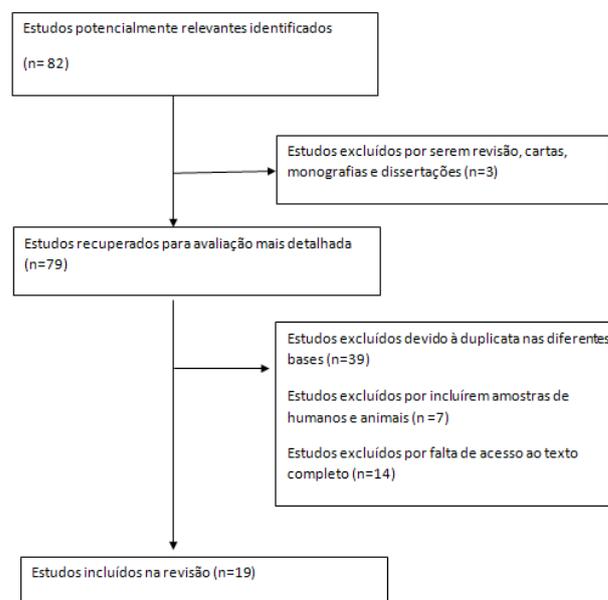


Figura 1. Fluxograma representando o processo de seleção dos estudos incluídos na revisão sistemática

As técnicas tradicionais de cultura para a detecção de MRSA, representadas pela inoculação em placas de ágar sangue ou de ágar com meio seletivo, seguido de confirmação das colônias características foram amplamente utilizadas. Os métodos de detecção direta, como inoculação em ágar cromogênico, também apresentou uma utilização expressiva.

O método mais utilizado para detecção de estirpes MRSA nos alimentos foi o teste disco-difusão somado a confirmação através de reação de polimerase em cadeia (PCR) para detecção do gene *mecA*, observado em sete (36,8 %) dos artigos analisados. O teste de aglutinação em látex com confirmação através de PCR foi usado em cinco (26,3 %) dos estudos. Esse mesmo quantitativo de estudos (31,6 %) utilizou a técnica de PCR isoladamente para identificação do micro-organismo, mas, quatro destes realizaram teste de susceptibilidade antimicrobiana, como análise complementar dos isolados. No total,

Tabela 1. Sumarização dos estudos incluídos na revisão

| Autores | Local de realização da pesquisa | Amostras analisadas | Metodologia | Total de estirpes MRSA isoladas N (%) | Teste de sensibilidade antimicrobiana para estirpes MRSA | MLST tipos | spa tipos |
|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------------------------|------------|----------------------|
| *ATYAH et al, 2010 ¹² | Malásia | Peixe | Semeadura em ágar Sangue, seguida de confirmação usando <i>API STAPH Detection Kit</i> . Os isolados de <i>S. aureus</i> foram submetidos a PCR para confirmação adicional. O fenótipo MRSA foi inicialmente identificado por cultura em ágar a base de oxacilina para o rastreio de resistência (ORSAB; Oxoid Limited, Basingstoke, England). As estirpes de MRSA cultivadas no ORSAB foram então confirmadas por PCR. | 98* (50 %) - | - | - | - |
| De BOER et al, 2009 ⁹ | Holanda | Carne de suíno; vitela; carne de carneiro; frango; peru; outros | Foram utilizados 2 meios de enriquecimento (MHB + 6.5 % NaCl e vermelho de fenol contendo cefoxitina e aztreonam). Em seguida, o inóculo foi semeado em ágar MRSA-ID. Para confirmação, colônias típicas foram subcultivadas em TSA e testadas com <i>Staphylect Plus test</i> (Oxoid). Confirmação adicional foi feita por meio da identificação do gene <i>SNUC</i> e do gene <i>mecA</i> , utilizando PCR em tempo real. Foi feita <i>spa</i> -tipagem e MLST. | 264 (11,9 %) | - | ST398 | t011 t034 t108 |
| CRAGO et al, 2012 ¹³ | Canadá | Alimentos preparados com carne; alimentos preparados sem carne; carnes bovina, suína, frango e desconhecidas, laticínio (leite, queijos e sorvete) | As amostras foram examinadas quanto a presença de <i>B. cereus</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Aeromonas</i> spp., <i>Campylobacter</i> spp., <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> spp., e <i>Yersinia</i> spp. Colônias presuntivas de <i>S. aureus</i> foram confirmadas usando um tubo de teste de coagulase com plasma de coelho. PCR foi utilizado para identificar o gene <i>nuc</i> . Os isolados foram examinados para resistência à metilina usando difusão em disco em ágar MH, usando disco de 1 µg de oxacilina e 30 µg de cefoxitina, e finalmente PCR para detectar o gene <i>mecA</i> . | 0 (0,0 %) | - | - | - |

Continua

Cont.

| Autores | Local de realização da pesquisa | Amostras analisadas | Metodologia | Total de estirpes MRSA isoladas N (%) | Teste de sensibilidade antimicrobiana para estirpes MRSA | MLST tipos | spa tipos |
|----------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|-------------------------------|
| DIAS et al, 2011 ¹⁴ | Brasil | Leite | Utilizou-se a técnica de PCR para detecção do gene <i>femA</i> , que identifica o <i>S. aureus</i> . Dessas amostras, apenas as com amplificação positiva foram submetidas à detecção dos genes <i>sea</i> , <i>seb</i> , <i>sec</i> . Foi também pesquisada a presença do gene <i>mecA</i> , que identifica MRSA. | 16 (8,0 %) | - | - | - |
| FLEBER et al, 2011 ¹⁵ | Alemanha | Peru; produtos cárneos de peru; frango; produtos cárneos de frango | Foram utilizados 2 meios de enriquecimento (MH + NaCl e TSB suplementado com 3,5 µg/mL de cefoxitina e 75 µg/mL de aztreonam). Em seguida, plaqueamento em ágar cromogênico MRSA seletivo. Colônias características foram subcultivadas em Columbia Ágar sangue e submetidos a testes de confirmação para <i>S. aureus</i> (teste coagulase e teste de aglutinação em látex). Para a confirmação de MRSA, todos os isolados foram submetidos a PCR. Todos os isolados foram testados para a sua suscetibilidade antimicrobiana por microdiluição em caldo que incluiu 10-12 concentrações de 30 agentes antimicrobianos em série de 2 vezes por diluição. Realizou-se <i>spa</i> -tipagem e MLST. | 32 (37,2 %) | Todos os isolados MRSA foram resistentes a oxacilina 20 (62,5 %) dos isolados MRSA apresentaram multiresistência | ST398 ST9 ST5 | t1430 t002 t011 t034 |
| HAMMED et al, 2012 ¹⁶ | Japão | Peixe cru pronto para o consumo | Utilizou-se TSB + NaCl como meio de enriquecimento. Seguido de semeadura em BP e ágar sal manitol contendo 4 µg/mL de cefoxitina. Supostos estafilococos foram identificados com base na morfologia da colônia, hemólise em ágar sangue, coloração de Gram e testes de coagulação em slidex. A confirmação de <i>S. aureus</i> e MRSA foi conduzida usando PCR. Todos os <i>S. aureus</i> isolados foram caracterizados para genes codificadores de fatores de virulência de enterotoxinas e <i>spa</i> -tipagem e MLST. Foi feita ainda teste de sensibilidade com 19 antibióticos através de disco-difusão. | 5 (2,5 %) | 3 isolados resistentes a oxacilina não possuíam o gene <i>mecA</i> Todos os MRSA foram multiresistentes | ST8 | t1767 |

Continua

Cont.

| Autores | Local de realização da pesquisa | Amostras analisadas | Metodologia | Total de estirpes MRSA isoladas N (%) | Teste de sensibilidade antimicrobiana para estirpes MRSA | MLST tipos | spa tipos |
|-----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|--------------------|
| HANSON et al, 2011 ¹⁷ | Estados Unidos | Carne de suíno; carne bovina; frango; peru | As amostras foram coletadas através de swabs na superfície pré-umedecida com caldo enriquecimento contendo triptona, NaCl, manitol e extrato de levedura. O inóculo foi semeado em ágar MRSA e Columbia acrescido de ácido nalidíxico. <i>S. aureus</i> foram confirmados através de coloração de Gram, catalase, coagulase e teste de aglutinação em látex. MRSA foi identificado através do teste de aglutinação em látex, (Oxoid). PCR foi utilizado para identificação do gene <i>mecA</i> e <i>spa</i> -tipagem e MLST foi realizado nos MRSA isolados. Todos os isolados foram testados para sensibilidade antimicrobiana através do método de diluição em caldo. | 2 (1,2 %) | Todos os isolados MRSA foram resistente a oxacilina e multiresistentes | ST8 ST398 | t008 t034 |
| LIM et al, 2010 ¹⁸ | Coreia | Carne bovina; carne suína; frango | Foi feita identificação convencional das cepas de <i>S. aureus</i> ; incluindo testes complementares: Gram, catalase, coagulase. Teste de sensibilidade a antimicrobianos por difusão em ágar; PCR para detecção de <i>mecA</i> e MLST para tipificação. | 16 (0,6 %) | Todos isolados MRSA foram resistentes a oxacilina 3 (18,7 %) dos isolados MRSA foram multiresistentes | ST72 ST692 | - |
| NAM et al, 2011 ¹⁹ | Coreia | Leite | Os isolados, presumidamente, <i>S. aureus</i> , foram submetidos a <i>VITEK system</i> para identificação da espécie e depois submetidos teste de sensibilidade antimicrobiana por difusão em ágar. Foi feito ainda teste PCR para detecção dos genes <i>mecA</i> e <i>spa</i> -tipagem e MLST para tipificação. | 25* (6,2 %) | Todos isolados MRSA foram resistentes a oxacilina 11 (64,7 %) dos isolados MRSA foram multiresistentes | ST72 ST1 | t324 t286 NT |
| NORMANO et al, 2007 ²⁰ | Itália | Leite; produtos lácteos; carnes; produtos cárneos | Cepas foram identificadas como <i>S. aureus</i> e confirmadas através de DNase e identificação do gene <i>mecA</i> por PCR. As estirpes <i>mecA</i> positivas foram testadas para a produção de enterotoxinas estafilocócicas por meio de aglutinação em látex reverso passivo (RPLA), utilizando o kit SET-RPLA. Foram também testadas quando à sensibilidade antimicrobiana 12 cepas por meio de disco-difusão em ágar MH. | 6 (0,4 %) | 3 (50 %) dos isolados MRSA foram multiresistentes | - | - |

Continua

Cont.

| Autores | Local de realização da pesquisa | Amostras analisadas | Metodologia | Total de estirpes MRSA isoladas N (%) | Teste de sensibilidade antimicrobiana para estirpes MRSA | MLST tipos | spa tipos |
|-------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|----------------------|
| O'BRIEN et al, 2012 ²¹ | Estados Unidos | Carne suína | As amostras foram adicionadas a água peptonada e, em seguida, uma alíquota foi transferida para caldo BP com telurito de K. O inóculo foi semeado em ágar BP com gema de ovo e telurito de K e em meio cromogênico específico para MRSA. Colônias características de <i>S. aureus</i> e MRSA, respectivamente, foram examinadas através de coloração de Gram, catalase, teste coagulase em tubo e teste de aglutinação em látex. A resistência à metilina foi avaliada através de teste de aglutinação em látex para MRSA (Oxoid) e confirmada através de PCR para detecção de gene <i>mecA</i> . Os isolados de MRSA foram sujeitos a tipagem molecular e testados quanto à susceptibilidade antimicrobiana através de diluição em caldo para 10 antibióticos. | 26 (6,6 %) | 4 (15,4 %) isolados MRSA foram sensíveis a oxacilina 10 (38,5 %) dos isolados foram multiresistentes | ST398 ST8 ST5 | t034 t002 t008 |
| *PEREIRA et al., 2009 ²² | Portugal | Carne crua; produtos cárneos fermentados; queijos; leite; outros produtos alimentares | Detectaram-se as cepas de <i>S. aureus</i> através de métodos convencionais para estafilococos coagulase positiva (ágar Baird-Parker, Gram, catalase, coagulase em tubo e DNA-se). Em seguida, o DNA foi isolado através de PCR, e o mesmo foi utilizado para detecção de <i>mecA</i> , 16S rRNA e <i>nuc</i> . O ensaio de enzima ligada fluorescente (ELFA) foi utilizado para a detecção de enterotoxinas estafilocócicas específicas e teste de sensibilidade antimicrobiana em difusão em ágar. A determinação de genes de enterotoxinas estafilocócicas também foi realizada através de multiplex PCR. As concentrações inibitórias mínimas (CIM (mg/mL) para <i>S. aureus</i> foram determinadas pelo método de diluição em ágar. | 1* (0,68 %) | 38 % dos isolados foram resistentes a oxacilina | - | - |
| PU; WANG; GE, 2009 ²³ | Estados Unidos | Carne suína e carne bovina | Enriquecimento em TSB + NaCl seguido de plaqueamento em BP com cefoxitina (4 µg/mL), seguido de teste da coagulase em tubo. A confirmação de <i>S. aureus</i> foi feita utilizando multiplex PCR para o fragmento espécie-específico 442 pb e para determinação do gene <i>mecA</i> . Isolados de MRSA foram então caracterizados para susceptibilidade antimicrobiana usando teste de microdiluição em caldo. MLST e <i>spa</i> -tipagem para tipificação. | 22 (18,3 %) | | ST5 ST8 | |

Continua

Cont.

| Autores | Local de realização da pesquisa | Amostras analisadas | Metodologia | Total de estirpes MRSA isoladas N (%) | Teste de sensibilidade antimicrobiana para estirpes MRSA | MLST tipos | spa tipos |
|---------------------------------------|---------------------------------|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|----------------------|
| SHAHRAZ et al, 2012 ²⁴ | Irã | Hambúguer | 10 g da amostra foi homogeneizada em solução de Ringer e 1 ml da suspensão foi transferido para meio de carne cozida com NaCl. Em seguida, transferido para meio BP suplementado com emulsão de gema de ovo telurito. Colônias com morfologia típica de <i>S. aureus</i> foram submetidas aos testes: coloração de Gram, catalase, coagulase, oxidação e fermentação em ágar Sal Manitol e DNase. Resistência a antibióticos dos isolados de <i>S. aureus</i> foi feita pelo método de difusão em disco em ágar MH. PCR foi feito para detecção do gene <i>mecA</i> . | 57 (22,3 %) | Todos os isolados MRSA possuíam o gene <i>mecA</i> Quatro (2 %) isolados MSSA possuíam o gene <i>mecA</i> | - | - |
| TAVAKOL et al, 2012 ²⁵ | Holanda | Leite | As amostras foram inoculadas em ágar sangue, para identificação de MRSA pela sua morfologia (colônias amarelas hemolíticas). Os isolados foram submetidos ao teste <i>Staphaurex Plus</i> , método de difusão em disco com 30 µg de cefoxitina e PCR para gene <i>mecA</i> . Em seguida, foi feito teste de sensibilidade a antibióticos em todas estirpes MRSA, através do método de disco-difusão. Em seguida, foi feita MLST e <i>spa</i> -tipagem para tipificação. | 14 (0,04 %) | Todas as estirpes MRSA possuíam o gene <i>mecA</i> e foram multiresistentes | ST398 | t011 t899 t108 |
| *TÜRKYILMAZ et al, 2010 ²⁶ | Turquia | Leite | Estafilococos isolados a partir de amostras de leite bovino foram identificados com base em características das colônias. Estirpes de <i>S. aureus</i> foram testadas para resistência à metilina, utilizando o método de disco-difusão com cefoxitina. Testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram realizados em ágar Mueller-Hinton. Estirpes resistentes foram testadas para gene <i>mecA</i> . Realizou-se ainda tipificação do <i>SSCmec</i> , MLST e <i>spa</i> tipificação. | 16* (17,2 %) | Todas as estirpes MRSA possuíam o gene <i>mecA</i> e foram multiresistentes | ST239 ST8 | t030 t190 |

Continua

Cont.

| Autores | Local de realização da pesquisa | Amostras analisadas | Metodologia | Total de estirpes MRSA isoladas N (%) | Teste de sensibilidade antimicrobiana para estirpes MRSA | MLST tipos | spa tipos |
|-------------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|------------|--------------|
| VAN LOO et al, 2006 ²⁷ | Holanda | Carne de porco e carne bovina | Foram feitos dois enriquecimentos (MH + NaCl e caldo vermelho de fenol contendo cefoxitina e aztreonam) seguidos de plaqueamento em ágar cromogênico e Columbia. Colônias características de <i>S. aureus</i> foram confirmadas com teste de aglutinação em látex, teste coagulase em tubo contendo plasma de coelho e DNase. Confirmação da resistência à metilina e identificação de <i>S. aureus</i> foi feito através de PCR duplex em tempo real para gene <i>mecA</i> e fragmentos 442-pb específicos de <i>S. aureus</i> . Sensibilidade a cefoxitina e oxacilina foi determinada usando difusão em disco. Todos os isolados <i>S. aureus</i> foram genotipados por <i>spa</i> -tipagem. | 2 (2,5 %) | Todos os isolados MRSA foram resistentes a oxacilina e cefoxitina | - | t108 t024 |
| VÁZQUEZ-SANCHEZ et al, 2012 ²⁸ | Espanha | Produtos de Peixe | Realizou-se diluição sérica em água peptonada, seguida de plaqueamento em BP suplementado com emulsão de gema de ovo e telurito de K. Colônias típicas foram isoladas e cultivadas em BHI. Em seguida, foram submetidos aos testes bioquímicos: coagulase, DNase, e fermentação em manitol. Caracterização genotípica dos isolados foi realizada por RAPD-PC. E PCR também foi utilizado para detecção dos genes <i>seg-sei</i> , <i>sea-see</i> , <i>blaZ</i> e <i>mecA</i> . Teste de diluição em caldo e disco-difusão foram realizados com 12 antibióticos. | 0 (0,0 %) | - | - | - |
| WEESE et al, 2010 ²⁹ | Canadá | Carne suína; carne bovina; frango | Inoculação em caldo de enriquecimento (triptona, NaCl, manitol e extrato de levedura). Diluições seriadas de 10 vezes do caldo de enriquecimento foram inoculados em tampão fosfato salino (PBS) e, em seguida, plaqueamento em ágar Cromogênico para MRSA. Isolados foram identificados como <i>S. aureus</i> pela morfologia da colônia, coloração de Gram, catalase, coagulase e teste de aglutinação em látex. Resistência à metilina foi confirmada pelo teste de aglutinação em látex para PBP2a. Isolados foram tipificados por MLST e <i>spa</i> -tipagem. | 36 (5,3 %) | - | ST5 | t242 |

* Informaram apenas o número de isolados de *S. aureus*, omitindo o total de amostras analisadas.

17 (89,5 %) publicações utilizaram PCR como método principal ou secundário nas análises.

A maioria das publicações (11/64,7 %) realizou tipificação molecular dos isolados de MRSA como análise complementar, que incluiu tipagem por sequenciamento do *multilocus* (MLST) e sequenciamento da região polimórfica X do gene da proteína A estafilocócica (*spa*-tipagem). Seis estudos avaliaram a presença de genes de enterotoxinas estafilocócicas.

Isolamento de MRSA em alimentos de origem animal

A prevalência de MRSA em alimentos de origem animal variou entre 0 % e 37,2 %. Três artigos informaram apenas o número de isolados de *S. aureus*, omitindo o total de amostras analisadas. A maioria dos estudos observou baixíssimas frequências de isolamento (≤ 8 %), sendo que, apenas quatro pesquisas relataram percentuais superiores a 10 %, enquanto que dois estudos não isolaram estirpes de MRSA nos alimentos investigados.

O maior percentual de isolamento de MRSA por alimento de origem animal foi relatado em amostras de hambúrgueres embalados (22,3 %), seguido de leite de mastite bovina (17,2 %), carne suína *in natura* (14,2 %), peru (12,42 %) e frango (10,2 %). Carne bovina, peixe e queijo apresentaram as menores prevalências.

Genes codificadores de toxinas estafilocócicas foram comumente encontrados abrangendo estirpes de MRSA isoladas.

Entre as publicações que realizaram tipificação molecular das estirpes MRSA isoladas, os principais MLST encontrados foram ST398, ST8 e ST5. Os *spa* mais encontrados através da tipagem foram t011, t108 e t034.

DISCUSSÃO

A presente revisão identificou 19 artigos sobre MRSA em alimentos de origem animal, envolvendo uma ampla variedade de amostras. Esse número expressivo de publicações científicas está associado à preocupação com o evidente aumento de MRSA em animais destinados à produção de alimentos e a suposição de que a colonização destes seria a fonte de contaminação de produtos cárneos por MRSA³⁰.

MRSA foi isolado pela primeira vez em animais criados para alimentação humana em 1972, a partir de casos de mastite em vacas leiteiras na Bélgica. Desde então, este micro-organismo surgiu em uma variedade de populações

animais, tais como gatos, cachorros, cavalos, ovelhas, suínos, bezerros e aves^{8,31}.

No entanto, existe uma distinção explícita entre estirpes de MRSA isoladas em animais de companhia e aquelas isoladas em animais destinados à produção de alimentos. Animais de companhia são geralmente contaminados através de contato com pessoas infectadas ou colonizadas com MRSA, de modo que a sua presença nesses animais ocorre em função da transmissão de um reservatório humano³⁰⁻³². Enquanto que em animais destinados à produção de alimentos, um clone de origem desconhecida emergiu recentemente, sugerindo que o surgimento de MRSA nesses animais estaria associado ao uso de antibióticos na pecuária³⁰.

A carne suína aparece como alimento mais investigado nos diversos estudos, certamente devido ao envolvimento epidemiológico dessa espécie animal com a transmissão de um clone específico de animais de produção para humanos. Estirpes isoladas em casos de infecção por MRSA associadas à comunidade (CA-MRSA), sem conexão epidemiológica com o ambiente hospitalar, foram associadas à MRSA em suínos, e estudos subsequentes têm confirmado que o contato com suínos é um fator de risco para infecção e colonização por esse micro-organismo^{30,31}. Na Holanda, criadores de suínos e seus familiares foram encontrados com MRSA, sendo o contato com essa espécie reconhecido como um fator de risco para a transmissão de MRSA para humanos⁹.

Diferentes métodos foram utilizados para o isolamento de MRSA em alimentos. Poucos estudos utilizaram enriquecimento antes da inoculação em placas, e apenas três estudos utilizaram enriquecimento duplo durante as análises das amostras coletadas. Como o número de MRSA em alimentos pode ser baixo, e como há frequentemente variação da microbiota, o enriquecimento duplo é recomendado nesse tipo de análise, pois pode aumentar a taxa de detecção^{9,32}.

O teste disco-difusão foi amplamente utilizado entre os estudos. Este é um método fenotípico, baseado numa avaliação qualitativa. As pesquisas utilizaram tanto o disco de oxacilina, quanto o de cefoxitina nas análises. A oxacilina é utilizada para os testes de disco-difusão há várias décadas. Contudo, nos últimos anos, diversos autores têm demonstrado uma boa exatidão no teste de disco-difusão com cefoxitina para o diagnóstico de MRSA³³. Destaca-se que a detecção de MRSA baseada em métodos convencionais de

susceptibilidade a antimicrobianos, tanto através de disco-difusão, quanto através de microdiluição em caldo, podem ser trabalhosos, demorados, altamente dependentes das condições de crescimento e pouco discriminatórios²⁴.

O teste de aglutinação em látex, bastante utilizado nos estudos analisados, é um método com exatidão próxima a 100 % baseado na detecção da proteína PBP2a. A técnica PCR para detecção do gene *mecA* foi a mais utilizada nas pesquisas para identificar isolados de MRSA. Esse método é baseado numa caracterização genotípica e constitui método *gold standard* para avaliação qualitativa da resistência à metilina³³. É um método útil e bastante sensível para análises de resistência antimicrobiana²⁴.

Alguns estudos que realizaram teste de sensibilidade antimicrobiana somados à técnica de PCR relataram incompatibilidade entre os resultados obtidos nos métodos, representada por duas situações: 1) isolados apresentavam resistência a oxacilina pelo teste disco-difusão, entretanto, não abrigavam o gene *mecA*; o que pode ocorrer devido a outros mecanismos de resistência, que são raros, não relacionados ao gene *mecA*, como a superprodução de beta-lactamases ou a produção de PBPs habituais, porém com graus variados de afinidade pelos betalactâmicos³³; 2) isolados sensíveis a oxacilina abrigavam o gene *mecA*. Uma possível explicação para este achado é a existência de heteroresistência entre as estirpes. Cada célula na população pode carregar a informação genética para resistência, mas somente uma pequena fração pode realmente expressar o fenótipo resistente sob condições de teste *in vitro*^{20,33}.

A maioria dos estudos utilizou os métodos MLST e *spa*-tipagem para a tipificação molecular das estirpes MRSA isoladas. Ambos correspondem a uma excelente ferramenta para investigação da evolução clonal de MRSA e determinação da estirpe ancestral³⁴.

A prevalência de MRSA variou significativamente nos estudos analisados, entre 0 % e 37,2 %. Comparações de prevalências nesse caso não são recomendadas, devido à variação dos métodos, esquemas de coleta de amostras, e os tipos de amostras^{21,30}. Ainda assim, estes estudos indicam que MRSA está presente em uma ampla variedade de alimentos. A contaminação de alimentos de origem animal pode ocorrer durante o abate de animais, devido à contaminação de carcaças e do meio ambiente com MRSA⁹.

O risco da presença de MRSA em alimentos está relacionado à possibilidade do mesmo ser colonizado com o micro-organismo durante a sua produção, manipulação e/ou consumo^{9,31}. Há também a possibilidade de desenvolvimento de doença invasiva causada pela ingestão de alimentos contaminados, principalmente em indivíduos imunossuprimidos, cujas respostas das imunidades específicas e não-específicas são incapazes de atuar como barreiras para prevenir a colonização do trato gastrointestinal. Entretanto, este é um evento raro, sendo relatado na literatura apenas uma vez, no contexto de um grande surto hospitalar de MRSA, devido à ingestão de alimento contaminado por um paciente na enfermaria do Erasmus Medical Centre em Roterdã, Holanda, levando o paciente ao desenvolvimento de sepse severa e morte³¹.

A exposição a esses riscos depende muito das medidas de higiene adotadas, da capacidade da estirpe em colonizar o hospedeiro e da quantidade de micro-organismos presentes na amostra. Com relação a esse último aspecto, a prevalência de MRSA em alimentos é geralmente baixa, visto que, a maioria dos estudos observou frequências de isolamento inferiores a 8 %. Além disso, *S. aureus* não é um bom competidor comparado com os micro-organismos de deterioração em carne crua e as condições para o crescimento de MRSA nestes alimentos são muito pobres, o que torna a possibilidade de contaminação humana muito pequena^{9,31,32}.

Curiosamente, entre os alimentos analisados o hambúrguer embalado foi o que apresentou maior frequência de isolamento de MRSA. Este achado pode estar relacionado às condições de processamento, devido à contaminação do alimento por equipamentos ou manipuladores contaminados. Já as amostras de leite apresentaram a segunda maior prevalência de MRSA nos diferentes estudos. Isso mostra que MRSA está comumente associado com a ocorrência de mastite em vacas leiteiras, o que justificaria a presença desse micro-organismo no leite, aspecto relevante em termos de segurança alimentar, quando esse alimento é consumido cru ou usado para a produção de queijos elaborados com leite cru²⁰. O isolamento de MRSA em carnes suína, bovina, peru e frango crus torna-se irrelevante como risco potencial relativo a ingestão, quando tais alimentos são corretamente preparados e submetidos a processamento térmico. Contudo, a manipulação da carne antes de ser cozida envolve um risco de

colonização por MRSA se o manipulador, por exemplo, tocar suas narinas com as mãos contaminadas^{30,31}.

Todos os estudos que realizaram teste de sensibilidade antimicrobiana encontraram perfil de multirresistência entre a maioria ou todos os isolados MRSA avaliados. Esse resultado é preocupante, pois a presença de patógenos multirresistentes em alimentos é reconhecida como um perigo para a saúde humana, uma vez que torna limitada a escolha de princípios-ativos para o controle do micro-organismo e, portanto, mais difícil a sua erradicação^{28,35}.

Alguns estudos relataram a detecção de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas entre as estirpes de MRSA isoladas. Estes achados fornecem evidências de que MRSA também pode estar envolvido em surtos de intoxicação alimentar²¹. Tal como acontece com *S. aureus* sensível à metilina (MSSA), o alimento contaminado por MRSA pode dar origem a uma intoxicação alimentar estafilocócica pela ingestão de enterotoxinas pré-formadas. Entretanto, é importante considerar que a resistência a metilina não é um fator relevante para a produção de enterotoxinas. Portanto, a presença de MRSA em alimentos pode não representar um risco maior de intoxicação alimentar do que MSSA^{30,31}.

O MLST da linhagem ST398 foi isolado na maior parte das amostras analisadas nos diferentes estudos, bem como os genes *spa* das linhagens t034, t108 e t011. Estas linhagens clonais são atribuídas ao complexo CC398, identificado inicialmente em porcos, sugerindo que esta linhagem tenha emergido nessa espécie animal, sendo subsequentemente disseminada para outros animais, inclusive humanos^{8,30}. A presença dessa linhagem clonal em alimentos ratifica que o uso de antibióticos na pecuária e consequente emergência de MRSA em animais destinados ao consumo humano são a principal fonte de contaminação. A administração de antibióticos em animais para a produção de alimentos, tanto para fins terapêuticos quanto como promotores de crescimento e, principalmente, o uso de agentes antimicrobianos com fraca atividade ou em uma dosagem inapropriada, podem aumentar a oportunidade para o processo de seleção de bactérias resistentes à antibióticos²⁴.

Em um estudo realizado na Holanda, incluído nessa revisão, uma menor prevalência de MRSA foi observada em carnes de frango criado biologicamente (aves selvagens ou criadas sem a utilização de promotores

de crescimento) em comparação a prevalência de MRSA isolados de aves criadas pelo sistema convencional⁹.

As linhagens ST8 e ST5 também estiveram frequentemente presentes nas amostras de alimentos de origem animal. Estas duas estirpes de MRSA pertencem a biovariedade humana, sugerindo que os manipuladores de alimentos são também fonte de contaminação, e levantam a possibilidade destas estirpes serem introduzidas durante o processamento¹⁸, enfatizando o papel dos humanos como um importante reservatório de MRSA^{9,20}.

Pesquisas genômicas adicionais são necessárias para determinar, com maior especificidade, a origem dos isolados de MRSA em alimentos. Mesmo sem a exata compreensão sobre a origem de contaminação de alimentos por MRSA, políticas restritivas sobre o uso de antibióticos na pecuária são necessárias para o controle do micro-organismo²⁴. Além disso, a presença de MRSA em alimentos de origem animal pertencentes à biovariedade humana aponta para a necessidade de melhorias das práticas de higiene na produção alimentar, com a adoção de medidas como implantação de Boas Práticas de Fabricação e do sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), com objetivo de evitar a ocorrência, o crescimento e a sobrevivência de MRSA em alimentos prontos para o consumo^{9,24}.

Tendo em vista a ocorrência de cepas de MRSA resistentes a múltiplos antibióticos há possibilidade de, em breve, existirem bactérias resistentes a todos os agentes antimicrobianos disponíveis para tratamento de pacientes, ainda mais levando em consideração que novas classes de antibióticos não têm sido descobertas nos últimos 30 anos. Assim, terapias alternativas já têm sido propostas para o controle deste micro-organismo³⁶.

Uma das tecnologias alternativas para o controle de patógenos é o uso de bacteriófagos, que são componentes da microbiota natural da produção de alimentos, desde o campo até a comercialização do produto final. Além de serem estáveis nesses ambientes são prontamente recuperados do solo, da água, de efluentes, das fezes e dos próprios alimentos. Eles têm sido usados como um tratamento efetivo contra infecções bacterianas por aproximadamente 100 anos, mas o complexo médico-industrial atual recusa-se a reconhecê-los como uma terapêutica válida da medicina³⁷. Existem alguns relatos na literatura sobre

o uso de bacteriófagos para o controle de *S. aureus*. Esses fagos são obrigatoriamente líticos e polivalentes, a exemplo do fago K, que demonstrou capacidade de infectar uma variedade de estirpes MRSA, inclusive aquelas com resistência a vancomicina³⁷. Outro estudo relatou purificação bem sucedida de uma lisina codificada pelo bacteriófago Φ MR11, designada MV-L, que lisou rápida e completamente células de *S. aureus*, incluindo MRSA inoculados artificialmente em narinas de ratos e *S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina. A administração intraperitoneal de MV-L também protegeu ratos contra morte séptica, sem quaisquer efeitos prejudiciais³⁸. Esse estudo demonstrou que a fagoterapia constitui uma importante ferramenta para o tratamento de MRSA e várias outras bactérias resistentes a antibióticos, que estão crescendo no ambiente hospitalar e clínicas de saúde em todo o mundo, e cuja cura não tem sido oficialmente reconhecida.

CONCLUSÃO

A presença de MRSA em alimentos, embora reduzida e bastante divergente entre os estudos, indica que esta pode ser uma importante fonte de contaminação para humanos. Entretanto, os diferentes métodos de análise dificultam a realização de comparações e a correta estimativa do risco.

O duplo enriquecimento em caldo e a utilização de PCR são recomendados para a detecção de MRSA em produtos cárneos. A tipificação molecular também demonstra ser bastante importante para determinar a ancestralidade clonal e, portanto, a fonte de contaminação.

Apesar da ocorrência de CA-MRSA relacionada ao cultivo suíno, os estudos evidenciam que outros alimentos de origem animal, além da carne suína, são contaminados com MRSA, necessitando devida atenção.

Estudos longitudinais realizados em toda cadeia alimentar, da produção até o consumo, são necessários para melhor conhecimento das rotas de transmissão, podendo fornecer ferramentas para prevenção da propagação de MRSA. Desde então, medidas devem ser adotadas, como controle do uso de antibióticos na pecuária e práticas de higiene e conservação adequada dos alimentos. Além disso, terapias alternativas para o tratamento de infecções por MRSA tanto em animais, quanto em humanos, necessitam ser elucidadas e reconhecidas, a exemplo da fagoterapia, que demonstra eficácia contra MRSA e outras bactérias resistentes a antibióticos.

REFERÊNCIAS

1. Rana N, Shrivastava S. Comparative study of antimicrobial activity of different plants against multi drug resistant pathogen *Staphylococcus aureus* ATCC242 isolated from burnt patients and the effect of different binary combination of antimicrobial plant extracts. *Int J Food Safety*. 2011;13:88-92.
2. Sturmer FCR. Caracterização parcial do elemento *ccr* em *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina isolados no sul do Brasil [dissertação]. Porto Alegre (RS): Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande Do Sul; 2008.
3. Hososaka Y, Hanaki H, Endo H, Suzuki Y, Nagasawa Z, Otsuka, Y, et al. Characterization of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*: a new type of MRSA. *J Infect Chemother*. 2007;13:79-86.
4. Rivera-Tapia JA. Antibiotic resistance, public health problem. *Anal Med Asociac Med Amer Brit Cowdray Hosp*. 2003;48(1):42-47.
5. Tacconelli E, Angelis G, Cataldo MA, Pozzi E, Cauda R. Does antibiotic exposure increase the risk of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolation? A systematic review and meta-analysis. *J Antim Chemother*. 2008;61:26-38.
6. Ferreira WA, Vasconcelos WS, Ferreira CM, Silva MFP, Gomes JS, Alecrim MGC. Prevalência de *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA) em pacientes atendidos em ambulatório de dermatologia geral em Manaus-Amazonas. *Rev Patol Trop*. 2009; 38(2):83-92.
7. Costa PMRM. Resistências antimicrobianas em avicultura. Congresso de Ciências Veterinárias; 2002; Oeiras; BR, p.251-60.
8. Cuny C, Friedrich A, Kozytska S, Layer F, Nubel U, Ohlsen K, et al. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) indifferent animal species. *Int J Med Microbiol*. 2010;300 (2-3):109-17.
9. De Boer E, Zwartkruis-Nahuis JTM, Wit B, Huijsdens XW, Neeling AJ, Bosch T, et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. *Int J Food Microbiol*. 2009;134(1-2):52-6.
10. Korb A, Brambilla DK, Teixeira DC, Rodrigues RM. Riscos para a saúde humana do uso de antibióticos na cadeia produtiva leiteira. *Rev Saúde Pública*. 2011;4(1):21-36.
11. Mota RA, Silva KPC, Freitas MFL, Porto WJN, Silva LB. G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2005;42(6):465-70.
12. Atyah MA, Zamri-Saad M, Siti-Zahrah A. First report of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from cage-cultured tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Vet Microbiol*. 2010;144(3-4):502-4.
13. Crago B, Ferrato C, Drews SJ, Svenson LW, Tyrrell G, Louie M. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in food samples associated with foodborne illness in Alberta, Canada from 2007 to 2010. *Food Microbiol*. 2012;32(1):202-5.
14. Dias, NL, Silva DCB, Oliveira DCBS, Fonseca Junior AA, Sales, ML, Silva N. Detection of genes of *Staphylococcus aureus*, enterotoxins and methicillin resistance in Milk. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2011;63 (6):1547-52.
15. Fessler AT, Kadlec K, Hassel M, Hauschild T, Eidam C, Ehrlich R. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from food and food products of poultry origin in Germany. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(20):7151-7.

16. Hammad AM, Watanabe W, Fujii T, Shimamoto T. Occurrence and characteristics of methicillin-resistant and-susceptible *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from Japanese retail ready-to-eat raw fish. *Int J Food Microbiol*. 2012;156(3):286-9.
17. Hanson BM, Dressler AE, Harper AL, Scheibel RP, Wardyn SE, Roberts LK, et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) on retail meat in Iowa. *J Infect Public Health*. 2011;4(4):169-74.
18. Lim SK, Nam HM, Park HJ, Lee HS, Choi MJ, Jung SC, et al. Prevalence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in raw meat in Korea. *J Microbiol Biotechnol*. 2010; 20(4):775-8.
19. Nam HM, Lee AL, Jung SC, Kim MN, Jang GC, Wee SH, et al. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Korea. *Foodborne Pathog Dis*. 2011; 8(2):231-8.
20. Normanno G, Corrente M, La Salandra G, Dambrosio A, Quaglia NC, Parisi A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. *Int J Food Microbiol*. 2007;117(2):219-22.
21. O'Brien AM, Hanson BM, Farina SA, Wu JY, Simmering JE, Wardyn SE, et al. MRSA in conventional and alternative retail pork products. *PLoS One*. 2012;7(1):e30092.
22. Pereira V, Lopes C, Castro A, Silva J, Gibbs P, Teixeira P. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. *Food Microbiol*. 2009;26(3):278-82.
23. Pu S, Han F, Ge B. Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from Louisiana retail meats. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75(1):265-7.
24. Shahraz F, Dadkhah H, Khaksar R, Mahmoudzadeh M, Hosseini H, Kamran M, et al. Analysis of antibiotic resistance patterns and detection of *mecA* gene in *Staphylococcus aureus* isolated from packaged hamburger. *Meat Sci*. 2012;90(3):759-63.
25. Tavakol M, Riekerink RG, Sampimon OC, van Wamel WJ, van Belkum A, Lam TJ. Bovine-associated MRSA ST398 in the Netherlands. *Acta Vet Scand*. 2012;54:28.
26. Türkyilmaz S, Tekbiyik S, Oryasin E, Bozdogan. Molecular epidemiology and antimicrobial resistance mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk. *Zoon Public Health*. 2010;57(3):197-203.
27. Van Loo IH, Diederer BM, Savelkoul PH, Woudenberg JH, Roosendaal R, van Belkum A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat products, the Netherlands. *Emerg Infect Dis*. 2007;13(11):1753-5.
28. Vázquez-Sánchez D, López-Cabo M, Saá-Ibusquiza P, Rodriguez-Herrera JJ. Incidence and characterization of *Staphylococcus aureus* in fishery products marketed in Galicia (Northwest Spain). *Int J Food Microbiol*. 2012;157(2):286-96.
29. Weese JS, Avery BP, Reid-Smith RJ. Detection and quantification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clones in retail meat products. *Lett Appl Microbiol*. 2010;51(3):338-42.
30. Weese JS. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Animals. *ILAR J*. 2010;51(3):233-44.
31. Kluytmans JA JW. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in food products: cause for concern or case for complacency? *Clin Microbiol Infect*. 2010;16(1):11-5.
32. European Food Safety Authority. Assessment of the Public Health significance of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in animals and foods. *EFSA J*. 2009;993:17-73.
33. Mímica MJ, Mendes CMF. Diagnóstico laboratorial da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus*. *J Bras Patol Med Lab*. 2007;43(6):399-406.
34. Teixeira MM. Infecção hospitalar por *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) em um hospital público de ensino: tipagem epidemiológica molecular e fenotípica de amostras isoladas em 1998 e 2008 [tese]. Universidade Federal do Triângulo Mineiro; 2011.
35. Gandra TKV, Oliveira MG, Bassani MT, Silva WP. Perfil de Resistência/Sensibilidade a Antibióticos em Cepas de Estafilococos Coagulase Positiva Isoladas de Embutidos e Queijos. *Anais do XVIII CIC - Congresso de Iniciação Científica II Mostra Científica XI ENPOS. Encontro de Pós-Graduação I Mostra Científica*; 2009, Pelotas, BR.
36. Fiorentin L. O potencial terapêutico dos bacteriófagos. Simpósio sobre alternativas para antimicrobianos em suínos e aves. 2003; Passo Fundo; BR. Mann NH. The potential of phages to prevent MRSA infections. *Res Microbiol*. 2007;159:400-5.
37. Rashel M, Uchiyama J, Ujihara T, Uehara Y, Kuramoto S, Sugihara S, et al. Efficient elimination of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* by cloned lysin derived from bacteriophage Φ MR11. *J Infect Dis*. 2007;196(8):1237-47.

Avaliação da qualidade das baciloscopias realizadas na Rede de Laboratórios de Tuberculose da Região Metropolitana da Baixada Santista/SP

Quality assessment of Sputum-Smear Microscopy performed by the Tuberculosis Laboratory Network of the Metropolitan Region of Baixada Santista/SP

RIALA6/1575

Adriana Cavalcante SANTIAGO*, Felipe Araújo de Souza FERREIRA, Andréa Gobetti Coelho BOMBONATTE, Clemira Martins PEREIRA, Liliana Aparecida ZAMARIOLI

* Endereço para correspondência: Laboratório de Micobactérias, Núcleo de Ciências Biomédicas, Centro de Laboratório Regional de Santos. Rua Silva Jardim 90, Santos, SP, Brasil. CEP: 11015-020. E-mail: adrianac.santiago@gmail.com
Recebido: 17.04.2013 - Aceito para publicação: 20.12.2013

RESUMO

O Programa Nacional de Controle da Tuberculose (TB) do Ministério da Saúde utiliza a baciloscopia de escarro como metodologia padrão no diagnóstico da TB pulmonar. Para garantir a qualidade do exame é recomendado o uso de Controle Externo de Qualidade (CEQ) da baciloscopia na rede de laboratórios de diagnóstico de TB. Neste estudo foi avaliada a qualidade das baciloscopias de escarro da rede de laboratórios locais, por meio de supervisão indireta, na Região Metropolitana da Baixada Santista/SP. Em nove laboratórios locais foram analisadas 5.691 baciloscopias, coradas pelo Ziehl-Neelsen. Tais amostras foram avaliadas nos seguintes itens: análise macroscópica (distensão) e microscópica (coloração) dos esfregaços e o índice bacilosscópico (C%). Para avaliá-las, utilizou-se a metodologia padrão do Manual Nacional de Vigilância Laboratorial de TB e outras Micobactérias/MS de 2008. Utilizando-se metodologia recomendada, das 713 lâminas analisadas, 529 (74,2 %) foram satisfatórias na avaliação macroscópica e 631 (88,5 %), satisfatórias na avaliação microscópica. Na análise da releitura, uma unidade laboratorial apresentou dois resultados falsos positivos e C = 97,5 %. Embora os resultados encontrados tenham sido aceitáveis, sugere-se a realização de atividades contínuas do CEQ, com ênfase na aplicação de ações corretivas nas principais causas de erro no desenvolvimento da técnica de baciloscopia.

Palavras-chave. tuberculose pulmonar, diagnóstico laboratorial, baciloscopia de escarro, controle de qualidade.

ABSTRACT

The Brazilian Ministry of Health national program for tuberculosis (TB) control (Programa Nacional de Controle da Tuberculose) determines the sputum smear microscopy as the standard methodology for TB diagnosis. In order to achieve diagnosis quality assurance it is recommended to set up an External Quality Assessment (EQA) scheme in the TB diagnosis laboratory network. This study aimed at evaluating the quality of sputum smear microscopy performed by the local laboratory network of the metropolitan area of Baixada Santista, SP, by means of an indirect supervision. The 5,691 sputum samples stained with Ziehl-Neelsen in nine local laboratories were evaluated. The applied EQA methodology was in accordance with the National TB and Other AFB Laboratory Surveillance Manual – Ministry of Health, 2008. The analyzed parameters were: macroscopic (smear uniformity) and microscopic (staining) analyses of the sputum smears and bacilloscopic index (C%). Of 713 analyzed slides, 529 (74.2 %) were satisfactory on macroscopic features and 631 (88.5 %) on microscopic evaluation. In the slides rechecking, one laboratory showed two false-positive results and C = 97.5 %. Although the general results have been acceptable, a continuous EQA activity should be carried out, emphasizing the use of correcting actions on the common sources of error that may occur in performing the AFB microscopy technique.

Keywords. pulmonary tuberculosis, laboratorial diagnostics, sputum smear microscopy for tuberculosis, quality control.

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, sendo a forma pulmonar, a mais frequente. A transmissão ocorre quando o doente bacilífero, ou seja, aquele cuja baciloscopia de escarro é positiva, fala, espirra ou tosse lançando no ar gotículas contendo no interior o bacilo¹.

A Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2010, estimou no Brasil uma taxa média de incidência de 85 casos de TB por 100 mil habitantes/ano, em que 62 % dos casos novos apresentaram baciloscopia positiva². Neste mesmo ano, o Estado de São Paulo notificou aproximadamente 16.170 casos novos de TB pulmonar e 56,5 % dos casos apresentaram baciloscopia positiva^{3,4}. A Região Metropolitana da Baixada Santista registrou as mais altas taxas de incidência do Estado de São Paulo, variando de 60 a 100 casos de TB por 100 mil habitantes⁵.

Dentre as políticas governamentais para controle da doença, o Ministério da Saúde (MS) através do Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT) recomenda a baciloscopia direta do escarro como “*método padrão*” para a investigação sistemática de sintomáticos respiratórios e identificação dos casos bacilíferos. Quando executado corretamente, detecta de 60 a 80 % dos casos de TB pulmonar em uma comunidade^{1,6,7}.

Os serviços de laboratório de diagnóstico bacteriológico da TB, uma das atividades fundamentais do Programa, são organizados em sistema de rede. No Estado de São Paulo, a rede de serviços de diagnóstico laboratorial da TB organiza-se de acordo com o nível de complexidade técnica e funcional em: Laboratórios de baixa complexidade – Laboratórios Locais (LL) que são unidades laboratoriais que estão geralmente inseridas nas unidades básicas de saúde dos municípios e realizam a baciloscopia; Laboratórios de média complexidade – Laboratórios de Referência Regionais do Estado (LRRE) que estão vinculados a Secretaria Estadual de Saúde com área geográfica de abrangência municipal e desenvolvem atividades de apoio técnico-operacional a rede LL; e Laboratório de alta complexidade – Laboratório de Referência Estadual (LRE) que é um Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN) vinculado a Secretaria Estadual de Saúde com área geográfica de abrangência estadual, tendo como competência organizar e coordenar a rede de LL e LRRE públicos e privados^{1,6}.

Visando assegurar a qualidade técnica e a padronização dos exames, o MS recomenda à rede de laboratórios a utilização do Controle Externo de Qualidade (CEQ) da baciloscopia. O sistema permite que os laboratórios participantes avaliem sua capacidade pela comparação dos seus resultados aos de outros laboratórios da rede, através da aplicação de dois métodos: Supervisão Indireta e Supervisão Direta. A Supervisão Direta é realizada por meio de visita de um técnico credenciado pelo laboratório de referência aos LL, enquanto que a Supervisão Indireta atua à distância pelo LRRE e consiste na releitura cega das lâminas enviadas pelos LL^{1,6}.

O estudo teve como objetivo avaliar a qualidade técnica das baciloscopias de escarro realizadas na rede de LL de TB da Região Metropolitana da Baixada Santista, segundo dados obtidos na Supervisão Indireta pelo LRRE.

MATERIAL E MÉTODO

O estudo foi do tipo descritivo e como metodologia de avaliação das baciloscopias utilizou-se o padrão do Consenso Global⁷, descrito no Manual Nacional de Vigilância Laboratorial de Tuberculose e outras Micobactérias/MS de 2008 do MS⁶.

Laboratórios participantes: Participaram da avaliação do CEQ da baciloscopia, nove unidades laboratoriais da rede de diagnóstico de TB da Região Metropolitana da Baixada Santista/SP. As unidades laboratoriais foram identificadas como LL e codificadas pelas letras (A, B, C, D, E, F, G, H e I).

Amostragem das Baciloscopias: Inicialmente os LL participantes do estudo foram orientados a guardar e enviar a produção trimestral das lâminas de baciloscopia do período de 2010 a 2011. Juntamente com as lâminas foram enviadas cópias do Livro de Registro dos Resultados de Baciloscopia e do mapa da contagem dos bacilos.

Foram encaminhadas pelos laboratórios participantes 5.691 lâminas de baciloscopia de escarro das quais foram sorteadas 713 para avaliação. A amostragem seguiu os critérios do MS para o controle de qualidade que preconiza uma amostragem de 80 lâminas por laboratório, para a avaliação da qualidade, de modo a assegurar uma sensibilidade de 80 % e especificidade de 100 % com intervalo de confiança de 95 %⁶.

Para a obtenção dessa amostragem (80 lâminas) foi utilizado o quociente proporcional

Tabela 1. Distribuição das lâminas de baciloscopia de escarro enviadas pelos Laboratórios Locais (LL) e avaliadas pelo Laboratório de Referência Regional do Estado (LRRE), da Região Metropolitana da Baixada Santista/SP, no período de 2010-2011

| Laboratórios Locais (LL) | Total de lâminas de baciloscopia | | |
|--------------------------|----------------------------------|------------------------|--------------------------------|
| | Enviadas pelos (LL) <i>n</i> | Positivas <i>n</i> (%) | Avaliadas pelo (LRRE) <i>n</i> |
| A | 1.055 | 128 (12,1) | 80 |
| B | 172 | 22 (12,8) | 80 |
| C | 73 | 5 (6,8) | 73 |
| D | 1.286 | 86 (6,7) | 80 |
| E | 147 | 8 (5,4) | 80 |
| F | 1.065 | 155 (14,6) | 80 |
| G | 321 | 39 (12,1) | 80 |
| H | 163 | 19 (11,7) | 80 |
| I | 1.409 | 85 (6,0) | 80 |
| Total | 5.691 | 547 (9,8) | 713 |

através da divisão do número total de lâminas de cada LL por 80 e o número de partida foi escolhido por sorteio aleatório de um número qualquer entre 1 e o número do quociente proporcional. As lâminas foram selecionadas a partir do número de partida. Quando o número de lâminas de baciloscopia foi menor que 80 lâminas num período de três meses, todas as lâminas foram avaliadas⁶ (Tabela 1).

Avaliação técnica das lâminas de baciloscopia: As baciloscopias de escarro foram analisadas quanto: à confecção do esfregaço; à coloração pelo método de Ziehl-Neelsen (ZN) e ao resultado da leitura através da contagem semiquantitativa em cruces. Cada uma dessas atividades constituiu uma categoria de análise, para as quais foram utilizados os seguintes indicadores de avaliação:

(A) Avaliação Macroscópica (distensão) – na análise do esfregaço utilizou-se a classificação: a) satisfatório ou homogêneo, quando cobriu 2/3 da lâmina sem espaços vazios; b) não satisfatório ou não homogêneo, quando se apresentou de forma circular ou não cobriu 2/3 da lâmina. Quando o esfregaço foi classificado em não homogêneo, houve uma segunda classificação em: espesso ou delgado.

(B) Avaliação Microscópica (coloração) – na análise da coloração aplicou-se a seguinte classificação: a) satisfatória;

b) não satisfatória ou descoloração inadequada. Quando a lâmina foi classificada como descoloração inadequada foi realizada uma segunda classificação em: presença de cristais de fucsina ou excesso de aquecimento.

A qualidade técnica final das baciloscopias é definida pelo somatório das percentagens dos esfregaços classificados como satisfatórios pelos itens A e B; sendo considerado adequado quando o valor encontrado seja $\geq 80\%$.

(C) Avaliação da concordância e/ou discordância dos resultados – na análise do índice baciloscópico utilizou-se a avaliação de concordância (C), calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$C = \left(\frac{\text{N}^\circ \text{ lâminas concordantes}}{\text{total de lâminas relidas}} \right) \times 100.$$

Os resultados discordantes foram classificados como Falso Positivo (FP) e Falso Negativo (FN). Os resultados FP foram definidos como esfregaços com resultado positivo no LL e negativo no LRRE. Os resultados FN foram definidos como esfregaços com resultado negativo no LL e positivo no LRRE. Diferenças de resultados em lâminas com 1 a 9 BAAR em 100 campos observados, não foram classificadas como discordâncias importantes⁶.

Tabela 2. Resultado das avaliações satisfatórias macroscópicas (A) e microscópica (B) das lâminas de baciloscopia, da Região Metropolitana da Baixada Santista/SP, período 2010-2011

| Laboratórios Locais (LL) | n | A | | B | | (A+B) |
|--------------------------|------------|------------|-------------|------------|-------------|--------------|
| | | n | % | n | % | % |
| A | 80 | 64 | 80,0 | 68 | 85,0 | 82,50 |
| B | 80 | 62 | 77,5 | 77 | 96,3 | 86,88 |
| C | 73 | 45 | 61,6 | 56 | 76,7 | 69,18 |
| D | 80 | 70 | 87,5 | 75 | 93,8 | 90,63 |
| E | 80 | 59 | 73,8 | 67 | 83,8 | 78,75 |
| F | 80 | 73 | 91,3 | 78 | 97,5 | 94,38 |
| G | 80 | 38 | 47,5 | 64 | 80,0 | 63,75 |
| H | 80 | 58 | 72,5 | 77 | 96,3 | 84,38 |
| I | 80 | 60 | 75,0 | 69 | 86,3 | 80,63 |
| Total | 713 | 529 | 74,2 | 631 | 88,5 | 81,23 |

Para quantificar e classificar a qualidade das baciloscopias de escarro dos LL participantes do estudo, os indicadores obtidos na avaliação técnica das lâminas foram transportados para um banco específico criado em programa *Microsoft Office Excel/ Windows*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das técnicas bacteriológicas, a baciloscopia direta em ordem de prioridade é a mais importante, pois permite descobrir as fontes de infecção mais contagiantes, constituídas em sua grande maioria pelos portadores

de TB pulmonar com tosse, expectoração e positivos ao exame¹.

A baciloscopia, realizada pelo método de ZN, além da sua importância epidemiológica, por sua simplicidade também oferece vantagem operacional técnica e econômica. Sabe-se que o rendimento da baciloscopia é de 60 % a 80 % dos casos de tuberculose pulmonar, de acordo com a prevalência local e com os cuidados metodológicos empregados na manipulação das amostras respiratórias, apesar de só identificar Bacilo Álcool-Ácido Resistente (BAAR). Esta técnica também é utilizada para acompanhar a evolução bacteriológica

Tabela 3. Índice de concordância na releitura das lâminas de baciloscopia dos Laboratórios Locais, submetidas ao CEQ, período 2010-2011

| Laboratórios Locais (LL) | n | Resultado da releitura das lâminas | | | Concordância % |
|--------------------------|----|------------------------------------|--------------|------|----------------|
| | | Concordantes | Discordantes | | |
| | | | FN* | FP** | |
| A | 80 | 80 | 0 | 0 | 100 |
| B | 80 | 80 | 0 | 0 | 100 |
| C | 73 | 73 | 0 | 0 | 100 |
| D | 80 | 80 | 0 | 0 | 100 |
| E | 80 | 80 | 0 | 0 | 100 |
| F | 80 | 80 | 0 | 0 | 100 |
| G | 80 | 78 | 0 | 2 | 97,5 |
| H | 80 | 80 | 0 | 0 | 100 |
| I | 80 | 80 | 0 | 0 | 100 |

*FN: Falso Negativo **FP: Falso Positivo

do paciente pulmonar, inicialmente positivo durante o tratamento^{1,6,8,9}.

A Tabela 1 apresenta a distribuição da produção das lâminas de baciloscopias dos LL e o resultado de positividade. Constatou-se que das 5.691 baciloscopias realizadas no período analisado, a positividade foi de 9,8 %, confirmando uma alta carga bacilar, justificando a utilização do exame como método para estabelecer a etiologia da doença nessa população.

Na Tabela 2, das 713 (100 %) baciloscopias analisadas quanto à qualidade macroscópica (A), 74,2 % dos esfregaços foram considerados satisfatórios e o restante 25,8 % dos esfregaços foram insatisfatórios ou não homogêneos. Em relação à reclassificação dos esfregaços não homogêneos, obteve-se 24,4 % esfregaços delgados e 1,4 % espessos.

Referente à avaliação microscópica (B), constatou-se que 631 (88,5 %) baciloscopias apresentaram coloração satisfatória e 82 (11,5 %) baciloscopias foram consideradas insatisfatórias ou inadequadas. Quando a lâmina apresentou descoloração inadequada, obteve-se uma segunda classificação em: presença de cristais de fucsina (4,1 %) e excesso de aquecimento (7,4 %).

Considerando o cálculo proposto na metodologia (média de A+B) notou-se que em três laboratórios locais (C, E, G) a classificação final das características técnicas das lâminas foi insatisfatória (< 80 %).

Diante do exposto, a avaliação insatisfatória na distensão dos esfregaços pode estar relacionada a algumas causas mais prováveis como: erro técnico na confecção do esfregaço; má qualidade do material (escarro), isto é, coleta abaixo do volume recomendado; armazenamento e/ou transporte inadequado ao laboratório. Quanto aos erros na coloração dos esfregaços as causas mais comuns são: aquecimento excessivo na fixação do material; utilização da fucsina sem filtrar e/ou tempo menor de aquecimento; descolorações excessivas e corantes impróprios para uso.

Os baixos índices de qualidade das lâminas encontrados nos LL C, E, e G, podem estar relacionados à problemas na qualidade da amostra de escarro, que vão desde a coleta, armazenamento e transporte ao laboratório, até os procedimentos técnicos de distensão e coloração do esfregaço.

Percentual elevado de falhas no preparo das baciloscopias também foi observado no estudo

de Sousa et al¹⁰, que avaliaram a qualidade de 189 baciloscopias para TB de oito Unidades Básicas de Saúde, no Estado do Pará. Trinta e seis por cento (36 %) das baciloscopias foram caracterizadas como inadequadas e erros relacionados ao item distensão foram os mais frequentes (31 %), seguidas de problemas na coloração (28 %).

Na Tabela 3, são apresentados os resultados da releitura das 713 lâminas de baciloscopia dos LL, aplicando o cálculo do índice de concordância, cujo valor esperado é de 100 %⁶.

Ao avaliar o índice de concordância (C), nessa pesquisa, a maioria dos LL participantes obteve C = 100 %. Apenas na unidade LL, codificada como letra G, observou-se dois resultados FP (C= 97,5 %) na releitura das lâminas, sendo reprovada no CEQ da baciloscopia.

Quanto ao resultado FP observado, este pode estar relacionado à má qualidade na execução da técnica ou ao uso de insumos inadequados, tais como: o superaquecimento da coloração, descoloração insuficiente, uso de lâminas com arranhões, uso de fucsina sem filtrar levando a depósitos de cristais do corante, causando erros na interpretação da presença de BAAR⁶.

Outros componentes podem interferir no resultado final do exame, como, por exemplo, o uso inadequado e a falta de manutenção técnica dos equipamentos (microscópio, balança). Outro agravante a se considerar é a falta de capacitação dos técnicos do laboratório na preparação e leitura da baciloscopia.

A partir dos dados analisados pode-se concluir que os resultados dos LL foram aceitáveis, porém sugere-se atividades contínuas de CEQ na rede de laboratórios de diagnóstico de TB, com ênfase na aplicação de ações corretivas das principais causas de erro no desenvolvimento da técnica, para elevar a qualidade do diagnóstico.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Adolfo Lutz, especialmente ao Prof. Dr. Alberto José da Silva Duarte, Diretor Geral do IAL, pelo apoio ao projeto e aos técnicos do Laboratório de Micobactérias do CLR de Santos pela ajuda no desenvolvimento do trabalho. Este trabalho faz parte da contratação da Bolsa de Desenvolvimento a Pesquisa do IAL, ano 2012-2013; Aos responsáveis dos Laboratórios Locais de diagnóstico da Tuberculose na colaboração do trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. Brasília (DF); 2011.
2. World Health Organization. Global Tuberculosis Control: WHO report 2011. [acesso 2012 Mar 28]. Disponível em: [http://www.who.int/tb/publications/global_report/em].
3. Secretaria de Estado da Saúde. Coordenadoria de Controle de Doenças. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. Distribuição de Casos de Tuberculose Segundo Faixa Etária e Forma Clínica. [acesso 2012 Dez 13]. Disponível em: [http://www.cve.saude.sp.gov.br/tuberculose/TB/tb_num/tb_cn10.htm].
4. Secretaria de Estado da Saúde. Coordenadoria de Controle de Doenças. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. Casos de Tuberculose Notificados Segundo Município Residência e tipo de caso, ano 2010. [acesso 2012 Dez 13]. Disponível em: [http://www.cve.saude.sp.gov.br/tuberculose/TB/tb_num/tb_munc10.htm].
5. Boletim Epidemiológico. São Paulo: Centro de Vigilância Epidemiológica. 2012; 02(11).
6. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias. Brasília (DF); 2008.
7. Association of Public Health Laboratories. Centers of Disease Control and Prevention. External Quality Assessment for AFB Smear Microscopy. Washington (DC); 2002.
8. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Coordenação Geral de Doenças Endêmicas. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Plano Estratégico para o Controle da Tuberculose, Brasil 2007-2015. Brasília (DF); 2006.
9. Conde MB, Melo FAF, Marques AMC, Cardoso NC, Pinheiro VGF, Dalcin PTR, et al. III Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. *J Bras Pneumol*. 2006;35(10):1018-48.
10. Sousa EB, Furlaneto IP, Santana ZHD, Lima GLF, Lima KVB. Qualidade das baciloscopias de escarro realizadas em oito unidades de saúde no Estado do Pará. *Cad Saúde Coletiva*. 2007;15(3):417-24.

Tuberculose, HIV e coinfeção por TB/HIV no Sistema Prisional de Itirapina, São Paulo, Brasil

Tuberculosis, HIV and TB/HIV co-infection in the Prison System of Itirapina, São Paulo, Brazil

RIALA6/1576

Dalva Cristina Girello AILY¹, José Antonio Pistarín BERRA¹, Angela Pires BRANDÃO^{2,3}, Erica CHIMARA^{2*}

*Endereço para Correspondência: ²Núcleo de Tuberculose e Micobacterioses, Centro de Bacteriologia, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 351, 9º andar, Cerqueira Cesar, São Paulo, SP, CEP 01246-000. Tel: (11) 3068-2895. E-mail: echimara@ial.sp.gov.br

¹Centro de Laboratório Regional de Rio Claro, Instituto Adolfo Lutz, Rio Claro, SP

³Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, RJ

Recebido: 12.08.2013 - Aceito para publicação: 24.10.2013

RESUMO

As prevalências do HIV, da tuberculose (TB) e da coinfeção TB/HIV foram avaliadas no Sistema Prisional de Itirapina/SP (Penitenciárias I e II). Foi efetuado estudo retrospectivo dos registros dos exames realizados no IAL-Rio Claro no período de janeiro/2003 a dezembro/2010. A baciloscopia/cultura para TB foi realizada em 24,3 % (1.375 amostras) da PI e em 25,9 % (3.332 amostras) da PII, e a sorologia para HIV, em 1.810 amostras da PI (32,0 %) e em 2.634 (20,4 %) da PII. Foram detectadas 157 culturas positivas para micobactérias (3,3 %), 177 amostras soropositivas para HIV (4,0 %), e 16 positivas para TB/HIV (11,5 %). A prevalência de TB foi de 2,8 % e 3,6 % ($p=0,160$), de HIV foi de 2,1 % e 5,3 % ($p<0,001$), respectivamente, para PI e PII; e a de coinfeção TB/HIV foi 0,4 % ($p=0,744$) em PI e PII. A soroprevalência de HIV nos indivíduos com TB foi de 13,2 % em PI e 9,2 % ($p=0,487$) em PII; a prevalência maior em PII sugere que o comportamento da doença difere com a característica populacional. Elevada prevalência de TB, HIV e coinfeção TB/HIV mostra a importância do diagnóstico destas infecções em todos os indivíduos no momento da admissão para definir as medidas de prevenção e de tratamentos dos internos e seus contatos.

Palavras-chave. prevalência, HIV, tuberculose, penitenciárias, coinfeção TB/HIV.

ABSTRACT

HIV, tuberculosis (TB) and TB/HIV co-infection prevalences were assessed in prisons PI and PII in Itirapina, SP, Brazil. This retrospective study was performed by consulting the records of diagnostic assays carried out at the Instituto Adolfo Lutz (IAL) Rio Claro Laboratory from January 2003 to December 2010. Culture for TB was performed on 24.3 % (1,375 samples) of PI and 25.9 % (3,332 samples) of PII, and HIV serology in 32.0 % (1,810 samples) of PI and 20.4 % (2,634 samples) of PII. There were 177 (4.0 %) HIV positive samples, 157 (3.3 %) positive culture for mycobacteria, and 16 (11.5 %) for TB/HIV. The prevalences of TB were 2.8 % and 3.6 % ($p=0.160$) for PI and PII respectively; of HIV, 2.1 % and 5.3 % ($p<0.001$) for PI and PII; and of TB/HIV co-infection, 0.4 % ($p=0.744$) for both PI and PII. Among TB patients, HIV prevalence was 13.2 % in PI and 9.2 % ($p=0.487$) in PII. Higher HIV prevalence in PII suggests that it depends on the population characteristics. The high prevalence rates of TB, HIV and TB/HIV show that it is crucial to perform the diagnostic testing in all of imprisoned individuals at admission to define the disease treatment and prevention measures among inmates and their contacts.

Keywords. prevalence, HIV, tuberculosis, prisons, co-infection TB/HIV.

INTRODUÇÃO

Os indivíduos privados de liberdade estão suscetíveis a diversos agravos que causam problemas de saúde pública, os quais devem ser compreendidos como resultado das condições e qualidade de vida que enfrentam nas penitenciárias. As doenças observadas são as mesmas ocorridas entre a população não confinada, porém em função dos diferentes fatores de risco, elas ocorrem precocemente e com maior intensidade, configurando condições de vulnerabilidade para os detentos e para a população em geral, favorecendo as condições para a disseminação de doenças endêmicas, infectocontagiosas ou não¹⁻⁴.

Os estudos sobre o perfil demográfico da população carcerária revelam que, em sua maioria, os detentos são provenientes de segmentos populacionais desfavorecidos, expostos a múltiplos riscos, geralmente sem cobertura social, educacional e sem acesso a programas de ações básicas de saúde². Assim, antes mesmo de ingressarem na prisão, as condições de saúde são precárias, marcadas pela violência social e impossibilidade de acesso a serviços de qualidade, além do fato de esses indivíduos estarem inseridos no grupo de populações com comportamento de risco para doenças sexualmente transmissíveis e/ou síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), ampliando ainda mais o problema³⁻⁸.

De acordo com a Secretaria de Administração Penitenciária, a população carcerária de São Paulo quase quadruplicou desde 1995⁹. O Estado de São Paulo alberga 40 % dos presos do país. Em dezembro de 2001, a população prisional de São Paulo era de 67.624 indivíduos; em abril de 2012 esse número aumentou para 188.518. Comparando as populações entre 2010 e 2011, o aumento foi na ordem de 9.504 presos e nos quatro primeiros meses do ano de 2012⁹ foram encarcerados 8.185 indivíduos. Por dia, 26,04 indivíduos entraram para o sistema em 2011 e esse número passou para 81,85 em 2012.

A tuberculose (TB) é considerada pela Organização Mundial da Saúde uma “emergência mundial” em saúde pública desde 1993, sendo responsável pela morte de 1,4 milhão de pessoas por ano, de acordo com a última estimativa¹⁰. Além de continuar endêmica em áreas onde a população vive em condições precárias, a TB ganhou força com o surgimento da AIDS, sendo a terceira doença oportunista mais frequente nos portadores do HIV¹¹. A permanência prolongada dos indivíduos nos sistemas prisionais tem sido um fator

relevante no aumento da prevalência da TB. Nogueira e col^{1,4} mostraram que a prevalência da TB e TB latente nesses indivíduos é elevada e quanto maior o tempo de prisão, maior o número de indivíduos com reação ao teste tuberculínico. A porcentagem de indivíduos reatores foi maior na população de indivíduos reincidentes, revelando o tempo de exposição como fator de risco. O trabalho realizado por Kuhleis e col¹² corrobora essa informação, demonstrando a circulação das cepas dentro do sistema prisional, ao encontrarem grandes grupos genéticos incomuns à população geral.

A coinfeção com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) é responsável pelo aumento da incidência, da prevalência e da mortalidade por TB e modifica o caráter da doença, de uma evolução crônica para aguda, podendo ocasionar a morte do paciente em poucas semanas ou torná-lo resistente a uma ou mais drogas utilizadas no tratamento. A associação dessas duas doenças é sinérgica, recíproca e de grande impacto, incrementando a viremia e acelerando a progressão da doença¹³⁻¹⁷.

O diagnóstico e tratamento precoces dessas doenças são vitais para esses pacientes e deveriam ser prioridade para as autoridades, inclusive porque a saúde da população não privada de liberdade também é afetada. Estudos sobre a prevalência dessas doenças em populações carcerárias podem representar importantes ferramentas para a implementação de políticas públicas de saúde relacionadas com a prevenção e o tratamento, minimizando a disseminação de TB e HIV na sociedade. Sendo assim, o objetivo desse estudo foi conhecer a soroprevalência de HIV, a prevalência da TB e da coinfeção TB/HIV em detentos do sistema prisional de Itirapina, São Paulo (Penitenciárias I e II).

MATERIAL E MÉTODOS

Instituições

O Sistema Prisional de Itirapina compreende as unidades Penitenciária I “Dr. Antonio de Queiroz Filho” (PI) e Penitenciária II “João Batista de Arruda Sampaio” (PII), sendo que a PI funciona com o regime semiaberto e fechado para os detentos que já foram julgados e irão cumprir penas; na PII, por sua vez, o regime é semiaberto e fechado para aqueles presos provisórios que estão aguardando julgamento. Na sua estrutura funcional, a Diretoria de Reintegração e Atendimento à Saúde é composta por uma equipe multidisciplinar que acompanha os detentos, direcionando e orientando quanto ao diagnóstico de doenças durante a sua permanência no sistema prisional.

Coleta de dados

Foi realizado um estudo retrospectivo dos resultados dos exames laboratoriais enviados ao Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Regional de Rio Claro, pela Equipe de Saúde do Sistema Prisional de Itirapina, SP - PI e PII - de população carcerária exclusivamente masculina. Os dados foram obtidos nos Livros de Registro do Laboratório de Sorologia, Livro de Registro de Baciloscopia e Cultura para Diagnóstico e Controle da Tuberculose, Sistema de Informação Laboratorial da Tuberculose (SILTB) e Sistema de Informação de Gestão Hospitalar do Instituto Adolfo Lutz (SIGH).

Foram inseridos no estudo os indivíduos com resultados de exames laboratoriais para TB e/ou HIV, no período de janeiro de 2003 a dezembro de 2010. Os exames para diagnóstico de TB foram realizados em indivíduos sintomáticos respiratórios (tosse há mais de três semanas, febre e perda de peso). Os testes para diagnóstico de HIV foram realizados na triagem e em indivíduos com sinais ou sintomas de doença infecciosa. Os dados coletados incluíram nome, sexo, idade, unidade prisional, data e resultado dos testes laboratoriais para TB e HIV.

Diagnóstico de TB

A detecção do bacilo álcool ácido resistente (BAAR) nas amostras de escarro foi realizada por baciloscopia (coloração de Ziehl-Neelsen) e cultura. A contagem bacilar foi realizada de acordo com o índice baciloscópico (semi-quantitativa em cruces), recomendado pelo Ministério da Saúde¹⁵. As amostras foram processadas utilizando a descontaminação com solução de NaOH a 4 % e posterior semeadura nos meios de Ogawa - Kudoh (OK) e OK acrescido de ácido p-nitrobenzóico até dezembro de 2008.

A partir de janeiro de 2009 foi introduzida a cultura líquida, utilizando o Sistema BACTEC MGIT™ 960 (Becton & Dickinson). A identificação das espécies de micobactérias foi realizada no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, utilizando-se provas fenotípicas tradicionais, e a técnica de reação em cadeia da polimerase e análise de restrição pelo método PRA-hsp65¹⁸. Os indivíduos que apresentaram duas baciloscopias de escarro positivas e/ou cultura positiva para *Mycobacterium tuberculosis* foram considerados casos de TB.

Diagnóstico de HIV

De janeiro de 2003 a junho de 2008, a detecção de anticorpos anti-HIV foi realizada por dois imunoenaios (ELISA - *Enzyme-Linked immunosorbent Assay*) distintos e em paralelo: Murex HIV 1.2.0 (Murex

Biotech, Kent, Inglaterra) e Vironostika HIV Uni-Form II plus O (Boxtel, Holanda) registrados no Ministério da Saúde. Os testes confirmatórios utilizados foram a reação de Imunofluorescência Indireta - IFI (Biomanguinhos / Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ) e Western-Blot (HIV Blot 2.2, Genelabs Diagnostics, Singapura).

A partir de junho de 2008 até dezembro de 2010, seguindo determinação do fluxograma do Ministério da Saúde, a detecção de anticorpos Anti-HIV passou a ser feita por meio do método quimioluminométrico (Immunoassay System, ADVIA Centaur CP, Siemens). Como teste confirmatório foi utilizado o ensaio qualitativo de anticorpos específicos para a confirmação da infecção pelo HIV 1 e 2 em sangue total, soro ou plasma humano (Imunoblot Rápido DPP - HIV 1/2, Biomanguinhos/Fiocruz). Indivíduos com teste confirmatório positivo para HIV foram incluídos no estudo.

Análises estatísticas

Foi considerado somente um resultado de cada paciente na análise total. Os dados foram armazenados em bancos de dados informatizados, utilizando-se os programas *Microsoft Access* e *Excel*. Os resultados de TB, HIV e coinfeção por TB/HIV em cada penitenciária foram avaliados quanto à prevalência e tendência em série temporal. Para determinar a associação entre TB, HIV, TB/HIV em PI e PII, utilizou-se o teste do Qui-quadrado (χ^2), com correção pelo teste exato de Fisher bicaudal quando necessário. As diferenças foram consideradas significativas para valores de $p < 0,05$.

Em atenção aos aspectos éticos e legais da pesquisa envolvendo seres humanos, preconizados pela resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz/SP, segundo o protocolo nº LR 2810/2010-IAL.

RESULTADOS

A caracterização das amostras segundo as variáveis examinadas encontra-se na Tabela 1. Na PI, a média anual de detentos foi de 707 (IC 95 % \pm 0,7) e na PII, 1.611 (IC 95 %, \pm 1,6). A baciloscopia/cultura para TB foi realizada em 24,3 % da população carcerária da PI, com média anual de 172 indivíduos (IC 95 % \pm 0,3) e em 25,8 % da PII (média anual de 417, IC 95 % \pm 1,9). Quanto à sorologia para HIV, foram examinados 32,0 % (média anual de 226, IC 95 % \pm 0,9) da população carcerária do PI e 20,4 % da PII (média anual de 329, IC 95 % \pm 2,9).

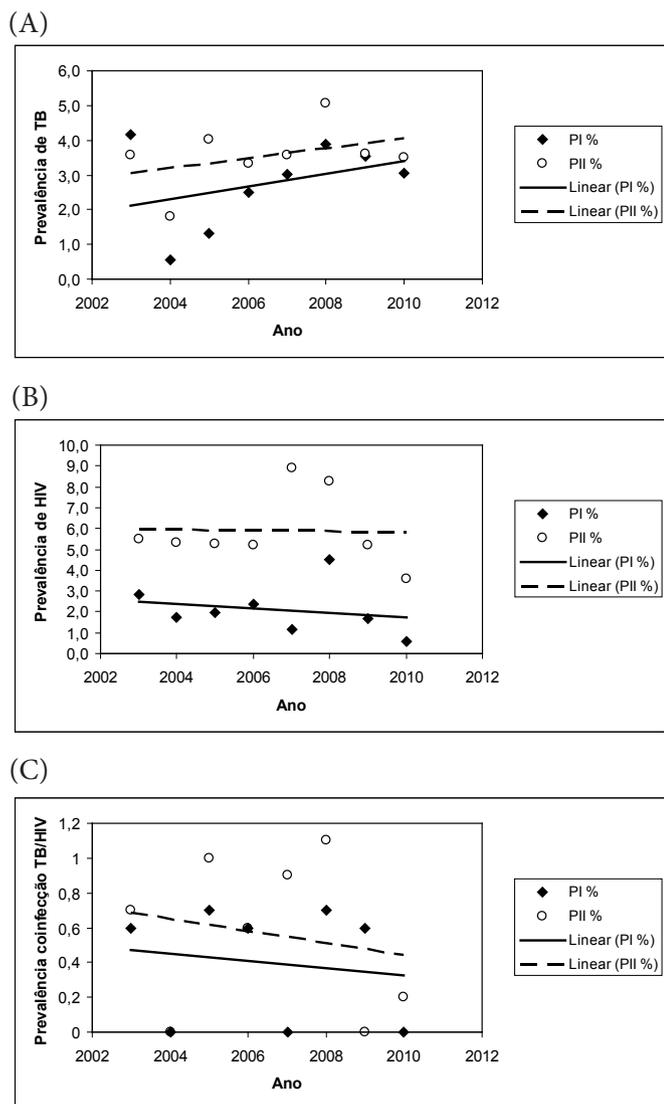


Figura 1. Tendência da prevalência para TB (A), HIV (B) e TB/HIV (C) na população das Penitenciárias I (PI) e II (PII) de Itirapina-SP, no período de janeiro de 2003 a dezembro de 2010, por unidade prisional e ano de diagnóstico

Entre os 4.707 exames realizados para o diagnóstico de TB, foram encontrados 157 (3,3 %) com cultura positiva para micobactérias, dos quais 132 (84,1 %) foram identificados como *M. tuberculosis* e 25 (15,9 %) como micobactérias não tuberculosas (MNT). Dezesesseis indivíduos com diagnóstico de TB apresentaram positividade para o HIV (coinfeção TB/HIV). Esses isolados foram submetidos ao teste de sensibilidade aos quimioterápicos (TSA) preconizados para o tratamento da TB e 10 (62,5 %) foram sensíveis à isoniazida, rifampicina, pirazinamida, etambutol e estreptomina, dois (12,5 %) resistentes pelo menos a uma droga e em quatro (25,0 %) o teste não foi realizado por problemas técnicos.

Entre os 38 detentos com TB em PI, cinco (13,2 %) estavam coinfectados pelo HIV, enquanto em PII, 11 (9,2 %) dos 119 com TB apresentaram coinfeção pelo HIV ($p=0,487$). A taxa de coinfeção entre os casos de TB em ambas as penitenciárias foi de 10,2 %.

Dos 4.444 testes para o sorodiagnóstico de HIV, 177 (4,0 %) apresentaram-se positivos e corresponderam a indivíduos da faixa etária compreendida entre 18 e 57 anos de idade; assim distribuídos, 18 - 25 anos (9,1 %); 26 - 33 anos (35,8 %); 34 - 41 anos (34 %); 42 - 49 anos (10,3 %); 50 - 57 anos (1,9 %) e sem informação (8,6 %). Da mesma forma, a maioria dos pacientes com exame positivo para TB encontravam-se na faixa etária entre 26 e 33 anos.

A soroprevalência de HIV foi significativamente maior em PII ($p<0,001$) enquanto a prevalência de TB ($p=0,160$) e de coinfeção TB/HIV ($p=0,744$) foi semelhante em ambas às penitenciárias (Tabela 1 e Figura 1).

Os casos de TB apresentaram uma tendência crescente da prevalência nas duas penitenciárias no período estudado (Figura 1A), enquanto que a tendência da prevalência de indivíduos soropositivos para HIV e coinfectados manteve-se estável (Figura 1B e 1C).

DISCUSSÃO

A análise dos dados desse estudo indicou que os diagnósticos de TB e HIV foram realizados em uma baixa parcela da população do sistema, o que confere uma limitação ao estudo. Isso se deve ao fato que a população da PI teve maior cobertura diagnóstica do que a população da PII. Esta diferença na cobertura diagnóstica deve ser observada com muita atenção, tendo em vista a realidade do sistema penitenciário (excesso de população, número de infectados, falta de isolamento adequado) e as formas de transmissão dessas doenças, ressaltando-se a importância dos diagnósticos precoces para a diminuição do número de infectados dentro e fora dessas instituições.

A prevalência de TB foi maior na faixa etária de 26 a 33 anos, confirmando os dados relatados pelo Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo para indivíduos do sexo masculino na faixa etária de 20 a 49 anos²⁴ e para a população do sistema prisional do Estado, no período de 1998 a 2005. Apesar da maior prevalência de TB em PII não ser estatisticamente significativa, a tendência crescente

indica que o esquema de intervenção deverá ser mais acentuado nesta penitenciária.

A soroprevalência para HIV encontrada no presente estudo (4,0 %) corresponde a indivíduos na faixa etária compreendida entre 18 e 57 anos de idade. Comparando as taxas encontradas nas penitenciárias estudadas, a soroprevalência em PII foi maior, assemelhando-se às taxas encontradas em grupos populacionais maiores de 18 anos que apresentam maior vulnerabilidade, como usuários de drogas (5,9 %) e mulheres profissionais do sexo (4,9 %)¹⁰. No entanto, a tendência das prevalências da PI e PII foi estável, o que sugere que a assistência dada a esses indivíduos está auxiliando no combate à doença, mas não está sendo suficiente. Reis e Bernardes¹⁹ retrataram a realidade da assistência à saúde em cadeias e delegacias e revelaram a negligência à prevenção e tratamento do HIV/AIDS na população confinada, mostrando a importância dessas medidas no controle da doença.

Massad e col¹⁷ em estudo sobre prevalência de HIV entre detentos do Complexo Carandiru, em São Paulo, encontraram 16,0 % de positividade, relatando que essa prevalência foi maior em usuários de drogas injetáveis, seguida de comportamento sexual de risco. No município de Rio Claro, SP, no Centro de Ressocialização Feminino, foram detectadas 3,6 % de mulheres soropositivas para HIV, pertencentes à faixa etária entre

21 e 40 anos²⁰. Passadouro²¹ identificou 6 % de indivíduos soropositivos para HIV em um estabelecimento prisional de Leiria/Portugal, associando também esta positividade ao uso de drogas injetáveis. Entre os prisioneiros da Espanha, Marco e col²² verificaram que a prevalência da infecção pelo HIV era de 10,8%. Reid e col²³ em estudos nas Prisões Africanas encontraram uma prevalência de 25,5 %, esclarecendo que as condições de infraestrutura lá existentes eram paupérrimas, inclusive sem água potável, promovendo condições para epidemias, violência e degradação, podendo aumentar o risco de TB e transmissão de HIV.

A média da prevalência de coinfeção TB/HIV entre os casos de TB detectada nesse estudo (10,2 %) foram similares à encontrada (13 %) no Estado de São Paulo²⁴, no Sistema Prisional do Rio de Janeiro (14,6 %) encontrada por Sanchez e col², e à média relatada no Brasil (8 %)¹⁰. A tendência de coinfeção foi estável possivelmente devido à influência da tendência da prevalência de HIV.

Os resultados obtidos nesse estudo mostraram duas populações distintas. A população da PI alberga indivíduos sentenciados, fazendo dessa uma população mais estável, o que proporciona um controle melhor do diagnóstico e tratamento da TB e HIV. Essa situação é evidenciada pela estabilidade nos casos novos de TB e da menor prevalência de HIV. A população da PII, por sua vez, é formada por indivíduos que aguardam sentença,

Tabela 1. Prevalência de tuberculose (TB), HIV e coinfeção TB/HIV na população das Penitenciárias I (PI) e II (PII) de Itirapina-SP, no período de janeiro de 2003 a dezembro de 2010, por unidade prisional

| Doença | Indivíduos | PI | | PII | | OR (IC 95 %) | P |
|--------|------------|------------------|---------------|-------------------|---------------|------------------|---------|
| | | População: 5.656 | | População: 12.890 | | | |
| | | n | % (IC 95 %) | n | % (IC 95 %) | | |
| TB | Examinados | 1375 | 24,3 | 3332 | 25,8 | | |
| | Positivos | 38 | 2,8 (2,0-3,8) | 119 | 3,6 (3,0-4,3) | 0,77 (0,52-1,13) | 0,160 |
| HIV | Examinados | 1810 | 32,0 | 2634 | 20,4 | | |
| | Positivos | 38 | 2,1 (1,5-2,9) | 139 | 5,3 (4,5-6,2) | 0,38 (0,26-0,56) | < 0,001 |
| TB/HIV | Examinados | 1351 | 23,9 | 2494 | 19,3 | | |
| | Positivos | 5 | 0,4 (0,1-0,9) | 11 | 0,4 (0,2-0,8) | 0,84 (0,25-2,61) | 0,744 |

IC: intervalo de confiança, OR: odds ratio

ou seja, a rotatividade desses indivíduos é maior, além da elevada demanda de entrada. Possivelmente, ao entrarem no sistema, esses indivíduos não dispunham da mesma assistência que os indivíduos da PI, já detidos há algum tempo, o que pode ser um dos fatores relevantes para a maior prevalência de TB e HIV nessa população. No entanto, um número maior de indivíduos deve ser avaliado para confirmar as hipóteses levantadas no presente estudo.

Os dados deste estudo e similares mostram a importância e a necessidade da realização dos testes sorológicos para HIV de forma rotineira, na totalidade dos detentos, melhorando o diagnóstico precoce da infecção por HIV, possibilitando a introdução do tratamento antirretroviral, uma vez que a infecção pelo HIV representa fator relevante na definição do tratamento da TB ativa e da forma latente¹⁷. A taxa de reativação de TB em pessoas coinfectadas com HIV é de aproximadamente 8 % ao ano, sendo a TB uma das infecções mais comuns no curso da infecção pelo HIV¹¹.

Para reduzir o impacto da coinfeção da TB nos portadores de HIV é necessário que o atendimento aos pacientes seja feito de forma mais efetiva e imediata possível²⁵. Uma medida que poderá diminuir esses índices deverá ser o diagnóstico de TB e HIV na admissão dos indivíduos no sistema prisional, independente da situação legal em que se encontram. A demora em identificar e isolar sintomáticos ou suspeitos de TB, devido às falhas no procedimento de controle, diminui o índice de cura, aumentando a taxa de recidiva, mortalidade e disseminação da doença nessas instituições. Portanto, é imprescindível implementar atividades que permitam o diagnóstico precoce da TB ativa e latente.

Deve-se considerar também que os profissionais de saúde e funcionários ligados ao sistema carcerário, embora reconheçam que TB e HIV são graves problemas de saúde, muitas vezes desconhecem a extensão e as consequências destes. Os funcionários estão frequentemente expostos e, ao se contaminarem, são veículos de disseminação das doenças aos seus contatos e familiares. A detecção precoce do HIV é uma ferramenta fundamental contra a TB, pois é conhecido o fato de que a terapia antirretroviral atua como fator protetor contra o desenvolvimento da TB¹² e que o vírus HIV é um potente ativador da TB¹³.

O controle dessas doenças poderá ser melhor realizado se forem aplicados investimentos na atualização da infraestrutura e recursos humanos, diagnóstico

precoce da TB e triagem para HIV em todos os internos e nos que estão entrando no Sistema.

REFERÊNCIAS

1. Nogueira PA, Abrahão RMC. A infecção tuberculosa e o tempo de prisão da população carcerária dos Distritos Policiais da zona oeste da cidade de São Paulo. *Rev Bras Epidemiol*. 2009;12:30-8.
2. Sanchez AR, Massari V, Gerhardt G, Barreto AW, Cesconi V, Pires J, et al. A tuberculose nas prisões do Rio de Janeiro, Brasil: uma urgência de saúde pública. *Cad Saúde Pública*. 2007;23:545-52.
3. Catalan-Soares BC, Almeida RT, Carneiro-Proietti BF. Prevalence of HIV-1/2, HTLV-1/II, hepatitis B vírus (HBV), hepatitis C vírus (HCV), *Treponema pallidum* and *Trypanosoma cruzi* among prison inmates at Manhuaçu, Minas Gerais, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2000;33:27-30.
4. Nogueira PA, Abrahão RMC, Galesi VMN. Tuberculosis and latent tuberculosis in prison inmates. *Rev Saude Publica*. 2012;46:119-27.
5. Cardoso JrR. Prevalência do HIV nos presídios. (acesso 2005 Abr 12). Disponível em :[<http://www.aids.gov.br>].
6. Winetsky DE, Negoescu DM, DeMarchis EH, Almukhamedova O, Dooronbekova A, Pulatov D, et al. Screening and rapid molecular diagnosis of tuberculosis in prisons in Russia and Eastern Europe: a cost-effectiveness analysis. *PLOS Medicine*. 2012;9:11.
7. Todrys KW, Amon JJ. Criminal justice reform as HIV and TB prevention in African prisons. *PLOS Medicine*. 2012;9:5.
8. Yanjindulam P, Oyuntsetseg P, Sarantsetseg B, Ganzaya S, Amgalan S, Narantuya J, et al. Reduction of tuberculosis burden among prisoners in Mongolia: review of case notification, 2001-2010. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2012;16:327-29.
9. Secretaria da Administração Penitenciária do Estado de São Paulo (SAP). SAP amplia número de vagas com plano de expansão. (acesso 2012 Out 05). Disponível em: [<http://www.sap.sp.gov.br/noticias/not147.html>].
10. World Health Organization- WHO. Global tuberculosis report 2012. Geneva, Switzerland: WHO; 2012. Disponível em: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75938/1/9789241564502_eng.pdf].
11. Benito N, Moreno A, Miro JM, Torres A. Pulmonary infections in HIV-infected patients: an update in the 21st century. *Eur Respir J*. 2012;39:730-45.
12. Kuhleis D, Ribeiro AW, Costa ERD, Cafrune PI, Schmid KB, Costa LL, et al. Tuberculosis in a southern Brazilian prison. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107:909-15.
13. Lemos ACM. Coinfeção tuberculose/HIV. *J Bras Pneumol*. 2008;34:753-5.
14. Jamal LF, Moherdau F. Tuberculose e infecção pelo HIV no Brasil: magnitude do problema e estratégias para o controle. *Rev Saúde Pública*. 2007;41:104-10.
15. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da tuberculose e outras micobactérias. Brasília (DF); 2008.
16. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST/AIDS. Recomendações para terapia antirretroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV 2007/2008. (acesso 2008 Set 21). Disponível em: [<http://www.aids.gov.br>].

17. Massad E, Rozman M, Azevedo RS, Silveira ASB, Takey K, Yamamoto YI, et al. Seroprevalence of HIV, HCV and syphilis in Brazilian prisoners: Preponderance of parenteral transmission. *Eur J Epidemiol*. 1999;15:439-45.
18. Chimara E, Ferrazoli L, Ueky SYM, Martins MC, Durham AM, Arbeit RD, et al. Reliable identification of mycobacterial species by PCR-restriction enzyme analysis (PRA)-hsp65 in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA-hsp65 patterns. *BMC Microbiol*. 2008;2;8:48.
19. Reis CB, Bernardes EB. O que acontece atrás das grades: estratégias de prevenção desenvolvidas nas delegacias civis contra HIV/AIDS e outras doenças sexualmente transmissíveis. *Ciênc Saúde Coletiva*. 2011;16:3331-8.
20. Berra JAP, Bacetti LB, Buzo A. Soroprevalência de HIV, sífilis, hepatite B e C em mulheres do Centro de Ressocialização Feminino, Rio Claro/SP. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2006;65:133-6.
21. Passadouro R. Prevalência e fatores de risco das infecções por VHI, hepatite B e C num estabelecimento prisional de Leiria. *Acta Med Port*. 2004;17:381-4.
22. Marco A, Saíz de la Hoya P, García-Guerrero J, Grupo PREVALHEP. Estudio Multicéntrico de Prevalencia de Infección por el VIH y factores asociados en las prisiones de España. *Rev Esp Sanid Penit*. 2012;14:19-27.
23. Reid SE, Topp SM, Turnbull ER, Hatwiinda S, Harris JB, Maggard KR, et al. Tuberculosis and HIV Control in Sub-Saharan African Prisons: "Thinking Outside the Prison Cell". *JID*. 2012;205:S265-73.
24. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac". Tuberculose no Estado de São Paulo: indicadores de morbimortalidade e indicadores de desempenho. *Bol Epidemiol Paulista*. 2006;3:S7-S37.
25. Sanchez AR, Larouzé B, Diuana V. Tuberculosis control in Brazilian prisons: new approaches to an old problem. *Cad Saude Publica*. 2010;26:850-1.

Doença de Chagas: situação vetorial no município de Limoeiro do Norte – CE, no período de 2006 a 2009

Chagas Disease: vector status in the city of Limoeiro do Norte – CE, during the period from 2006 to 2009

RIALA6/1577

Arduina Sofia Ortet de Barros VASCONCELOS^{1*}, Erlane Chaves FREITAS¹, Mônica Coelho ANDRADE¹, Marli Maria LIMA², Laíse dos Santos PEREIRA¹, Kátia Cristina Moraes Soares GOMES¹, Helena Lutécia Luna COELHO¹, Maria de Fátima OLIVEIRA¹

*Endereço para correspondência: ¹Laboratório Pesquisa em Doença de Chagas, Universidade Federal do Ceará. Rua Capitão Francisco Pedro nº 1210, Rodolfo Teófilo, Fortaleza, CE, Brasil, CEP 60430-372. E-mail: vasconcelosarduina@yahoo.com.br

²Laboratório de Ecoepidemiologia da Doença de Chagas, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Recebido: 18.08.2013 - Aceito para publicação: 04.10.2013

RESUMO

Entre as doenças transmitidas por vetores no Brasil, a doença de Chagas é uma das mais importantes como problemas de saúde pública. Neste estudo foi estimada a prevalência de triatomíneos infectados por *Trypanosoma cruzi* no município de Limoeiro do Norte-CE, por meio de consulta aos arquivos do Programa de Controle da Doença de Chagas deste Distrito Sanitário no período de 2006 a 2009. Na análise foram incluídos os triatomíneos adultos e ninfas, mortos ou vivos, capturados durante o período investigado. Durante os quatro anos de estudo foram capturados 2.863 exemplares de triatomíneos, ninfas e adultos distribuídos no intradomicílio e peridomicílio; e examinados 2.756 (96,3 %) exemplares. O índice de infecção dos triatomíneos foi de 7,9 % nos quatro anos de estudo. O número de ninfas capturadas foi cerca de três vezes maior que o número de adultos; no entanto, o número de ninfas infectadas pelo flagelado (5,30 %) foi inferior aos adultos (15,85 %). O distrito de Limoeiro do Norte apresenta alto risco de transmissão para doença de Chagas e, portanto, sugere-se que as ações de controle sejam intensificadas neste município para evitar a ocorrência de transmissão da doença e dispersão do vetor.

Palavras-chave. Doença de Chagas, triatomíneos, prevalência, índice de infecção.

ABSTRACT

In Brazil, among the endemic vector-borne diseases, Chagas disease has been considered one of the most important public health problems. The present study aimed at estimating the prevalence of triatomines infected with *Trypanosoma cruzi* in the city of Limoeiro do Norte, CE, Brazil. This investigation was conducted by consulting the archives of the Chagas disease control program of the Health District of Limoeiro do Norte for the period from 2006 to 2009. The study included dead or alive, adults and nymphs triatomines, which were captured during the investigated period. During the four-year study, 2,863 specimens of nymphs and adults insects were captured from the domestic and peridomestic areas; 2,756 were examined, representing 96.3 % of collected specimens. The insect infection rate was 7.9 % in four-year study. The number of captured nymphs was nearly three times higher than the number of adults; however the number of nymphs infected with the flagellate (5.30 %) was lower than the number of adults form (15.85 %). Limoeiro do Norte showed a high risk for Chagas disease transmission, suggesting that the control actions should be intensified in this city to prevent the disease transmission and the vector spread.

Keywords. Chagas disease, triatomines, prevalence, infection rate.

INTRODUÇÃO

Doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, é endêmica em 17 países da América Latina¹. Cerca de 10 milhões de pessoas estão infectadas com o *Trypanosoma cruzi* e mais de 40 milhões estão expostas ao risco de contrair a doença na América Latina^{2,3}. No Brasil, a estimativa é de 2 a 3 milhões de pessoas infectadas, com uma incidência de 100 novos casos por ano (via oral)⁴.

A infecção pelo *T. cruzi* ainda representa um problema significativo de saúde pública, com 7.7 milhões de pessoas infectadas na América Latina, e mais de 10.000 mortos em 2008⁵.

O agente etiológico da doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, é um protozoário flagelado da família *Trypanosomatidae*, que tem como hospedeiros vertebrados mamíferos, aves e répteis e, como hospedeiros invertebrados numerosas espécies de hemípteros hematófagos da família *Reduviidae*. Este inseto apresenta três fases em seu ciclo evolutivo que vai desde ovo, ninfa (cinco estágios) até adulto. As ninfas e adultos são hematófagos durante todo o ciclo evolutivo e vivem em média de um a dois anos, com grande capacidade de reprodução e, com intensa resistência ao jejum dependendo da espécie e das condições ambientais⁶.

A transmissão dessa enfermidade se dá principalmente pela via vetorial (80 % dos casos), em que o triatomíneo deposita juntamente com seus excrementos (fezes e urina) o *Trypanosoma cruzi* que penetra por continuidade nos tecidos cutâneos e nas mucosas íntegras. A segunda via de importância epidemiológica é a transfusional, representando 5 a 20 % dos casos. As demais vias são de menor importância, tais como transplacentária, acidentes de laboratório, manipulação de animais infectados e transplantes de órgãos⁷.

A via oral, considerada antes de menor importância, tomou grandes proporções no Norte do Brasil, pela ingestão do próprio triatomíneo ou dos seus excrementos, através de alimentos como açaí e cana de açúcar⁸. A forma aguda da doença de Chagas tem sido registrada nos últimos anos na região amazônica, sendo relacionada ao consumo do açaí fresco, contaminado com as fezes do inseto infectado ou com o próprio inseto triturado⁹.

O Brasil tem mais de 120 espécies de triatomíneos conhecidas, no entanto, apenas 69 foram descritas, e somente quatro têm maior importância na transmissão da doença de Chagas para o homem que são: *Triatoma brasiliensis*,

Triatoma pseudomaculata, *Panstrongylus megistus* e *Triatoma sordida*. As outras são selvagens e mantêm um ciclo natural apenas com mamíferos silvestres^{10,11}.

No país, a transmissão vetorial está presente em todos os estados da região nordeste e a ocorrência depende primeiramente da presença de vetores domésticos¹¹. A adaptação dos triatomíneos à vivenda humana (domiciliação e colonização) mostra-se eficiente para cerca de uma dezena de espécies e é considerado fator primordial da ocorrência e da expansão da doença de Chagas humana¹².

No contexto epidemiológico da doença de Chagas na região nordeste, o Ceará é o epicentro de dispersão de duas espécies de triatomíneos de difícil controle: *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata*. O Ceará apresenta cobertura vegetal predominante de caatinga, possuindo uma vasta área rural, uma parcela da população vivendo em habitações de baixa qualidade, propiciando abrigo e mobilização de várias espécies de triatomíneos de importância na saúde pública como *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *P. megistus*, *P. lutz* e *R. nasutus*^{13,14}.

No Estado do Ceará, o *T. brasiliensis* é o principal vetor da doença de Chagas nos domicílios. Em 1983, o Programa da Doença de Chagas do Ceará (PCDCh) capturou um total de 210.439 exemplares desta espécie. Em 2001, porém, com semelhante esforço de captura, o número total de *T. brasiliensis* coletado diminuiu para 55.280 exemplares¹⁵.

Devido ao elevado número de capturas de triatomíneos e do difícil controle das espécies *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata* e do aquecimento global decidiu-se identificar a verdadeira situação da doença de Chagas no município de Limoeiro do Norte – CE, com o objetivo de avaliar o índice de infecção dos triatomíneos por *Trypanosoma cruzi* e a infestação nas unidades domiciliares por ninfas e adultos e, por fim, identificar as localidades com maior índice de infestação e infecção.

METODOLOGIA

O estudo foi realizado no município de Limoeiro do Norte – Ceará (Figura 1) o qual conta com aproximadamente 56.281 habitantes¹⁶ distribuídos em uma área de 752 quilômetros.

Os dados foram coletados dos arquivos do programa de Controle da Doença de Chagas do Distrito Sanitário do Limoeiro do Norte - CE, no período de 2006 a 2009, referentes ao município de Limoeiro do Norte. Os dados levantados foram referentes à captura



Fonte: http://pt.wikipedia.org/wiki/Limoeiro_do_Norte¹⁷

Figura 1. Mapa do estado Ceará com destaque para o município de Limoeiro do Norte¹⁶

de triatomíneos no intra e no peridomicílio, nas formas evolutivas (ninfas e adultos).

Foram incluídos no estudo ninfas e adultos de triatomíneos capturados vivos ou mortos nos domicílios e anexos, no período de 2006 a 2009 e excluídos do estudo os triatomíneos capturados mortos, que não foi possível analisar.

O método empregado pelo Programa de Controle da Doença de Chagas para diagnosticar a infecção nos triatomíneos consistiu em pesquisar o *T. cruzi* nas fezes desses insetos. O material obtido, após uma leve compressão no abdômen do triatomíneo, é colocado diretamente sobre uma lâmina de microscopia em uma gota de solução salina a 0,9 %, e observado no microscópio óptico com objetiva de 40.

RESULTADOS

Nos quatro anos de estudo foram capturados 2.863 exemplares de triatomíneos nas 87 localidades diferentes de Limoeiro do Norte. Tais exemplares se distribuíram da seguinte forma: 509 (17,78 %) no intradomicílio e peridomicílio com 2.354 (82,22 %). Destes foram examinados 2.766 que correspondem a 96,61 %. O índice de infecção total em Limoeiro do Norte neste período foi de 7,85 %. As três localidades com maior número de capturas (mais infestada) foram Bom Fim (175), Cabeça de Vaca (144) e Gado Bravo NH6 (144), e as de maior índice de infecção foram

Socorro com 29,7 % (33), Bom Fim com 13,4 % (23) e Boa Fé com 19,35 % (18), (Tabelas 2 e 3).

Na Tabela 1 pode-se observar os estudos nas localidades do município de Limoeiro do Norte. Em 2006 realizou-se o trabalho em 75 localidades do município onde foram capturados 644 triatomíneos. Destes, 84 foram positivos para a presença do *Trypanosoma cruzi* tendo o índice de infecção de 13,38 %. Nos anos seguintes, a maioria das localidades estudadas em 2006 foram investigadas. Das 23 localidades trabalhadas, em 2007, capturaram 252 triatomíneos, dos quais 13 foram positivos para a presença do *Trypanosoma cruzi* e o índice de infecção foi de 5,24 %. No ano seguinte trabalhou-se com 44 localidades, 762 triatomíneos. Destes, 29 foram positivos para a presença do *T. cruzi* com índice de infecção de 4,18 %. Em 2009, 54 localidades foram trabalhadas, sendo capturados 1.205 triatomíneos, dos quais 91 foram positivos para a presença do *T. cruzi* com índice de infecção de 7,60 %.

Tabela 1. Distribuição do total de triatomíneos capturados, examinados e positivos no período de 2006 a 2009 no município de Limoeiro do Norte

| Período | Capturados | Examinados | Positivos |
|---------|------------|----------------|--------------|
| 2006 | 644 | 628 (97,52 %) | 84 (13,38 %) |
| 2007 | 252 | 248 (98,41 %) | 13 (5,24 %) |
| 2008 | 762 | 693 (90,94 %) | 29 (4,18 %) |
| 2009 | 1205 | 1197 (99,33 %) | 91 (7,60 %) |

O perfil epidemiológico da doença de Chagas no município de Limoeiro do Norte – Ceará durante o período de estudo (2006 a 2009) pode ser observado na Tabela 2, a qual mostra as 14 localidades com maior número de triatomíneos capturados e as localidades mais infestadas por ano (2006, 2007, 2008 e 2009): Canto Grande do Quinzinho com 2,2 % (62) triatomíneos capturados, Boa Fé com 1,75 % (50), Gangorra da BR com 4,1 % (116) e Cabeça de Vaca com 5 % (143). É importante ressaltar que essas localidades foram pesquisadas pelo menos durante três anos consecutivos com exceção de Cabeça de Vaca que foi pesquisada apenas em 2006 e 2009. Observou-se que a partir de 2007 o índice de infestação vem crescendo nas unidades domiciliares.

De 2006 a 2009, foram capturadas cinco espécies de triatomíneos, sendo o *Triatoma pseudomaculata* a espécie mais freqüente representando 60,2 % (1.723) dos insetos capturados, seguido de *Triatoma brasiliensis* 32,6 % (933), *Rhodnius nasutus* 4,9 % (141), *P. megistus* 1,2 % (35) e *P. lutzi* 1,1 % (31). A pesquisa mostra que

Tabela 2. Distribuição das localidades, com maior número de triatomíneos capturados no município de Limoeiro do Norte no período de 2006 a 2009

| Localidades | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | Total |
|-----------------------------|------------|------------|------------|------------|-------------|
| Bom fim | 27 | 01 | 66 | 81 | 175 |
| Cabeça de vaca | 01 | NP | NP | 143 | 144 |
| Gado Bravo NH6 | NP | 19 | NP | 125 | 144 |
| Gangorra da BR 116 | 05 | NP | 116 | 10 | 131 |
| Canto Grande do Quinzinho | 62 | 21 | NP | 31 | 114 |
| Carao | 12 | NP | NP | 101 | 113 |
| Socorro | 31 | NP | NP | 80 | 111 |
| Poço das Pedras | 13 | 06 | NP | 73 | 92 |
| Danças | 26 | NP | 54 | NP | 80 |
| Boa fé | 17 | 50 | NP | 09 | 76 |
| Bom fim do José do Maranhão | 14 | NP | 20 | 42 | 76 |
| Bom Jesus I | 24 | 36 | NP | 05 | 65 |
| Sape | 10 | NP | 46 | 05 | 61 |
| Várzea do Cobre | 18 | NP | 15 | 27 | 60 |
| Total | 260 | 133 | 317 | 732 | 1442 |

NP – Não pesquisada

foram capturados 131 triatomíneos infectados no peridomicílio contra 86 no intradomicílio nos quatro anos de estudo (Tabela 4). O *T. pseudomaculata* foi a espécie que apresentou maior número de exemplares positivos (144), mas foi *R. nasutus* que apresentou maior índice de infecção 19,4 % com 27 exemplares positivos.

DISCUSSÃO

No período de estudo foram capturados um total de 2.863 exemplares de triatomíneos entre ninfas e adultos distribuídos entre o intradomicílio e peridomicílio. Desse total foram examinados 2.766 exemplares, representando 96,6 %. O número total de ninfas capturadas (2.204), durante todo o período de estudo, foi três vezes maior que o número de adultos (659), no entanto o índice de infecção de ninfas foi três vezes menor (5,31 %) que adultos (15,85 %). Esses resultados indicam que ocorreram mudanças no habitat natural (silvestre) dos triatomíneos, pois com o intenso desmatamento os mesmos tendem a migrar dos seus habitats naturais para dentro das casas, principalmente aquelas sem reboco, e com péssimas condições de higiene¹⁸, ocasionando assim risco para a população.

O *Triatoma pseudomaculata* foi a espécie mais capturada representando 60,2 % (1.723), o que difere do trabalho de Lima et al¹⁹, que capturavam 3.082 triatomíneos, tendo a predominância do *T. brasiliensis* em todo o período com 74,85 %.

Essa espécie é nativa de diferentes regiões do nordeste do Brasil. Como não é “erradicável” pode

reinvasar a habitação desde seu ecótopo silvestre que é seu habitat natural, isso explica o fato dessa espécie ter sido mais capturada no peridomicílio que no intradomicílio. Essa captura no peridomicílio representou 90,1 % dos espécimes de *T. pseudomaculata* o que corrobora com os dados obtidos por Freitas et al²⁰, que sugerem que tal espécie estão bem adaptados ao peridomicílio por apresentar baixa frequência de sangue humano no conteúdo intestinal.

Segundo estudo realizado, por Villela et al²¹, no período de 2000 a 2003, mostrou que a espécie *P. megistus* foi a mais destacada no âmbito domiciliar, sendo que 32,3 % das capturas realizadas foram ninfas, evidenciando processo de domiciliação dessas ninfas na região centro-oeste de Minas Gerais, local de realização do estudo. No entanto, em nosso estudo os resultados diferem do citado anteriormente, porque indicam que *P. megistus* teve maior prevalência no peridomicílio em todo o período da pesquisa. O mesmo aconteceu com o *P. lutzi* que segundo Neiva e Pinto²² (1923), essa espécie tem hábitos estritamente silvestres, intervindo apenas na manutenção da enzootia chagásica, mas nos dois primeiros anos de estudo, essa espécie apresentou maior prevalência no intradomicílio mostrando assim uma mudança nos seus hábitos, o ambiente comum do *P. lutzi* conforme mencionado é o silvestre e peridomicílio e não o intradomicílio¹⁶. Nossos estudos revelaram, em 2008, maior prevalência de *P. lutzi* no peridomicílio (hábitos normais dessa espécie) e em 2009 a frequência foi a mesma tanto no intradomicílio como peridomicílio.

Tabela 3. Localidades do município de Limoeiro do Norte com maior número de triatomíneos positivos no período de 2006 a 2009

| Localidade | Capturados | Examinados | Positivos |
|--------------------------|------------|----------------|--------------|
| Socorro | 111 | 111 (100,00 %) | 33 (29,73 %) |
| Bom fim | 175 | 175 (100,00 %) | 23 (13,14 %) |
| Boa fé | 93 | 93 (100,00 %) | 18 (19,35 %) |
| São Raimundo | 32 | 32 (100,00 %) | 13 (40,63 %) |
| Canafistola | 38 | 38 (100,00 %) | 13 (34,21 %) |
| Varzea do cobre | 60 | 60 (100,00 %) | 10 (16,67 %) |
| Danças | 80 | 79 (98,75 %) | 10 (12,66 %) |
| Bom fim do José Maranhão | 76 | 75 (98,68 %) | 09 (12,00 %) |
| Frade | 44 | 44 (100,00 %) | 08 (18,18 %) |

O *R. nasutus* apresentou maior número de capturas no peridomicílio com 87 exemplares com predomínio de ninfas (56), o contrário ocorreu no intradomicílio com 54 exemplares com predomínio de adultos (44). É comum o encontro dessa espécie no peridomicílio provavelmente devido à aproximação do seu habitat natural. Em alguns estudos, esta espécie é predominantemente silvestre, no entanto, tem sido frequentemente encontrada colonizando ecótopos artificiais no peridomicílio, muitas vezes apresentando altos índices de infecção de *T. cruzi*^{23,24}.

Em estudo de Lima et al¹⁹, realizado em Jaguaruana no período de 2001 a 2005, foram capturados 829 espécimes de *R. nasutus* diretamente das palmeiras *Copernicia prunifera*, diferindo dos nossos achados. O que reforça que o *R. nasutus* está bem adaptado ao seu habitat natural, ou seja, as palmeiras. Já, o aparecimento dessa espécie nos domicílios ocorre possivelmente pela procura de alimentos. Esses dados estão de acordo com o estudo de Dias et al¹³, que afirma que o habitat natural do *Rhodnius* spp. são as palmeiras e o microclima desempenha um importante papel no estabelecimento de um relacionamento estável entre as espécies do gênero *Rhodnius* e as palmeiras.

Nos quatro anos de estudo em Limoeiro do Norte, o índice de infecção do *R. nasutus* foi de 19,4 %, com 27 exemplares positivos, representando o maior índice de infecção de todo o estudo. Tal índice no intradomicílio foi superior ao peridomicílio, representando 46,30 % e 2,30 %, respectivamente. O elevado índice de infecção encontrado representa um risco em potencial para a transmissão da doença de Chagas humana, em Limoeiro do Norte, o que vem a corroborar com o estudo realizado por Lima et al¹⁹, que encontraram índice de infecção de 23,33 % do *R. nasutus* com 94 espécimes positivos.

O aquecimento global e seus possíveis impactos preocupam pesquisadores de diversas áreas, inclusive se discute muito os impactos das mudanças climáticas sobre a saúde humana. No caso dos vetores da doença de Chagas, as principais conseqüências do aumento da temperatura e diminuição da umidade seriam o aumento do número de repastos, período de desenvolvimento mais curto, o aumento da densidade populacional e a ampliação da distribuição geográfica de diversas espécies. A elevação da temperatura também estimula o vôo dos adultos facilitando a dispersão, por exemplo os triatomíneos no inverno são menos ativos e podem passar semanas a meses em jejum, mas

Tabela 4. Distribuição das espécies de triatomíneos positivos, segundo locais de capturas, no período de 2006 a 2009 no município de Limoeiro do Norte

| Espécie | Intradomicílio | | | | Peridomicílio | | | |
|--------------------------|----------------|-----------|-----------|-----------|---------------|-----------|-----------|-----------|
| | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 |
| <i>T. brasiliensis</i> | 01 | 00 | 04 | 01 | 06 | 00 | 04 | 08 |
| <i>T. pseudomaculata</i> | 22 | 05 | 00 | 08 | 25 | 02 | 20 | 62 |
| <i>P. megistus</i> | 08 | 02 | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 | 01 |
| <i>P. lutzi</i> | 06 | 03 | 01 | 00 | 00 | 00 | 00 | 01 |
| <i>R. nasutus</i> | 15 | 01 | 00 | 09 | 01 | 00 | 00 | 01 |
| Total | 52 | 11 | 05 | 18 | 32 | 02 | 24 | 73 |

quando a temperatura está alta as refeições são feitas em curtos intervalos²⁵. Os nossos achados mostram que os índices crescentes de infestação por triatomíneos nas unidades domiciliares, no período 2006 a 2009, podem ter relação com o aquecimento global, visto que essas localidades foram pesquisadas e borrifadas durante esses anos. Neste estudo observamos que o número de ninfas infestando o intra e o peridomicílio foi maior do que nos adultos, mostrando efetiva colonização nas unidades domiciliares e representando um alerta para a população de Limoeiro do Norte por estarem convivendo com os insetos transmissores da Doença de Chagas. A colonização de triatomíneos só ocorre quando há disponibilidade de abrigo e alimento, sempre predominando os galinheiros na maioria dos trabalhos da literatura^{26,27}.

CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo nos levam a concluir que Limoeiro do Norte apresenta alto risco de transmissão vetorial para doença de Chagas devido ao índice de infecção 7,9 % encontrado durante todo o período de estudo, tendo *Rhodnius nasutus* como responsável do maior índice de infecção, e Bom Fim e Socorro como os locais de maior risco de transmissão de tal enfermidade. Também concluímos que a espécie de *Triatoma pseudomaculata* representou 90,1 % do total de capturas no peridomicílio, enquanto que *Triatoma brasiliensis* predominou no intradomicílio em forma de ninfas. Devido a tais resultados, sugere-se que as ações de controle sejam intensificadas no município de Limoeiro do Norte para evitar a transmissão da doença e dispersão do vetor.

REFERÊNCIAS

1. Gómez-Hernández C, Rezende-Oliveira K, Zárate AC, Zárate EC, Trujillo-Contreras F, Ramirez LE. Prevalência de triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) infectados por *Trypanosoma cruzi*: sazonalidade e distribuição na região Ciénega do Estado de Jalisco, México. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008;41(3):257-62.
2. Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol*. 2006;22:583-8.
3. World Health Organization. Chagas disease information. The UNICEF-UNDP Programme on TDR: WHO; 2011.
4. Oliveira MF, Nagao-Dias AT, Pontes VMO, Souza Júnior AS, Coelho HLL, Coelho ICB. Tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil. *Rev Patol Trop*. 2008; 37(3):209-28.
5. Organización Panamericana de la Salud. Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas. OPS/HDM/CD. 2006;425-06.
6. Jurberg J, Galvão C, Noireau F, Carcavalho RU, Rocha DS, Lent H. Uma Iconografia dos Triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae). *Entomol Vect*. 2004;11(3): 454-94.
7. Coura JR. Tripanosomose, Doença de Chagas. *Cienc Cult*. 2003;55(1):30-3.
8. Camandaroba ELP, Pinheiro-Lima CM, Andrade SG. Oral transmission of Chagas disease: importance of *Trypanosoma cruzi* biodeme in the intragastric experimental infection. *Rev Inst Med Trop*. São Paulo. 2002;44(2):97-103.
9. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Gerenciamento do Risco Sanitário na Transmissão de Doença de Chagas Aguda por Alimentos. Informe Técnico (35). Brasília (DF); 2008.
10. Coura JR. Doença de Chagas. In: Coura JR (ed). Síntese das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 2008. p.12-8.
11. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. Caderno 10: Doença de Chagas. 7ª Edição. Brasília (DF); 2010.
12. Vinhaes M, Dias JCP. Doença de Chagas no Brasil. *Cad Saúde Pública*. 2000,16(2):7-12.
13. Dias FBS, Bezerra CM, Machado EMM, Casanova C, Diotaiuti L. Ecological aspects of *Rhodnius nasutus* Stål, 1859 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in palms of the Chapada do Araripe in Ceará, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008; 103(8):824-30.
14. Freitas ALCC, Freitas SP, Gonçalves TCM, Neto ASL. Vigilância Entomológica dos Vetores da Doença de Chagas no Município de Farias Brito, estado do Ceará – Brasil. *Cad Saúde Coletiva*. 2007;15(2):231-40.
15. Garcia MHHM, Souza L, Souza RCM, Paula AS, Borges EC, Barbosa SE, et al. Occurrence and variability of *Panstrongylus lutzi* in the State of Ceará, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005;38(5):410-5.
16. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. (acesso 2013 Ago). Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/cidadesat/xtras/perfil.php?codmun=230760&search=ceara|limoeiro-do-norte].
17. Wikipédia – Limoeiro do Norte. (acesso 2013 Ago). Disponível em: [http://pt.wikipedia.org/wiki/Limoeiro_do_Norte].
18. Tartarotti E, Azevedo-Oliveira MTV, Ceron CR. Problemática vetorial da Doença de Chagas. Vectorial problematic of the Chagas disease. *Arq Ciênc Saúde*. 2004;11(1):44-7.
19. Lima MM, Coutinho CFS, Gomes TF, Oliveira TG, Duarte R, Borges-Pereira J, et al. Risk Presented by *Copernicia prunifera* Palm Trees in the *Rhodnius nasutus*. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;79(5):750-4.
20. Freitas SPC, Lorosa ES, Rodrigues DCS, Freitas ALC, Gonçalves TCM. Fontes alimentares de *Triatoma pseudomaculata* no estado do Ceará, Brasil. *Rev Saúde Pública*. 2005;39:27-32.
21. Villela MM, Souza JB, Mello VP, Azeredo BVM, Dias JCP. Vigilância entomológica da doença de Chagas na região centro-oeste de Minas Gerais, Brasil, entre os anos de 2000 e 2003. *Cad Saúde Pública*. 2005;21(3):878-86.
22. Caranha L, Lorosa ES, Rocha D S, Jurberg JE, Galvão C. Estudo das fontes alimentares de *Panstrongylus lutzi* (Neiva & Pinto, 1923) (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) no Estado do Ceará. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006;39(4):347-51.
23. Silveira AC, Vinhaes MC. Doença de Chagas: Aspectos epidemiológicos e de controle. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1998;31:15-60.

24. Sarquis O, Borges-Pereira J, Mac Cord JR, Gomes TF, Cabello PH, Lima MM. Epidemiology of Chagas disease in Jaguaruana, Ceará, Brazil. I. Presence of triatomines and index of *Trypanosoma cruzi* infection in four localities of a rural area. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004;99:263-70.
25. Siqueira-Batista R, Rubião ECN, Cotta RMM, Pissinatti A, Soranz LFSP. 2007b. Epidemiologia e ecologia. *In*: Siqueira-Batista R, Gomes AP, Corrêa AD, Geller M. *Moléstia de Chagas*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Ed. Rubio. 248p.
26. Forattini OP. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. *Rev Saúde Pública*. 1980;14:265-99.
27. Alencar JE. História natural da doença de Chagas no Estado do Ceará. Fortaleza: Imprensa Universitária da Universidade Federal do Ceará; 1987; 341p.

Avaliação do treinamento de manipuladores de alimentos de restaurantes comerciais pelo ensaio ATP-bioluminescência

Evaluation of food handlers training in commercial restaurants by using ATP bioluminescence methodology

RIALA6/1578

Carolina Conti TAKAHASHI, Priscila Espeschit AMARAL, Lays Cristina Linhares SANTOS, Junia Dias CONTIM, Uelinton Manoel PINTO, Cristiane Vilas Boas NEVES, Sônia Maria de FIGUEIREDO*

*Endereço para correspondência: Departamento de Alimentos, Escola de Nutrição, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brasil, CEP 35400-000. Telefone: 31-3559-1819, fax: 31-3559-1828. E-mail: smfigue@gmail.com

Recebido: 11.04.2013 - Aceito para publicação: 20.12.2013

RESUMO

Os programas de treinamentos para manipuladores de alimentos são meios eficazes para transmitir conhecimentos e promover melhorias nas condições higiênico-sanitárias em estabelecimentos alimentícios. Neste trabalho foi avaliado o efeito do treinamento em boas práticas de manipulação de alimentos, ministrado aos funcionários de restaurantes comerciais da região de Ouro Preto – MG, por meio do teste de ATP-bioluminescência. O teste foi utilizado para quantificar a carga orgânica, medida como valor de “Unidades Relativas de Luz – URL”, nas amostras coletadas das mãos de manipuladores, de bancadas de trabalho e de superfícies de utensílios, selecionadas aleatoriamente em cada restaurante. Após o treinamento, houve melhoria no padrão higiênico, evidenciado pela redução da carga orgânica nas superfícies avaliadas em todos os restaurantes. Apesar da redução dos valores de URL, algumas superfícies não alcançaram o valor recomendado para superfície em condições higiênicas satisfatórias. A aplicação do teste ATP-bioluminescência para avaliação do treinamento de manipuladores mostrou ser eficaz e pode ser empregado em associação com os tradicionais métodos de contagem de micro-organismos em treinamentos realizados em Unidades de Alimentação e Nutrição. Apesar da redução dos valores de URL indicar a melhoria nas condições higiênicas, o trabalho de treinamento e monitoramento deve ser continuado.

Palavras-chave. condições higiênicas, manipuladores, ATP-bioluminescência.

ABSTRACT

Training programs designed for food handlers are an effective way to spread the knowledge and to promote improvements on the hygienic conditions of food establishments. This study aimed at evaluating the effect of a training course on good handling practices for food handlers of selected restaurants in the region of Ouro Preto, MG, Brazil, by using ATP-bioluminescence assay. This test was used to quantify the organic load, measured by “Relative Light Units – RLU”, in samples collected from workers hands, surfaces of work benches and utensils, which were randomly selected in each restaurant. After training, a significant improvement in the hygienic conditions was observed, as evidenced by the decrease in the RLU values in samples from all restaurants. Despite the decreased RLU values, some surfaces did not reach the recommended value for surfaces samples in the satisfactory hygienic conditions. The ATP-bioluminescence test showed to be effective for evaluating the training success, and could be a powerful tool when applied in training programs at food services, and in association with the conventional microbiological methodologies. In spite of the reduction in RLU values, indicating improvements in hygienic conditions, the training and monitoring programs should be continued.

Keywords. hygienic conditions, food handlers, ATP-bioluminescence.

INTRODUÇÃO

A globalização acarretou mudanças nos modos de vida de toda a sociedade. Pode-se destacar a influência da globalização na mudança do padrão de consumo alimentar, como o desenvolvimento do hábito de realizar refeições fora de casa¹. Esse fator em conjunto com o aumento da urbanização e a evolução dos modos de vida contribuíram para a transição nutricional pela qual tem passado a sociedade^{1,2}.

No Brasil é notória a tendência de aumento do número de refeições realizadas fora do domicílio. Segundo a Pesquisa de Orçamento Familiar (POF) do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), os brasileiros gastam, em média, 24 % das despesas alimentares em consumo fora de casa e há um aumento no número de estabelecimentos produtores de refeições de consumo imediato^{1,3,4,5}. Tais estabelecimentos incluem unidades de produção de porte, restaurantes comerciais, cozinhas hospitalares, *fast-food*, entre outros³.

A qualidade higiênico-sanitária de alimentos tem sido apontada como fator crucial para a segurança dos alimentos. Surtos de doenças de origem alimentar continuam a ocorrer em frequência elevada e são causa importante de morbidade e mortalidade em todo o mundo^{6,7}. O despreparo dos manipuladores de alimentos tem sido apontado como uma das principais causas de surtos de doenças de origem alimentar que estão relacionados diretamente com a contaminação dos alimentos, maus hábitos de higiene e práticas inadequadas na operacionalização do sistema de produção das refeições⁷. Os programas de treinamentos para manipuladores de alimentos são os meios recomendáveis e eficazes para transmitir conhecimentos e promover mudanças. Segundo a ANVISA⁸, os manipuladores de alimentos devem ser supervisionados e capacitados periodicamente em higiene pessoal, manipulação higiênica dos alimentos e doenças veiculadas por alimentos.

A Associação Americana de Saúde Pública (*American Public Health Association* - APHA) estabelece as metodologias comumente utilizadas para avaliar as condições microbiológicas de superfícies de manipulação ou processamento de alimentos². Dentre eles destacam-se: método do *swab*; método da rinsagem; método da seringa com ágar, método da esponja; método da placa de contato, método da sedimentação de micro-organismos do ar em meio sólido e o método do ATP-bioluminescência².

Os métodos tradicionais de análises microbiológicas, como a contagem padrão em placas, além de trabalhosos, são demorados, o que retardam a avaliação das condições sanitárias e inviabilizam ações corretivas imediatas. O uso de métodos rápidos para enumeração de micro-organismos e/ou detecção de resíduos orgânicos é de extrema importância². O teste ATP-bioluminescência tem como princípio a determinação da quantidade de ATP presente em uma superfície ou em uma amostra líquida, utilizando-se *swabs* apropriados. É um método rápido e sensível, capaz de detectar a adequação do procedimento de higienização^{2,9,10,11}.

Os testes de ATP-bioluminescência tornaram-se bem estabelecidos na indústria de alimentos e são comumente utilizados em sistemas de monitoramento na análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC)⁹. No entanto, os resultados de ATP não devem ser interpretados como indicadores substitutos para a presença de patógenos microbianos, mas sim como forma de diagnóstico e triagem para que sejam tomadas medidas rápidas no momento em que o funcionário executa as tarefas de limpeza e sanitização^{2,9,10,11}.

Este trabalho teve como objetivo avaliar, através do teste de ATP-bioluminescência, o efeito do treinamento em boas práticas de fabricação ministrado aos funcionários de restaurantes da região de Ouro Preto - MG, sobre a eficiência de higienização de diferentes superfícies. Pois, de acordo com o trabalho de Santos et al¹², o desenvolvimento de um programa aprimorado de limpeza, que combine inspeção visual e testes rápidos de detecção de ATP em superfícies importantes na disseminação de micro-organismos, pode representar uma alternativa para o aperfeiçoamento do processo de limpeza nas instituições.

METODOLOGIA

O trabalho consistiu em um estudo observacional do tipo descritivo (qualitativo), no qual foram convidadas sete Unidades Produtoras de Refeições (UPR). Entretanto, realizou-se o trabalho em apenas 04 Unidades, de acordo com a aceitação do convite. A justificativa para a escolha desses restaurantes baseou-se em solicitação do Centro de Referência de Assistência Social (CRAS) de Ouro Preto - MG, o qual explicitou o interesse da realização do treinamento sobre Boas Práticas de Fabricação devido ao aumento

significativo da mão de obra de manipuladores de alimentos na região.

Por questões de sigilo, as unidades participantes foram nomeadas como Restaurante e enumeradas de 1 a 4. Em cada restaurante comercial foram selecionados aleatoriamente e amostradas em triplicata, antes e após o treinamento, as mãos de manipuladores após higienização, a superfície de utensílios e a bancadas onde o profissional realizava o trabalho. As amostras foram avaliadas quanto às unidades relativas de luz (URL) através do Teste de ATP-bioluminescência.

O treinamento ministrado foi do tipo explicativo e realizado nos próprios estabelecimentos, em locais onde fosse possível projetar slides em projetor de imagens. Além dos slides, os participantes receberam todo treinamento impresso em forma de apostila. O treinamento teve foco na importância da adesão às boas práticas durante a manipulação de gêneros alimentícios e a conscientização sobre os prejuízos que práticas inadequadas de higiene durante o preparo de refeições podem gerar tanto aos comensais como ao próprio estabelecimento. O treinamento teve carga horária total de 20 horas, sendo cada módulo com duração de duas horas diárias.

As amostras das superfícies das bancadas, dos utensílios e das mãos dos manipuladores foram coletadas utilizando-se *swabs* de algodão de 0,5 cm de diâmetro por 2 cm de comprimento com haste de 12 cm de comprimento (3M Clean Trace Surface ATP – 3M, Estados Unidos). Para coleta das amostras de superfície, friccionaram-se, vinte vezes, os *swabs*

com pressão constante, formando uma inclinação aproximada de 30° com a superfície teste, na forma “zigue-zague”, no sentido das diagonais, descrevendo movimentos da esquerda para direita inicialmente e depois de baixo para cima, conforme preconizado na literatura¹. Para coleta das amostras das mãos dos manipuladores de alimentos, o *swab* foi passado com movimentos giratórios da parte inferior das palmas até a extremidade dos dedos e voltando ao punho, repetindo-se esse procedimento três vezes na direção de cada dedo. Os movimentos na borda eram do tipo vai e vem, de modo a avançar em um dos lados da mão onde as linhas dos punhos se iniciavam, passando depois entre os dedos, e no final, no outro lado da mão, encontrando-se de novo com as linhas dos punhos, conforme preconizado na literatura².

Em seguida, o *swab* foi introduzido em uma cubeta contendo o complexo enzimático luciferina-luciferase, presente no Kit *Clean Trace*. Na cubeta, ocorre a reação entre o ATP e o complexo enzimático formando luz, cuja quantidade foi medida, após 10 segundos, em aparelho Luminômetro (3M™ Clean-Trace™ NG, 3M, Estados Unidos). Os testes foram realizados em triplicatas e os resultados foram expressos em números absolutos de URL (Unidades Relativas de Luz).

O banco de dados da carga orgânica foi analisado pelo programa SPSS (*Software Package Statistical System*) 17.0 for Windows com auxílio do programa *Microsoft Office Excel 97-2003*, utilizando o teste *t-student*. Diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

Tabela 1. Média dos valores de URL para as variáveis testadas, antes e após o treinamento

| | Restaurante 1 | | Restaurante 2 | | Restaurante 3 | | Restaurante 4 | |
|---------------------|---------------|--------|---------------|--------|---------------|--------|---------------|--------|
| | Antes | Depois | Antes | Depois | Antes | Depois | Antes | Depois |
| Mãos de manipulador | 30.543 | 351* | 3.997 | 1.705* | 1.595 | 229* | 496 | 566 |
| Bancada de trabalho | 27.0111 | 1.005* | 64 | 166* | 12.107 | 6.688* | 700 | 605 |
| Utensílio (faca) | 117 | 13* | 396 | 205* | 57.966 | 9.885* | 995 | 394* |

* Diferença estatisticamente significativa $p < 0,05$ entre a amostragem antes e após o treinamento

O trabalho foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ouro Preto (aprovação CAAE: 0019.0.238.000-11)

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os dados obtidos através do método ATP-bioluminescência permitiram comparar o padrão higiênico das amostras coletadas, antes e após o treinamento, como demonstrado na Tabela 1.

De acordo com as recomendações de Andrade², as superfícies contendo até 150 URL (2,18 log URL) são consideradas dentro das condições higiênicas satisfatórias; entre 151 e 300 URL (2,48 log URL) em condições de alerta e acima de 300 URL são consideradas em condições higiênicas insatisfatórias.

Os resultados indicam que houve melhora significativa ($p < 0,05$) nos valores de URL para a maioria das variáveis avaliadas neste estudo. Para o Restaurante 1, observou-se uma redução da carga orgânica de aproximadamente 10 vezes nas mãos do manipulador, demonstrando a eficácia do treinamento e a maior conscientização do manipulador com respeito à higienização das mãos. Porém vale ressaltar que neste mesmo restaurante, somente a superfície do utensílio avaliado encontrava-se dentro do padrão recomendado pela literatura no que diz respeito a boas condições higiênicas¹. Sendo assim, ainda existe espaço para melhorias, especialmente no que tange à higienização da bancada de trabalho. No restaurante 2, a bancada avaliada apresentou um valor maior de URL após o treinamento, o que pode ser evidenciado como não adesão ao mesmo ou à falhas na técnica de desinfecção. Contrapondo este resultado houve melhora para as demais variáveis avaliadas, porém a análise das mãos do manipulador ainda indicou um nível de contaminação bem acima do valor recomendado pela literatura². No restaurante 3, observou-se melhora significativa para todas as variáveis analisadas, porém, a higienização empregada na limpeza e desinfecção da bancada de trabalho e utensílios ainda é deficiente. Para o restaurante 4, houve melhora das condições higiênicas somente para o utensílio avaliado.

A redução dos valores de URL para as mãos de manipuladores, após o treinamento ministrado, demonstra uma repercussão positiva do treinamento ministrado, contribuindo para a conscientização

a respeito da manipulação segura dos alimentos. Esses resultados demonstram a grande importância da contribuição dos manipuladores na produção de alimentos seguros, uma vez que a melhoria das práticas de higienização das mãos é fundamental para prevenir a propagação de doenças veiculadas por alimentos^{2,13,14}. Além de serem veículo de contaminação pela rota fecal-oral, os manipuladores de alimentos podem ser portadores de agentes patogênicos, sem manifestar sintomas de doença (portadores assintomáticos)¹⁵, reforçando assim a necessidade da correta higienização das mãos.

Boa parte dos surtos de doenças veiculadas por alimentos (DVA) notificados ocorre em locais de alimentação coletiva como restaurantes industriais, cantinas e restaurantes comerciais. A OMS¹⁶ estima que as DVA constituam um dos problemas de saúde mais difundidos atualmente causando prejuízo econômico aos indivíduos afetados, ao setor de saúde, às indústrias alimentícias e à economia de forma geral, além da morbidade e mortalidade. Os fatores potenciais de contaminação considerados mais relevantes são manipulação inadequada, falhas na higiene e desinfecção de alimentos, equipamentos e utensílios com má higienização, que entram em contato com os alimentos, além de abusos de temperatura nas etapas de resfriamento, refrigeração e distribuição.

Os resultados obtidos para a superfície de utensílios (03 em cada restaurante) foram considerados os mais satisfatórios, uma vez que houve redução dos valores de URL, após o treinamento, em todos os restaurantes analisados. Utensílios devidamente higienizados contribuem de forma significativa para a garantia da produção de alimentos seguros e de qualidade, pois utensílios e equipamentos contaminados utilizados no preparo das refeições contribuem expressivamente para os surtos de DVA¹⁷. Equipamentos e utensílios utilizados no preparo de alimentos são fontes importantes de contaminação, particularmente facas e placas de cortes utilizadas tanto para alimentos crus quanto para cozidos devido à possibilidade de contaminação cruzada. Assim, placas de corte de altileno devem ser exclusivas para cada tipo de alimento, a fim de evitar contaminação cruzada¹⁶. Andrade et al¹⁸ encontraram contagens elevadas de micro-organismos em equipamentos e utensílios de restaurantes e sugeriram que as condições higiênicas

deveriam ser melhoradas por meio de capacitação técnica do pessoal em prol da garantia de qualidade dos alimentos.

No Restaurante 4, resultados insatisfatórios foram encontrados após o treinamento. Porém, as justificativas para este problema são devidas ao abastecimento de água que estava comprometido na unidade no momento da análise. A qualidade da água utilizada no setor de alimentos é de grande importância, visto que esta participa de todas as etapas do processamento de alimentos. Deve-se, portanto, ter controle sobre os aspectos físico-químicos e microbiológicos da água para que esta não prejudique as qualidades sensoriais e microbiológicas dos alimentos produzidos¹⁹.

Os resultados deste estudo apontam para uma melhoria significativa das condições higiênicas dos restaurantes após o treinamento ministrado aos manipuladores, confirmando que este é um meio recomendável e eficaz para promover aquisição de conhecimentos e incentivar o envolvimento dos manipuladores na busca constante por qualidade. Além disso, a literatura mostra que os resultados na produtividade de uma indústria de alimentos não dependem apenas de investimentos em equipamentos, mas também em investimentos em recursos humanos²⁰. Sem investimentos nesse setor é impossível desenvolver as capacidades técnicas necessárias ao sucesso da empresa, pois o aperfeiçoamento de sua qualidade depende do desempenho da equipe operacional²¹⁻²⁴.

É importante ressaltar que as Unidades de Alimentação e Nutrição (UAN) devem adotar medidas de controle com o objetivo de evitar a ocorrência de doenças veiculadas pelos alimentos. Segundo Pinto et al¹⁵, o controle da contaminação dos alimentos nas operações de serviços de alimentação é difícil devido à grande variedade de alimentos preparados e à necessidade da rápida utilização dos mesmos, não havendo tempo para análises microbiológicas dos alimentos. Diante disso, um sistema de controle preventivo como a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) deve ser adotado. Como medida compulsória, as boas práticas de fabricação devem ser adotadas para melhoria da qualidade higiênica dos produtos e servir de base para a adoção da APPCC visando à segurança microbiológica, física e química dos alimentos.

O sistema APPCC preconiza um monitoramento rápido e eficiente das condições higiênicas dentro das

unidades processadoras de alimentos, sejam indústrias ou restaurantes. Segundo Costa e colaboradores²⁵, análises microbiológicas tradicionais da água e dos alimentos são muito demoradas o que dificulta o controle dos procedimentos de limpeza e sanitização. Diante disso, destaca-se o teste ATP – bioluminescência como método rápido, simples e fácil quando comparado aos métodos convencionais de análise^{10,25,26}. Portanto, programas de higienização podem ser monitorados em tempo real e se os níveis de ATP encontrados estiverem acima dos limites recomendados como aceitáveis, uma nova higienização pode ser iniciada imediatamente^{2,28}. No entanto, vale ressaltar que essa técnica pode ser usada no monitoramento de procedimentos de higienização, em conjunto com outros métodos, e a verificação do procedimento deve ser validada por métodos tradicionais, como a contagem microbiana.

De acordo com Griffith²⁷, as análises com URL são mais indicadas para refletir como a limpeza foi realizada, indicando se a superfície foi limpa adequadamente. Do mesmo modo, Zottola²⁸ afirma que a técnica de ATP-bioluminescência deve ser utilizada como um indicador da condição higiênica, evidenciando se há matéria orgânica na superfície. O estudo realizado por Sherlock e col²⁹, em um Hospital de Gales, examinou os métodos de avaliação visual de ambientes hospitalares, em contrapartida com os métodos químicos (detecção por bioluminescência) e métodos microbiológicos de medição de partículas orgânicas e microbianas. Enquanto 82 % das enfermarias pareciam visivelmente limpas (após a limpeza), apenas 30 % foram consideradas microbiologicamente limpas e 25 % foram considerados livres de partículas orgânicas. A partir desses resultados os autores concluíram que um programa de limpeza muito básico e inadequado estava em vigor. Estudos posteriores demonstraram que modificações nos esquemas de limpeza do hospital resultaram em melhoria dos índices de aprovação pelo método de contagem de ATP e menor contagem bacteriana.

Keskinen et al³⁰ relataram que o método ATP-bioluminescência tem uma contribuição clara em iniciativas para melhorar as práticas de limpeza e garantir a conformidade com Boas Práticas de Fabricação. A sua utilização constitui um avanço considerável sobre a atual dependência de avaliação visual subjetiva para determinar a higiene do meio ambiente. No entanto, cautela deve ser exercida em interpretar leituras. Sistemas de monitorização rápida

de ATP comercialmente disponíveis têm um certo número de limitações: (i) uma baixa sensibilidade para a detecção de micro-organismos; (ii) a repetibilidade pobre devido ao grande número de fatores que influenciam a eficiência de captação de superfícies; e (iii) interferência a partir de certos desinfetantes e outras substâncias que possam estar presentes no meio ambiente^{30,31}.

CONCLUSÃO

Pode-se concluir que o treinamento contribuiu para aprimorar as condições higiênicas dos restaurantes comerciais analisados. Houve adesão e envolvimento dos manipuladores às orientações propostas no treinamento, sendo possível a conscientização dos mesmos sobre a importância dos processos de higienização durante a produção dos alimentos. A aplicação do teste ATP-bioluminescência para avaliação do treinamento de manipuladores se mostrou eficaz e pode ser uma técnica aliada em treinamentos realizados em UAN. A redução dos valores de URL indicaram melhorias nas condições higiênicas dos estabelecimentos, porém, o trabalho de treinamento e monitoramento deve ser continuado de forma a contribuir para garantir a saúde da população.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Sr. Marcelo A. Ferraz da 3M por fornecer os swabs para realização do trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Akutsu RC, Botelho RA, Camargo EB, Sávio KEO, Araujo WC. Adequação das boas práticas de fabricação em serviços de alimentação. *Rev Nutr*. 2005;18(3):419-27.
2. Andrade NJ. Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos. São Paulo: Varela; 2008.
3. Garcia LP, Sant'Anna AC, Magalhães LCGd, Aurea AP. Gastos com saúde das famílias brasileiras residentes em regiões metropolitanas: composição e evolução no período 1995-2009. *Ciênc Saúde Coletiva*. 2013;18:115-28.
4. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística -IBGE. Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009: despesas, rendimento e condições de vida. Rio de Janeiro: IBGE; 2010. [acesso 2013 Jan 31]. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaoodevida/pof/2008_2009/POFpublicacao.pdf].
5. Cavalli SB, Salay E. Gestão de pessoas em unidades produtoras de refeições comerciais e a segurança alimentar. *Rev Nutr*. 2007; 20(6):657-67.
6. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, et al. Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(1):7-15.
7. Dewall CSHG, Hicks G, Barlow K, Alderton L, Vegosen L. Foods associated with foodborne illness outbreaks from 1990 through 2003. *Food Protection Trends*. 2006;26(7):466-73.
8. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC 216 de 15 de Setembro de 2004. Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. Diário Oficial [da] União da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 2004.
9. Shama G, Malik DJ. The uses and abuses of rapid bioluminescence-based ATP assays. *Int J Hyg Environ Health*. 2013;216(2):115-25.
10. Aycicek H, Oguz U, Karci K. Comparison of results of ATP bioluminescence and traditional hygiene swabbing methods for the determination of surface cleanliness at a hospital kitchen. *Int J Hyg Environ Health*. 2006;209(2):203-6.
11. Hawronskyj JM, Holah J. ATP universal hygiene monitor. *Trends Food Sci Technol*. 1997;8:79-84.
12. Santos NDV, Rotta ET, Silva CF, Deutschendorf C, Santos RP. Avaliação da limpeza terminal em uma unidade para pacientes portadores de microrganismos multirresistentes. *Revista HCPA*. 2013;33(1):7-14.
13. Cruz AG, Cenci SA, Maia MCA. Quality assurance requirements in produce processing. *Trends Food Sci Technol*. 2006;17:406-11.
14. Pragle AS, Harding AK, Mack JC. Food workers' perspectives on handwashing behaviors and barriers in the restaurant environment. *J Environ Health*. 2007;69(10):27-32.
15. Pinto UM, Cardoso RR, Vanetti MCD. Detecção de *Listeria*, *Salmonella* e *Klebsiella* em serviço de alimentação hospitalar. *Rev Nutr*. 2004;17(3):319-26.
16. Saúde OMD. Segurança básica dos alimentos para profissionais de saúde. São Paulo: Roca; 2002.
17. Ana BAO, Cunha DT, Stedefeldt E, Capalonga R, Tondo EC, Cardoso MRI. Hygiene and good practices in school meal services: Organic matter on surfaces, microorganisms and health risk. *Food Control*. 2014;40:120-6.
18. Andrade NJ, Silva RMM, Brabes KCS. Avaliação das condições microbiológicas em Unidades de Alimentação e Nutrição. *Ciênc Agrotec*. 2003; 27(3):590-6.
19. Costa PD. Avaliação da técnica de ATP bioluminescência no controle dos procedimentos de higienização na indústria de alimentos [dissertação]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 2001.
20. Saccol ALF, Rubim BA, Mesquita MO, Welter L. Importância de treinamento de manipuladores em boas práticas. *Discip Sci*. 2006;7(1):91-9.
21. Oliveira ABA, Cunha DT, Stedefeldt E, Capalonga R, Tondo EC, Cardoso MRI. Hygiene and good practices in school meal services: Organic matter on surfaces, microorganisms and health risks. *Food Control*. 2014;40:120-126.
22. Colombo SS. Qualidade: sua parceria no sucesso. *Nutr Pauta*. 1999;7(36):37-8.
23. Panetta JC. O manipulador: fator de segurança e qualidade dos alimentos. *Hig Alim*. 1998;12(57):8-10.

24. Neto MS. Diagnóstico situacional da utilização das ferramentas de segurança na produção de alimentos nas cozinhas das unidades de alimentação e nutrição dos hospitais de Brasília/DF [dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília; 2006.
25. Costa PD, Andrade NJ, Brandão SCC, Passos FJV, Soares NFF. ATP-bioluminescence assay as an alternative for hygiene-monitoring procedures of stainless steel milk contact surfaces. *Braz J Microbiol*. 2006;37(3):345-9.
26. Oliveira TD, Canettieri ACV. Eficiência dos métodos microbiológicos e de ATP-bioluminescência na detecção da contaminação de diferentes superfícies. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2010;6(4):467-74.
27. Griffith C. Improving surface sampling on detection of contamination. Cambridge: Cambridge Woodhead Publishing; 2005.
28. Zottola EA. Microbial attachment and biofilms formation: a new problem for the food industry. *Food Technol*. 1994;48:107-44.
29. Sherlock O, O'Connell N, Creamer E, Humphreys H. Is it really clean? An evaluation of the efficacy of four methods for determining hospital cleanliness. *J Hosp Infec*. 2009;72:140-6.
30. Keskinen LA, Annous BA. Efficacy of adding detergents to sanitizer solutions for inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on Romaine lettuce. *Int J Food Microbiol*. 2011;147(3):157-61.
31. Srey S, Jahid IK, Ha S-D. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*. 2013;31(2):572-85.

Avaliação das atividades antiproliferativa e antioxidante em frutos de *Campomanesia pubescens*

Evaluation of antioxidant and antiproliferative activities in fruits of *Campomanesia pubescens*

RIALA6/1579

Claudia Andrea Lima CARDOSO^{1*}, Marcos José SALVADOR², João Ernesto CARVALHO², Roberta Gomes COELHO³

*Endereço para Correspondência: ¹Centro de Pesquisa em Biodiversidade, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS), Caixa Postal 351, Dourados, MS, Brasil. CEP 79804-970, Tel: 67 39022643. E-mail: claudia@uems.br

²Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Curso de Farmácia, DBV-IB/CPQBA, Campinas, SP, Brasil

³Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Instituto de Química, Campo Grande, MS, Brasil

Recebido: 17.12.2012 - Aceito para publicação: 01.10.2013

RESUMO

A investigação química dos extratos bioativos dos frutos de *Campomanesia pubescens* (Myrtaceae) resultou no isolamento de duas chalconas. Os compostos isolados foram identificados pelas análises espectroscópicas (¹H, ¹³C e 2D RMN) e, por comparação com os dados descritos na literatura. A capacidade antioxidante dos extratos e frações foi determinada utilizando-se os ensaios de capacidade de absorção de oxigênio radical (ORAC-FL) e de DPPH; e os teores de fenólicos solúveis foram medidos utilizando-se o reagente de Folin-Ciocalteu. Os efeitos antiproliferativos dos extratos e de isolados de chalconas **1** e **2** foram determinados *in vitro* contra as seguintes células cancerosas humanas U251 (glioma), UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NC1-ADR/RES (ovário resistente), 786,0 (rim), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), OVCAR-3 (ovário), HT-29 (cólon) e K562 (leucemia), e contra linhagem celular não cancerígena VERO. O extrato hexânico e os compostos isolados de chalconas **1** e **2** demonstraram efeito antiproliferativo potente contra linhagens de células cancerosas com valores de inibição de crescimento total (TGI) menores dos aqueles observados na linhagem celular controle. A atividade mais elevada das chalconas **1** e **2** foi detectada nas células MCF-7, PC-3 e HT-29.

Palavras-chave. guavira, *Campomanesia pubescens*, DPPH, antiproliferativa, chalconas.

ABSTRACT

Chemical investigation on the bioactive extracts from fruits of *Campomanesia pubescens* (Myrtaceae) resulted in the isolation of two chalcones. The isolated compounds were identified by means of spectroscopic analysis (¹H, ¹³C and 2D NMR), and by comparing with the data reported in the specific literature. Antioxidant capacity of extracts and fractions was determined using the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-FL) and DPPH assays; and the total soluble phenolic contents were measured by using Folin-Ciocalteu reagent. The anti-proliferative effects of the extracts and of the chalcone isolates **1** and **2** were determined *in vitro* against human cancer cells lineages U251 (glioma), UACC-62 (melanoma), MCF-7 (breast), NC1-ADR/RES (ovarian-resistant), 786.0 (kidney), NCI-H460 (lung), PC-3 (prostate), OVCAR-3 (ovarian), HT-29 (colon) and K562 (leukemia), and against non-cancerous cell line VERO. Hexanic extract and chalcone isolated compounds **1** and **2** showed potent antiproliferative effect against cancer cell lineages with lower total growth inhibition (TGI) values than those found in control cell line. The highest activity of the chalcones **1** and **2** was observed against the MCF-7, PC-3 and HT-29 cell lines.

Keywords. guavira, *Campomanesia pubescens*, DPPH, antiproliferative, chalcones.

INTRODUÇÃO

O câncer é uma das doenças que afeta milhares de pessoas em todo o mundo. A Organização Mundial da Saúde estima que em 2020 cerca de 15 milhões de pessoas irão morrer da doença¹. Apesar do elevado número, um grande progresso tem sido feito em relação às terapias para tratar o câncer. O tratamento quimioterápico é o mais utilizado, mas muitas substâncias de fontes naturais têm sido utilizadas, principalmente aquelas obtidas de plantas que são isoladas, identificadas e/ou sintetizadas. Como exemplo o diterpeno taxol isolado de *Taxus brevifolia* e os alcalóides vincristina e vinblastina extraídos de *Catharanthus roseus*².

O potencial inibitório contra o câncer tem sido confirmado em vários modelos animais. Apesar de que uma avaliação preliminar pode ser realizada em testes *in vitro* utilizando linhagens de células tumorais para avaliação de extratos e de substâncias puras isoladas. Deste modo, a realização de ensaios biológicos para verificar algumas possíveis atividades que são atribuídas ou não a várias espécies vegetais torna-se importante e essencial ferramenta para dar continuidade a estudos visando à busca por substâncias bioativas^{3,4}.

Como parte de nossa pesquisa com plantas estão as espécies do gênero *Campomanesia* (família Myrtaceae), como a espécie *Campomanesia pubescens*. Essas espécies são conhecidas como guavira e são encontradas em abundância no estado de Mato Grosso do Sul podendo ser uma fonte de compostos bioativos⁵.

O gênero *Campomanesia* pertencente à subfamília *Myrtoidea* apresenta aproximadamente 25 espécies distribuídas por toda a América tropical, sendo 15 nativas do Brasil⁵⁻⁷. São amplamente usadas pela população e podem ser consumidas frescas ou usadas para elaborar sucos, licores e doces. Em alguns lugares utiliza-se a infusão de suas folhas, casca dos frutos e talos como remédio para disenteria, problemas de estômago, febre entre outros⁸. Apesar do seu uso medicinal, a literatura relata poucas investigações químicas e farmacológicas com plantas deste gênero.

Dentre os estudos químicos existentes, o extrato hexânico dos frutos de *C. pubescens* foi analisado e identificado por cromatografia líquida alta eficiência (CLAE) duas chalconas e quatro flavanonas⁹. Dos frutos de *C. adamantium* uma fração contendo uma mistura de uma flavanona e uma chalcona apresentou atividade contra o bacilo da tuberculose, *Mycobacterium*

tuberculosis. A variação das concentrações das substâncias presentes nessa mistura apresentou MIC entre 62,5 a 7,8 µg/mL demonstrando sinergismo entre essas substâncias¹⁰. Flavanonas e chalconas sintéticas e naturais são conhecidas por apresentarem várias atividades farmacológicas entre elas citotóxica, anti-inflamatória, antiangiogênica, antipirética, analgésica.^{11,12}

No extrato hexânico das folhas, foram identificados sesquiterpenos e triterpenos. Esse extrato não se mostrou tóxico frente à *Artemia salina* e apresentou atividade antioxidante¹³, o que sugere ter um potencial para combater radicais livres além de diversas doenças a eles relacionados¹⁴⁻¹⁶. Além disso, o ensaio utilizando *A. salina* tem sido considerado um bom método para detecção de compostos bioativos em extratos de plantas e a toxicidade a este microcrustáceo tem uma boa correlação com atividades antitumor e anti-*Trypanosoma cruzi*^{17,18}.

Outros estudos químicos empregando CLAE também em folhas de *C. pubescens* relataram a presença dos flavonóides como a miricitrina. Quercetina, miricitrina e rutina foram encontrados em *C. xanthocarpa*; e miricitrina e quercetina em *C. quazumaefolia*¹⁹. A miricitrina, substância encontrada em espécies deste gênero, apresenta várias atividades farmacológicas, entre elas antinociceptiva e antioxidante^{20,21}.

Dando continuidade ao estudo da espécie *C. pubescens*, este artigo relata o isolamento e a identificação de duas chalconas e a avaliação da atividade antiproliferativa frente a linhagens de células tumorais humanas, atividade antioxidante e quantificação dos teores de fenóis totais solúveis dos extratos dos frutos de *C. pubescens*, visando contribuir para o conhecimento da constituição química dessa espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta da amostra

Os frutos de *C. pubescens* foram coletados no município de Campo Grande, MS, Brasil, em dezembro de 2008. A espécie foi identificada e uma exsicata foi depositada no Herbário Mato Grosso do Sul-HMS, Campo Grande, MS, Brasil, sob o número 5199.

Obtenção dos extratos e isolamento das substâncias

Os frutos inteiros e frescos (1,8 kg da amostra total) foram triturados e extraídos por maceração

exaustiva sucessivamente com hexano e acetato de etila à temperatura ambiente. Os solventes de cada extrato foram evaporados sob pressão em rotaevaporador fornecendo 23,53 g de extrato hexânico (EHex) e 40,87 g de extrato acetato de etila (EAcOEt). O extrato hexânico (22,59 g) foi dissolvido em acetonitrila, aquecido e mantido a aproximadamente 70 °C por 1 h. Após o aquecimento a amostra foi resfriada e mantida em refrigerador a -4 °C por 24 h. Após esse período o sobrenadante foi decantado e o resíduo foi novamente submetido a esse processo. Após esse procedimento obteve-se 5,67 g da fração solúvel, denominada de fase acetonitrila (FACN), e 16,87 g de resíduo, denominada de fase hexânica (FHex). A fase acetonitrila (3,20 g) foi submetida à coluna cromatográfica de sílica gel 70-230 mesh, utilizando hexano-AcOEt em gradiente de polaridade crescente, fornecendo 29 frações por cromatografia em coluna. A fração 8 (253,53 mg) foi novamente submetida a uma coluna em gel de sílica (230-400 mesh) nos mesmos solventes utilizados acima em gradiente de polaridade crescente e forneceu o composto **1** (63,57 mg). A fração 10 (234,98 mg) forneceu o composto **2** (6,66 mg) após ser fracionada em gel de sílica (230-400 mesh), porém utilizando hexano-acetona em gradiente de polaridade crescente.

Instrumentação e procedimentos experimentais gerais

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear foram registrados em um espectrômetro Bruker DPX-300 (¹H: 300 MHz e ¹³C: 75 MHz) utilizando-se como solventes CDCl₃ e Acetona-d₆ e TMS como referência interna.

Na cromatografia de adsorção em coluna (CC) foi utilizado gel de sílica 60 (63-200 µm, 70-230 mesh e 40-63 µm, 230-400 mesh, Merck). Para CCD foram utilizadas cromatoplasmas de alumínio recobertas por filme de 200 µm de sílica gel, com indicador de fluorescência na faixa de 245 nm. As placas foram reveladas sob luz ultravioleta (254 e 365 nm) e por aspersão de solução ácida de vanilina seguida de aquecimento. Os eluentes utilizados nas colunas cromatográficas foram hexano (Dinâmica), acetato de etila (Chenco) e acetona (Dinâmica).

Teor de compostos fenólicos

O teor total de compostos fenólicos solúveis foi determinado utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu. Foram preparadas soluções com concentração de 800 µg/mL de cada extrato e partição. Aliquotas dessas soluções (100 µL) foram adicionadas a 2 mL de Na₂CO₃. Após 2

minutos, 100 µL do reagente de Folin-Ciocalteu 50 % foi adicionado à mistura. Após 30 minutos a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 750 nm. Com os dados do ácido gálico foi obtida uma curva analítica. O conteúdo de fenóis totais foi expresso em equivalentes de ácido gálico (EAG) por mL de solução. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Atividade antioxidante

Os testes de atividade antioxidante e da quantificação de fenóis solúveis totais foram realizados em espectrofotômetro Hitachi, modelo U-1100.

O ensaio com o radical livre estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) foi realizado pela adição de 1,0 mL de cada extrato, em diferentes concentrações (40 µg/mL a 400 µg/mL), a 2,0 mL de uma solução a 0,004 % de DPPH em metanol. Após incubação a 25 °C por 30 minutos, a absorbância de cada amostra foi lida no comprimento de onda de 517 nm. Todas as análises foram feitas em triplicata. A porcentagem de inibição (% I) foi calculada pela fórmula: % I = (A_{DPPH} - (A_A - A_{DPPH})) / A_{DPPH} × 100. Onde A_{DPPH} é a absorbância máxima do DPPH, A_A é a absorbância da amostra após 30 minutos de reação e A_A é a absorbância da amostra em metanol. Os resultados foram expressos em CI₅₀ que é a concentração capaz de reagir com 50 % do DPPH presente.

Na avaliação da atividade antioxidante empregou-se também o ensaio cinético ORAC-FL (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) utilizando a metodologia como descrita por Salvador²². Estes ensaios foram realizados em triplicata e expressos como µM de Trolox equivalente por grama de extrato em base seca.

Avaliação da atividade antiproliferativa

Para a realização dos ensaios foram empregadas oito linhagens de células tumorais e um controle. A avaliação *in vitro* da atividade antiproliferativa foi realizada segundo metodologia descrita por Monks²³, utilizando-se doxorubicina como controle positivo. Para o teste de atividade, foram plaqueados 100 µL de células em meio RPMI/SFB/gentamicina, em placas de 96 compartimentos. As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C em atmosfera de 5 % de CO₂. Depois desse período, uma placa controle foi fixada através da adição de ácido tricloroacético para determinação da quantidade de células no momento da adição das drogas-teste. Os extratos e as substâncias isoladas foram avaliados em concentrações que variaram de 0,0625 a 250 µg/mL e

incubados por 48 h. Decorrido o período de incubação, as placas foram coradas pela adição de 50 µL do corante proteico sulforrodamina B (SRB) a 0,4 % (peso/volume), dissolvido em ácido acético a 1 %, e incubadas a 4 °C durante 30 min. O corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com uma solução de Trizma Base na concentração de 10 µM e pH 10,5 por 5 min em ultrassom. A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em 560 nm em um leitor de microplacas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente determinou-se os teores de fenóis totais solúveis dos extratos hexânico e acetato de etila, seguida da avaliação *in vitro* da atividade antiproliferativa e antioxidante. Após isso, procedeu-se o fracionamento cromatográfico da fase acetonitrila (FACN), proveniente do extrato hexânico dos frutos que levou ao isolamento das chalconas 2',4'-diidroxí-3',5'-dimetil-6'-metoxichalcona. (1) e 2',4'-diidroxí-5'-metil-6'-metoxichalcona (2). Suas estruturas são mostradas na Figura 1. Ambas foram identificadas com base nos dados espectrais de RMN ¹H, ¹³C e RMN 2D e comparação com os dados da literatura²⁴.

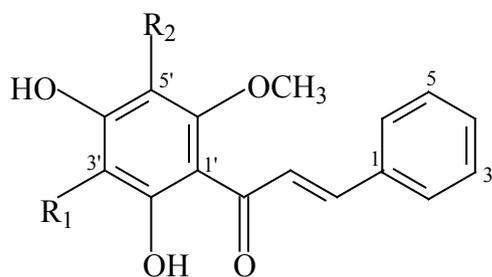


Figura 1. Substâncias (1 e 2) isoladas dos extratos dos frutos de *C. pubescens*

Em estudos realizados anteriormente somente a substância foi identificada no extrato hexânico dos frutos de *C. pubescens* empregando CLAE-DAD e padrões⁹.

A atividade antioxidante dos extratos e partições foi realizada por dois métodos: DPPH (radical livre estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazila) e ORAC-FL (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*)²⁵. Os resultados são reportados na Tabela 1. O extrato acetato de etila (EAcOEt) mostrou ser o mais ativo dentre os analisados e a FACN apresentou a segunda maior atividade. Quando comparados os teores de compostos fenólicos

para essas amostras (Tabela 1) na concentração de 1000 µg/mL, verificou-se que o EAcOEt apresentou um teor de fenóis inferior a FACN, 77,74 e 96,24 µg EAG/mL, respectivamente. O extrato hexânico (EHex) e a fase hexânica (FHex) foram os menos ativos diante ao ensaio com DPPH. Apesar de apresentar um teor de fenóis (85,09 µg EAG/mL) superior ao EAcOEt, o EHex apresentou baixa atividade. Isso pode ser devido a maiores quantidades de flavanonas e chalconas que estão presentes no EHex e que não apresentam as características químicas necessárias para a atividade antioxidante utilizando o método do DPPH, mas que apresentam um teor de fenóis superior ao EAcOEt.

As substâncias 1 e 2 tiveram suas CI_{50} determinadas frente ao DPPH iguais a $205 \pm 1,2$ e $141 \pm 4,3$ µM, respectivamente, valores superiores ao ácido gálico, que foi utilizado como padrão e apresentou CI_{50} de $25 \pm 0,1$ µM²⁶. Esses resultados mostram que a substância 1, majoritária em todas as amostras, apresenta atividade cerca de oito vezes menor que o ácido gálico, justificando a afirmação de que é pouco ativa frente ao DPPH quando comparado ao padrão.

Entretanto no ensaio cinético ORAC-FL, baseado em mecanismos de transferência de hidrogênio, ambos os extratos apresentaram considerável capacidade antioxidante, da ordem de 1200 µM de Trolox equivalente por grama de extrato em base seca (Tabela 1). Essas diferenças de valores observadas nos resultados podem ser explicadas baseadas nos diferentes mecanismos envolvidos nos dois métodos de determinação da capacidade antioxidante²⁶. Assim, torna-se importante empregar mais de um ensaio na avaliação da capacidade antioxidante de amostras complexas como os extratos vegetais, buscando-se fazer uso de ensaios diretos e indiretos.

A atividade antiproliferativa dos extratos de *C. pubescens* e das substâncias 1 e 2 isoladas foram avaliadas na inibição da proliferação de células em linhagens de células humanas UACC-62 (melanoma); MCF-7 (mama); NCI-ADR/RES (ovário resistente a múltiplos fármacos); 786-0 (rim); NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); PC-3 (próstata); OVCAR-3 (ovário); HT-29 (cólon) em comparação com célula normal VERO (célula epitelial de rim de macaco verde).

Os resultados da atividade antiproliferativa indicam que os extratos dos frutos de *C. pubescens* acumulam substâncias com efeito citocida para linhagens de células tumorais humanas (Tabela 2). A linhagem de célula normal VERO (célula epitelial

Tabela 1. Atividade antioxidante e total de fenóis dos extratos e partições dos frutos de *C. pubescens*

| Teste | Amostras | | | |
|----------------------|----------|--------|-------|---------|
| | EHex | FHex | FACN | EAcOEt |
| DPPH ¹ | >400,0 | >400,0 | 290,9 | 140,85 |
| ORAC-FL ² | 1210,33 | - | - | 1288,18 |
| Fenóis ³ | 85,09 | 57,61 | 96,24 | 77,74 |

¹ Atividade antioxidante expressa em CI50. ² Dados apresentados como média do ensaio em triplicata, os resultados estão expressos como µmol de Trolox equivalente por grama de extrato em base seca. ³ Em µg EAG/mL, medida em uma solução a 800 µg/mL. EHex: extrato hexânico. FHex: fase hexânica. FACN: Fase acetonitrila. EAcOEt: extrato acetato de etila. -: experimento não realizado

de rim de macaco verde, linhagem de célula controle), os extratos EHex e EAcOEt e dos frutos de *C. pubescens* mostraram baixa citotoxicidade, uma vez que ambos apresentaram valor de TGI (concentração necessária para inibição de 100 % do crescimento celular) > 250,00 µg/mL. Entretanto frente as linhagens de células tumorais UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama) e NCI-ADR/RES (ovário resistente a múltiplos fármacos) o EHex apresentou-se ativo com valores de TGI 103,50 µg/mL e para a linhagem HT-29 (côlon) o TGI foi de 207,17 µg/mL (Tabela 2). O EAcOEt não mostrou atividade antiproliferativa até a concentração de 250,00 µg/mL. Possivelmente a diferença de valores observadas entre os diferentes extratos se deve a presença das chalconas no extrato hexânico. Chalconas são polifenóis e participam como intermediários na biossíntese dos flavonóides²⁷. A literatura relata inúmeros estudos e investigações usando diferentes modelos celular e animal que sugerem que chalconas podem inibir a iniciação de alguns tumores, assim como sua progressão²⁷.

Sendo assim, as substâncias isoladas **1** e **2** foram testadas frente as linhagens de células tumorais humanas e apesar de apresentarem, respectivamente, TGI de 9,48 e 13,27 µg/mL frente a célula controle VERO, mostraram resultados promissores frente às linhagens tumorais de

melanoma, mama, próstata e cólon, com valores de TGI que variaram de 4,99 a 12,94 µg/mL, portanto com valores de TGI inferiores ao citotóxico para a célula normal controle (Tabela 2). Merece destaque o TGI da atividade antiproliferativa da chalcona **1** frente à linhagem tumoral de ovário resistente a múltiplos fármacos NCI-ADR/RES = 3,03 µg/mL, valor este próximo a 1/3 da concentração citotóxica dessa substância frente à linhagem controle (9,48 µg/mL).

Simirgiotis et al²⁸ relata que a presença de um grupo 4-OH e uma ligação dupla-insaturada são características essenciais para a citotoxicidade de chalconas. Chalconas O-metiladas apresentaram atividade contra linhagens de células tumorais humanas KB, KB-VCR e A-549. Outra investigação mostrou que muitas chalconas com metoxilas no anel A exibiram atividade por inibição da polimerização da tubulina contra uma variedade de células tumorais com baixas concentrações (CI₅₀ < 50 µM)²⁸.

Os compostos **1** e **2** possuem nas posições 2' e 4' um grupo hidroxila e na posição 6' um grupamento metoxila. Uma característica incomum a essa classe de compostos é a presença de um grupamento metila nas posições 3' e 5', respectivamente. Comparando-se a atividade antiproliferativa das chalconas **1** e **2** entre si, observa-se que na relação estrutura-atividade a inserção

Tabela 2. Valores de TGI em µg/mL, para os extratos hexânico e em acetato de etila dos frutos de *C. pubescens* necessários para inibir a proliferação celular*

| Amostras | UACC-62 | MCF-7 | NCI-ADR/RES | 786-0 | NCI-H460 | PC-3 | OVCAR-3 | HT-29 | VERO |
|------------------|---------|-------|-------------|-------|----------|------|---------|--------|-------|
| Extrato hexânico | 95,32 | 65,56 | 103,50 | >250 | >250 | >250 | >250 | 207,17 | >250 |
| Ac. de etila | >250 | >250 | >250 | >250 | >250 | >250 | >250 | >250 | >250 |
| Substância 1 | 7,13 | 6,78 | 3,03 | 10,99 | 7,79 | 5,37 | 11,11 | 4,99 | 9,48 |
| Substância 2 | 10,62 | 8,10 | 14,59 | 13,36 | 14,66 | 9,20 | 12,94 | 8,63 | 13,27 |

*TGI: *Total Growth Inhibition* - concentração que promove a inibição 100 % do crescimento celular. Os valores foram determinados por análise de regressão não linear (sigmoidal), utilizando o programa Origin 7.5 (r² > 0,9).

Células tumorais: UACC-62 (melanoma); MCF-7 (mama); NCI-ADR/RES (ovário resistente a múltiplos fármacos); 786-0 (rim); NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); PC-3 (próstata); OVCAR-3 (ovário); HT-29 (côlon); Célula normal: VERO (célula epitelial de rim de macaco verde)

de um grupamento metila na posição 3' da chalcona **1** potencializa consideravelmente sua atividade citotóxica frente as células tumorais, estando estes dados coerentes com relatos da literatura²⁹.

Estudos realizados por Ye et al³⁰ com o composto **1** isolado de *Cleistocalyx operculatus* demonstraram que essa chalcona foi citotóxica para células K562 de humanos leucêmicas com CI_{50} igual a $14,2 \mu M$ ³⁰. De acordo com o autor o mecanismo antitumor de como as chalconas atuam ainda não é totalmente esclarecido, embora estudos sugeriram que esses compostos possam induzir apoptose em células cancerígenas. As chalconas buiteína e isoliquiritigenina induziram apoptose em células de melanoma *in vitro* e a chalcona phloretina induziu apoptose em células de melanoma e células de humano leucêmicas³¹.

Em conclusão, nosso estudo avaliou os teores de fenóis totais atividades antioxidante, por dois métodos diferentes, e antiproliferativa dos extratos de *C. pubescens*. Duas chalconas foram isoladas, identificadas e avaliadas quanto às atividades citadas anteriormente. Chalconas são compostos caracterizados por diversas propriedades bioquímicas, atuando como atividade citotóxica, anticancerígena, mutagênica e quimiopreventiva, além de antiviral, antimicrobiana, apesar de que o papel que ela desempenha, o mais conhecido, está associado a propriedades de captura de radicais livres^{27,31-32}. Entretanto, as chalconas por nós avaliadas apresentaram baixa atividade antioxidante. De acordo com Zakaria et al³² sugerem que as propriedades antioxidante exibida por substâncias fenólicas e extratos que contenham esses compostos estão direta ou indiretamente relacionadas com a atividade antiproliferativa³², mas isso ainda não está totalmente esclarecido. Estudos futuros serão necessários para elucidar o mecanismo de atuação das chalconas **1** e **2**.

AGRADECIMENTOS

A FUNDECT, FAPESP e CNPq

REFERÊNCIAS

1. Barbosa CES, Silveira-Lacerda EDP. Toxicidade aguda em dose simples do composto experimental cis-tetraaminoxalatorutênio (III). *Infarma*. 2006;18(11): 14-6.
2. Kingston DGI, Newman DJ. Wiley Encyclopedia of Chemical Biology. London: John Wiley & Sons; 2009, p. 249-60.
3. Pilatova M, Varinska L, Perjesi P, Sarissky M, Mirossay L, Solar P, et al. *In vitro* antiproliferative and antiangiogenic effects of synthetic chalcone analogues. *Toxicol in Vitro*. 2010;24:1347-55.
4. Zakaria ZA, Rofiee MS, Mohamed AM, Teh LK, Salleh MZ. *In Vitro* Antiproliferative and Antioxidant Activities and Total Phenolic Contents of the Extracts of *Melastoma malabathricum* Leaves. *J Acupunct Meridian Stud*. 2011;4(4):248-56.
5. Limberger RP, Apel MA, Sobral M., Moreno PRH, Henriques AT, Menu C. Aromatic plant from Brazil-chemical composition of essential oils from some *Campomanesia* species (Myrtaceae). *J Essent Oil Res*. 2001;13(2):113-5.
6. Ferreira LC, Guimarães AG, Paula CA, Michel MCP, Guimarães R G, Rezende AS, et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Campomanesia adamantium*. *J Ethnopharmacol*. 2013;145:100-8.
7. Moura-Costa GF, Nocchi SR, Coelle LF, Mello JCP, Nakamura CV, Dias Filho BP, et al. Antimicrobial activity of plants used as medicinal sonan indigenous reserve in Rio das Cobras, Parana, Brazil. *J Ethnopharmacol*. 2012;143:631-8.
8. Lorenzi H, Sartori SF, Bacher LB, Lacerda MTC. Frutas Brasileiras e Exóticas Cultivadas – (de consumo *in natura*). Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora; 2006.
9. Cardoso CAL, Salmazzo GR, Honda NK, Prates CB, Vieira MC, Coelho RG. Antimicrobial Activity of the Extracts and Fractions of Hexanic Fruits of *Campomanesia* Species (Myrtaceae). *J Med Food*. 2010;13(5):1273-6.
10. Pavan FR, Leite CQF, Coelho RG, Coutinho ID, Honda NK, Cardoso CAL, et al. Evaluation of anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae). *Quim Nova*. 2009;32:1222-6.
11. Bandgar BP, Gawande SS, Bodade RG, Totre JV, Khobragade CN. Synthesis and biological evaluation of simple methoxylated chalcones as anticancer, anti-inflammatory and antioxidant agents. *Bioorgan Med Chem*. 2010;18:1364-70.
12. Nielsen SF, Boesen T, Larsen M, Schönning K, Kromann H. Antibacterial chalcones-bioisosteric replacement of the 40-hydroxy group. *Bioorgan Med Chem*. 2004;12:3047-54.
13. Cardoso CAL, Silva JRM, Kataoka VMF, Brum CS, Poppi NR. Avaliação da atividade antioxidante, toxicidade e composição química por CG-EM do extrato hexânico das folhas de *Campomanesia pubescens*. *Rev Cien Farm Bas Aplic*. 2008;29:297-301.
14. Kähkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Ranha J, Pihlaja K, Kujala TS, et al. Antioxidant activity plants extracts containing phenolics compounds. *J Agric Food Chem*. 1999;47:3954-62.
15. Noguch N, Niki E. Phenolic antioxidants: A rationale for design and evaluation of novel antioxidant drugs for atherosclerosis. *Free Rad Biol Med*. 2000;28:1538-46.
16. Halliwell B. Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutr Rev*. 1997;55:544-52.
17. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JF, Jacobsen LB, Nichols DE, Mclaughlin JL. Brine shrimp a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med*. 1982;45:31-5.
18. Zani CL, Chaves PPG, Queiroz R, Menes NM, Oliveira AB, Cardoso JE, et al. Brine shrimp lethality assay as a prescreening system for anti-*Trypasoma cruzi* activity. *Phytomed*. 1995;2:47-54.
19. Schmeda-Hirschmann G. Flavonoids from *Calycorectes*, *Campomanesia*, *Eugenia* and *Hexachlamys* species. *Fitoter*. 1995;66:373-4.
20. Córdova MM, Werner MFP, Silva MD, Ruanic AP, Pizzolatti MG, Santos ARS. Further antinociceptive effects of myricitrin

- in chemical models of overt nociception in mice. *Neurosci Lett*. 2011;495:173-7.
21. Meotti FC, Luiz AP, Pizzolatti MG, Kassuya CA, Calixto JB, Santos AR. Analysis of the antinociceptive effect of the flavonoid myricitrin: evidence for a role of the l-arginine-nitric oxide and protein kinase C pathways. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;316:789-96.
 22. Salvador MJ, Ferreira EO, Mertens-Talcott SU, Castro WV, Butterweck V, Derendorf H, et al. Isolation and HPLC quantitative analysis of antioxidant flavonoids from *Alternanthera tenella* Colla. *Zeitschrift Fur Naturforschung C*. 2006;61:19-25.
 23. Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, Vistica D, et al. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. *J Natl Cancer Inst*. 1991;83:757-66.
 24. Agrawal PK. Carbon-13 NMR of Flavonoids. Amsterdam: Elsevier; 1989, p 95-235.
 25. Belofsky G, Percivill D, Lewis K, Tegos GP, Ekart J. Phenolic metabolites of *Dalea versicolor* that enhance antibiotic activity against model pathogenic bacteria. *J Nat Prod*. 2004;67:481-4.
 26. Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem*. 2005;53:1841-56.
 27. Go ML, Wu X, Liu XL. Chalcones: an update on cytotoxic and chemoprotective properties. *Curr Med Chem*. 2005;12:483-99.
 28. Simirgiotis MJ, Adachi S, To S, Yang H, Reynertson KA, Basile M J, et al. Cytotoxic chalcones and antioxidants from the fruits of *Syzygium samarangense* (Wax Jambu). *Food Chem*. 2008;107:813-9.
 29. Andrade Cunha GM, Fontenele JB, Nobre Júnior HV, De Sousa FCM, Silveira ER, Nogueira NAP, et al. Cytotoxic Activity of Chalcones Isolated from *Lonchocarpus Sericeus* (Pocr.) Kunth. *Phytother Res*. 2003;17:155-9.
 30. Ye C-L, Qian F, Wei D-Z, Lu Y-H, Liu J-W. Induction of apoptosis in K562 human leukemia cells by 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone. *Leukemia Res*. 2005;29:887-92.
 31. Ye CL, Liu JW, Wei DZ, Lu YH, Qian F. *In vitro* anti-tumor activity of 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'- dimethylchalcone against six established human cancer cell lines. *Pharmacol Res*. 2004;50:505-10.
 32. Zakaria ZA, Rofiee MS, Mohamed AM, Teh LK, Salleh MZ. *In Vitro* Antiproliferative and Antioxidant Activities and Total Phenolic Contents of the Extracts of *Melastoma malabathricum* Leaves. *J Acupunct Meridian Stud*. 2011;4:248-56.

Estudo das propriedades físico-químicas da glibenclamida e excipientes que influem sobre resultados do ensaio de dissolução para medicamento similar e genérico

Effect of the physicochemical properties of glyburide on the results of dissolution test for generic and similar drugs

RIALA6/1580

Euclides Quintino da Silva FILHO^{1*}, José Luiz Neves de AGUIAR¹, André Luis Mazzei ALBERT¹, Armi Wanderley NOBREGA²

*Endereço para correspondência: ¹Laboratório de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes, Departamento de Química, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, CEP 21.040-900. Tel:(21)3865-5228. Email: euclides.filho@incqs.fiocruz.br

²Assessoria técnico-científico, Diretoria, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz
Recebido: 16.08.2013 - Aceito para publicação: 29.11.2013

RESUMO

Alguns insumos farmacêuticos ativos (IFA) possuem como característica, a possibilidade de apresentarem o polimorfismo, que pode se desenvolver em alguma das etapas do processo de produção na indústria. No caso deste não ser caracterizado e especificado, um diferente polimorfo poderá ser utilizado equivocadamente durante o processo de fabricação. A ocorrência de polimorfismo pode originar importantes variações nas propriedades físico-químicas dos IFAs, principalmente quanto à solubilidade. Alguns medicamentos de glibenclamida (GLIB) apresentaram denúncias de ineficácia terapêutica e a presença de polimorfos pode ser uma das possíveis causas. Neste trabalho foram analisados cinco medicamentos e cinco IFAs de diferentes fornecedores. Para os medicamentos foram feitos testes característicos de verificação de equivalência farmacêutica. Nos IFAs, as diversas técnicas empregadas não evidenciaram presença de polimorfos ou alterações importantes nas propriedades físico-químicas e na velocidade de dissolução intrínseca. Entretanto, os perfis de dissolução dos medicamentos, principalmente, entre os dois similares A e B demonstraram diferenças apontadas pelos valores do fator f_2 , respectivamente, de 20 e 42, os quais indicaram associação destes valores com a presença de distintos excipientes, como por exemplo o manitol e diferentes processos de produção industrial.

Palavras-chave. glibenclamida, dissolução, similar, polimorfismo.

ABSTRACT

Some active pharmaceutical ingredients (API) might present polymorphism at any stage of the industry production process. In case it is not characterized and specified, a different polymorph might be erroneously used during the manufacturing procedure. Polymorphisms cause some variations in the physicochemical properties of APIs, especially in solubility. Therapeutic inefficacy was detected in some glyburide drug products, and the occurrence of polymorphs might be one of the possible reasons. This study analyzed five drug products and five APIs. The characteristic pharmaceutical equivalence tests were used for analyzing the drug products. The techniques employed to evaluate the APIs showed no differences in polymorphism, no significant changes in the physicochemical properties or in the intrinsic dissolution rate. However, the dissolution profiles of the drug products, mainly between two similar products A and B, showed significant differences in the f_2 factor values, being 20 and 42, respectively, indicating that these values were related to the occurrence of different excipients, such as mannitol.

Keywords. glyburide, dissolution, similar, polymorphism.

INTRODUÇÃO

A glibenclamida (GLIB), representação estrutural Figura 1, pertencente à segunda geração do grupo das sulfoniluréias, atua estimulando a liberação de insulina através do bloqueio dos canais do potássio nas células β pancreáticas sendo indicada para o controle da glicemia em pacientes portadores da diabetes tipo 2 (dois) ou *diabetes mellitus* não-insulino-dependente¹. Entre as propriedades físico-químicas da GLIB estão: baixa solubilidade em água e éter etílico, solubilidade em dimetilformamida, pouca solubilidade em etanol, metanol e clorofórmio, dissolvendo-se em soluções diluídas de hidróxidos alcalinos². Possui coeficiente de partição octanol / água (log P) 4,8, pKa 5,3³ e ponto de fusão na faixa de: 169-174 °C⁴.

Dependendo do solvente utilizado, a cristalização da GLIB pode dar origem a formas polimórficas e pseudo-polimórficas, as quais são significativamente diferentes com respeito à solubilidade e propriedades de fusão^{5,6}. Um polimorfo, obtido a partir da tentativa de elucidação da transição vítrea pelo aquecimento, resfriamento e reaquecimento, resultou em baixos valores de dissolução e biodisponibilidade em comprimidos⁷. O estudo das propriedades termodinâmicas, de sistemas obtidos a partir da cristalização das formas I e IV, que são as descritas na literatura, quando utilizados diferentes solventes sugerem a existência de outras formas polimórficas⁸.

Teoricamente, os diversos polimorfos possuem diferentes velocidades de dissolução. Em alguns casos a diferença não é significativa, entretanto quando ocorre o oposto, os medicamentos podem tornar-se menos ativos, inativos ou tóxicos, quando existe uma relação direta entre esse parâmetro e a atividade farmacológica⁹. Alguns estudos demonstram que absorção oral da GLIB é dependente da sua formulação¹⁰, e que o comportamento

de diferentes formulações podem apresentar importantes diferenças no desempenho oral e conseqüentemente na biodisponibilidade de medicamento¹¹.

Os dados do Sistema de Gerenciamento de Amostras do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), no período de 2000 a 2008, apontaram que 329 registros das solicitações de análises fiscais continham denúncia de suspeita de ineficácia terapêutica, inclusive cinco medicamentos de GLIB, podendo o polimorfismo ser uma de suas possíveis causas. Portanto, identificou-se a necessidade de aprofundar os estudos sobre a determinação de polimorfos em fármacos.

Neste contexto o objetivo deste trabalho foi a determinação de polimorfos em fármacos, tendo como objeto de estudo a GLIB. Especificamente correlacionar a velocidade de dissolução intrínseca dos fármacos, com os perfis de dissolução dos produtos e paralelamente comparar o fator de similaridade (f_2) dos produtos, assim como avaliar o poder discriminante do teste de dissolução *in vitro* para as diferentes formulações dos produtos de GLIB.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Foram analisados cinco amostras de comprimidos contendo 5 mg de GLIB e os insumos farmacêuticos ativos puros provenientes de dois fabricantes de genérico, dois de similar e o referência. O padrão foi GLIB, Substância Química de Referência da Farmacopeia Brasileira, teor 99,96 %, lote 1018. As análises foram realizadas no Laboratório de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes do Departamento de Química do INCQS/Fiocruz e no Laboratório de Estudo de Estado Sólido do Instituto de Tecnologia em Fármacos de Farmanguinhos/Fiocruz.

Técnicas empregadas

I) Distribuição de tamanho de partículas (Mastersizer Malvern): meio de dispersão composto por água e o agente dispersante Tween 80® (Sigma-Aldrich); tempo de leitura das amostras de 10 segundos e intensidade do laser de 82,7 %. II) Microscopia Óptica (Olympus BX50): foi utilizado um aumento de 500 vezes. III) Varredura Exploratória Diferencial (Mettler Toledo 822): sob atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 80 mL/min e razões de aquecimento de 40 e 5 K/min, no intervalo de temperatura de 25 a 300 K. IV) Difratometria

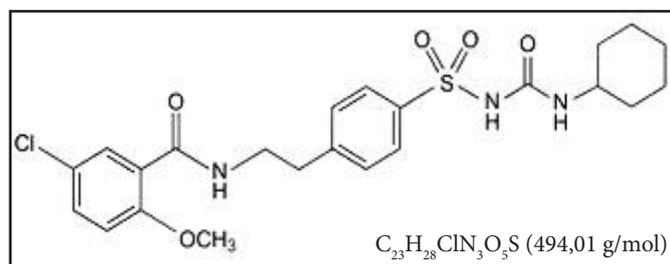


Figura 1. Representação estrutural da Glibenclamida (5-Cloro-N-[2-[4-[[[(cicloexilamino) carbonil]amino]sulfonyl]fenil]etil]-2-metoxibenzamida)

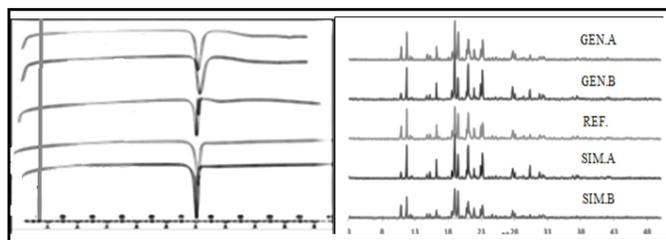


Figura 2. Curvas de Varredura Exploratória Diferencial e de Difratomogramas de Raios X de pós dos fármacos de GLIB

de Raios-X (Bruker D8-Advanced): operação a 40 kV e 40 mA, com velocidade de varredura de 0,05°/segundo no intervalo 2^o de 3 a 50°. V) Ponto de fusão (Büchi B-540): em capilar de vidro para determinação da faixa de fusão pelo método capilar. VI) Termogravimetria (Mettler Toledo 851): sob atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL/min e razão de aquecimento de 10 K/min, no intervalo de temperatura de 25 a 300K. VII) Ensaio de velocidade de dissolução intrínseca dos IFAS (Hanson SR-8), o coeficiente VDI foi determinado de acordo com uma aparelhagem similar à descrita na USP. Para o preparo das pastilhas, aproximadamente 500 mg de cada fármaco foi pesado (Mark 3100) diretamente na matriz do pastilhador (Pastilhador de aço inoxidável Perkin-Elmer). Após a colocação de punção, aplicou-se a força de compressão de uma tonelada pelo tempo de um minuto (Prensa Hidráulica Carver 3912). Esse conjunto, contendo o sólido compactado, foi então, preso à haste do aparato n° 1 (cesta) do dissolutor. A haste é posicionada a 2,5 cm do fundo da cuba, observando à

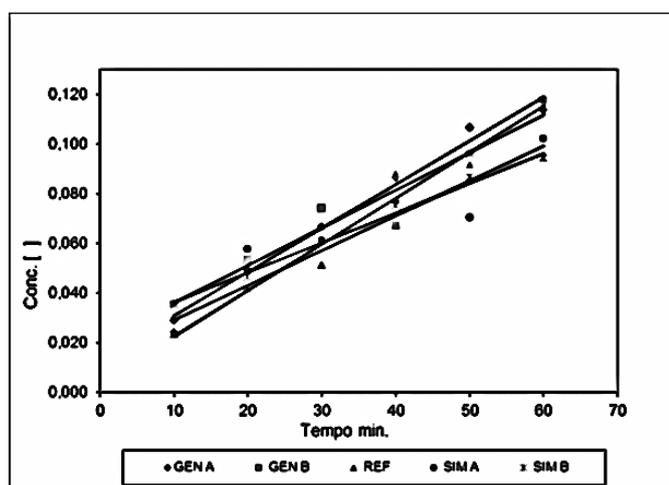


Figura 3. Velocidade de dissolução intrínseca dos fármacos
Equação das retas: GEN A, $y=0,0009x+0,00115$; GEN B, $y=0,0008x+0,0073$; SIM A, $y=0,0008x+0,0063$; SIM B, $y=0,0008x+0,0076$; REF, $y=0,0008x+0,0044$

não formação de bolhas sobre a superfície do material em contato com o líquido. A coleta das amostras foi feita de 20 em 20 minutos durante 120 minutos. Em condições de área superficial constante, os valores de concentração dissolvida devem situar-se sobre uma reta. A inclinação da reta produzida exprime o valor do coeficiente de dissolução intrínseca¹². VIII) Ensaio de dissolução de comprimidos de GLIB (Hanson SR-8) as condições seguidas foram as do ensaio de dissolução e de doseamento de GLIB descrito na FB 2010⁴. Os comprimidos foram adicionados individualmente às cubas de dissolução (com intervalos de um minuto entre as adições) que continham 900 mL de tampão fosfato pH 7,30 \pm 0,02 como meio de dissolução na temperatura de 37,0 \pm 0,5 °C, convenientemente degaseificado. No momento da adição dos comprimidos (tempo zero), inicia-se a agitação do meio mediante pás rotatórias, aparato n° 2, com velocidade pré-fixada de 75 rpm até o tempo limite do ensaio, que no caso, corresponde a 60 minutos. IX) As análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas em um cromatógrafo líquido Dionex composto de detector ultravioleta a 230 nanômetros e injetor automático. O volume injetado foi de 100 μ L. A coluna analítica usada foi Nova-Pak® C8, 4 μ m, (150 x 4,6) mm. A fase móvel foi uma mistura de tampão fosfato monobásico de potássio (Vetec) pH 3,0 (Micronal B474) e acetonitrila (Merck) (47:53), preparada como descrito na FB 2010. Fluxo da fase móvel foi de 1,5 mL/min.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A pesquisa das propriedades físico-químicas através dos testes executados neste trabalho, apontaram ausência de polimorfismo nos fármacos de GLIB. Observando a Figura 2, ao lado esquerdo está o termograma proveniente do ensaio de varredura exploratória diferencial, onde os perfis energéticos das amostras de GLIB foram similares entre si nas condições analíticas utilizada e à direita o difratograma proveniente do ensaio de difratometria de raios-X em pó mostra que as mesmas correspondem à forma cristalina I descrita em Rodríguez et al⁸. Para determinação e identificação de polimorfismo em fármacos, estas técnicas podem estar entre as principais, pois podem confirmar possíveis resultados encontrados.

A velocidade de dissolução intrínseca (VDI), definida como velocidade com que substâncias puras

Tabela 1. Avaliação estatística (teste ANOVA) das curvas de VDI

| tempo | Curva de Velocidade de dissolução intrínseca | | | | | |
|--------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------------|-----------|
| | mg/cm ² .min ⁻¹ Gen1 | mg/cm ² .min ⁻¹ Gen2 | mg/cm ² .min ⁻¹ Sim1 | mg/cm ² .min ⁻¹ Sim2 | mg/cm ² .min ⁻¹ Ref | |
| 20 | 0,0271 | 0,02023 | 0,02023 | 0,02301 | 0,0206 | |
| 40 | 0,04359 | 0,04088 | 0,04157 | 0,03992 | 0,03569 | |
| 60 | 0,06562 | 0,05548 | 0,05413 | 0,0562 | 0,0546 | |
| 80 | 0,08481 | 0,07197 | 0,08835 | 0,07306 | 0,0732 | |
| 100 | 0,09234 | 0,08605 | 0,08825 | 0,08461 | 0,08709 | |
| 120 | 0,11331 | 0,10134 | 0,10183 | 0,10482 | 0,10135 | |
| Anova: fator único | | | | | | |
| RESUMO | | | | | | |
| Grupo | Contagem | Soma | Média | Variância | | |
| mg/cm ² .min ⁻¹ Gen1 | 6 | 0,42677 | 0,0071128333 | 0,001028722 | | |
| mg/cm ² .min ⁻¹ Gen2 | 6 | 0,37651 | 0,062751667 | 0,000881776 | | |
| mg/cm ² .min ⁻¹ Sim1 | 6 | 0,37836 | 0,06306 | 0,000919985 | | |
| mg/cm ² .min ⁻¹ Sim2 | 6 | 0,38162 | 0,063603333 | 0,00089861 | | |
| mg/cm ² .min ⁻¹ Ref | 6 | 0,10134 | 0,062088333 | 0,000952852 | | |
| ANOVA | | | | | | |
| Fonte de Variação | SQ | gl | MQ | F | valor-P | F crítico |
| Entre grupos | 0,000334091 | 4 | 8,35226E-05 | 0,089196501 | 0,985000871 | 2,75871 |
| Dentro dos grupos | 0,023409727 | 25 | 0,000936389 | | | |

se dissolvem numa área superficial constante, é uma técnica que permite caracterizar a solubilidade de uma substância ativa ou excipiente em um determinado meio.

As retas da VDI dos fármacos estão representadas na Figura 3, os interceptos correspondem à fração de substância dissolvida instantaneamente em contato com o meio de dissolução e às inclinações ou VDI aos gradientes de concentrações dissolvidas por tempo. Todos os valores de VDI foram homogêneos ($8,20E-04 \pm 5$ %).

Os valores utilizados para confecção das curvas de VDI foram comparados estatisticamente pelo teste de ANOVA como demonstrado na Tabela 1. Conclui-se que sendo p-valor (0,9850) maior que o nível de significância, não se consegue provar que ao menos uma das médias é diferente das outras.

Uma vez que variações na dissolução podem alterar a eficácia terapêutica de um medicamento, é mais apropriado estudar a velocidade de dissolução intrínseca (VDI) do que estudar a solubilidade do fármaco (uma propriedade de equilíbrio termodinâmico) durante a avaliação da influência do estado sólido no desenvolvimento farmacotécnico e no controle de qualidade⁹. Logo, foi feita

a comparação dos resultados do ensaio de VDI dos IFAs com os de dissolução dos medicamentos.

A comparação de perfis de dissolução é útil nos casos em que se deseja conhecer o comportamento de dois medicamentos antes de submetê-los a estudo de biodisponibilidade relativa/bioequivalência. Desenvolver uma nova formulação requer amplo conhecimento sobre as propriedades físico-químicas do fármaco e dos excipientes empregados no processo de fabricação¹³.

Atualmente, para a Anvisa, os perfis de dissolução comparativos são avaliados apenas utilizando-se o cálculo do fator de similaridade (f_2), que corresponde a uma medida de semelhança entre as porcentagens dissolvidas de ambos os perfis, o valor de (f_2) deve estar compreendido entre 50 a 100¹⁴. Os medicamentos similares A e B apresentaram respectivamente os valores de f_2 iguais a 20 e 42, apontando o quanto os produtos similares estudados têm comportamento próprio quando comparados ao produto referência como demonstrado na Figura 4 e que as alterações em suas formulações podem, em alguns casos, alterar seu comportamento *in vitro*, acarretando falha no teste de equivalência farmacêutica.

Tabela 2. Principais excipientes dos produtos

| Excipiente | GEN B | GEN A | REF | SIM B | SIM A |
|------------------------|-------|-------|-----|-------|-------|
| Manitol (Diluyente) | | | | | x |
| Amido de milho | | | | | |
| Amido pré-gelatinizado | x | x | x | x | |
| Lactose (Diluyente) | | | | | |
| Lubrificantes | x | x | x | x | x |

Quando as VDI da IFAS são testadas em condições que podem proporcionar uma alta solubilidade, como no caso estudado e suas curvas de regressão analíticas não são estatisticamente diferentes, pode ser possível correlacionar com os resultados do ensaio de dissolução de medicamentos, desde que os produtos sejam testados em condições semelhantes as utilizadas para VDI dos IFAS.

No campo da dissolução, a comparação dos perfis de dissolução possui extensa aplicabilidade durante o processo de desenvolvimento do produto, podendo ser usada para estabelecer a similaridade de formas farmacêuticas de dosagem¹⁵.

No que concerne a composição dos produtos Tabela 2, o SIM. A apresentou menor percentual de dissolução, tendo como característica a presença de manitol em substituição à excipientes que poderiam gerar glicose. Alguns autores citam o caso de armazenamento de formulações contendo manitol que é um excipiente que reconhecidamente apresenta polimorfismo no qual favoreceu o endurecimento dos comprimidos, ocasionando uma redução da porcentagem de liberação durante a dissolução¹⁶. Somente após 2003 a ANVISA através da RDC nº 134¹⁷, estabeleceu as bases legais para a adequação dos medicamentos similares já registrados; logo, o resultado encontrado abaixo do especificado para o produto SIM B pode estar relacionado ao seu processo de produção.

CONCLUSÃO

O estudo de polimorfismo em fármacos é um processo que envolve várias técnicas analíticas, as mesmas se complementam sendo muito frequente a necessidade de duas ou mais como as empregadas neste trabalho, para uma determinação com boa margem de segurança, contudo não foram determinados polimorfos nos fármacos de GLIB utilizados neste estudo.

Os valores determinados das velocidades de dissolução intrínseca dos fármacos de GLIB estudados

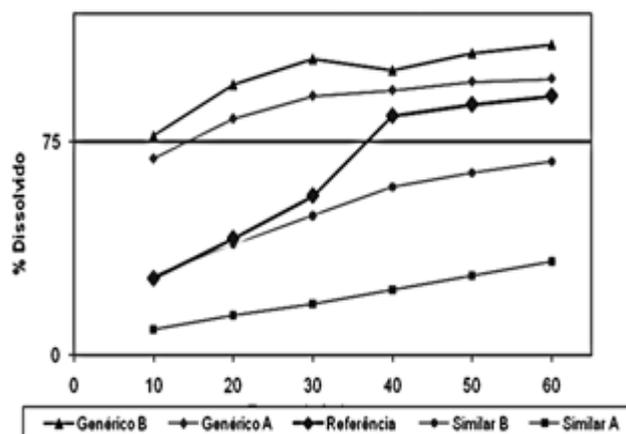


Figura 4. Perfil de dissolução dos medicamentos: Percentagem dissolvida de GLIB em 60 minutos: GEN B= 109 %, GEN A= 97 %, REF= 91 %, SIM B= 68 %, SIM A= 33 %

foram praticamente iguais e correlacionando com os resultados distintos dos perfis de dissolução dos produtos é possível determinar que a dissolução *in vitro* destes produtos é dependente das formulações, dos diferentes processos de produção industrial. e provavelmente das condições do teste de dissolução empregado, principalmente, no caso dos medicamentos similares.

A determinação de polimorfismo em medicamentos, na forma de produto final industrializado, torna-se de difícil interpretação devido a presença de excipientes. Exceção para algumas monografias presentes atualmente em literatura.

O ensaio de dissolução para comprimidos de GLIB da FB apresentou alto poder discriminatório, quando utilizado para comparação dos produtos estudados, com o produto referência, no teste do fator de similaridade (f_2), para determinação da equivalência farmacêutica dos produtos.

AGRADECIMENTOS

À Fiocruz / Farmanguinhos / Laboratório de estudo de estado sólido (LESS) pelo apoio na realização deste trabalho.

À Fiocruz / INCQS pela oportunidade e incentivo.

REFERÊNCIAS

1. Rang HP, Dale MM, Ritter JM. Farmacologia. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. p.323-329.
2. Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 14.ed. Whitehouse Station: Merck Research Laboratories, 2006. p.773.

- Moffat AC, Osselton MD, Widdop B. Clarke's analysis of drugs and poisons. 3.ed. London: Pharmaceutical Press. 2004, v.2. p.1078.
- Farmacopéia Brasileira. 5.ed. Brasília: ANVISA, 2010. v.2, p.442-5.
- Suleiman MS, Najib NM. Isolation and Physicochemical characterization of solids forms of glibenclamide. *Int J Pharm*. 1989;50:103-9.
- Hassan MA, AL-hindawi MK, Sallam E, Sheikh Salem M. Preparation and characterization of a new polymorphic form and a solvate of glibenclamide. *Acta Pharm Hung*. 1997; 67:81-8.
- Panagopoulou-KaplanI A, Malamataris S. Preparation and characterization of a new insoluble polymorphic form of glibenclamide. *Int. J. Pharm*. 2000 ; 19:239-46.
- Rodríguez MS, Luna J, Carlucci A, Bregni C. Relación de estabilidad termodinámica relativa entre polimorfos de glibenclamida. *Acta Farm Bonaer*. 2004 ; 23(2):169-75.
- Cuffini SL, Pitaluga AJR, Tombari DG. Polimorfismo em Fármacos. *In: Storpirtis S, Gonçalves JE, Chiann C, Gai MN. Biofarmacotécnica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p.21-29.
- Neugebauer G, Betzien G, Hrstka V, Kaufman B, Vonmöllendorff E, Abshagen U. Absolute bioavailability and bioequivalence of glibenclamide (Semi-Euglucon N). *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol*. 1985;23(9):453-60.
- Blume H, Ali SL, Siewert M. Pharmaceutical quality of glibenclamide products: Multinational post market comparative study. *Drug Dev Ind Pharm*. 1993; 19(20):2713-41.
- United States Pharmacopeia. 32. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, v.1, p.549-552, 2009.
- Aulton ME. Delineamento de Formas Farmacêuticas: 2.ed. Rio Grande do Sul: Artmed, 2005. p. 25.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 31, de 11 de agosto de 2010. Dispõe sobre a realização dos Estudos de Equivalência Farmacêutica e de Perfil de Dissolução Comparativo. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 12. Ago. 2010. Nº 154, p. 36-8
- O'hara T, Dunne A, Butler J, Devane J. A review of methods used to compare dissolution profile data. *Pharm Sci Technol Today*. 1998; 1:214-23.
- Zhang G, Law D, Schmitt E, Qiu Y. Phase transformation considerations during process development and manufacture of solid oral dosage forms. *Adv Drug Deliv Rev*. 2004; 56:371-90.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 134, de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre a adequação dos medicamentos já registrados. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, Jun. 2003. p.47-8.

Tendência do perfil dos consumidores de azeite de oliva

Tendency of the olive oil consumers profile

RIALA6/1581

Lillian Bittencourt DUTRA¹, Maria Sônia Lopes DUARTE², Eliana Carla Gomes de SOUZA^{2*}

*Endereço para correspondência: ²Departamento de Nutrição e Saúde, Universidade Federal de Viçosa. Av. P.H. Rolfs, s/n, Viçosa, MG, Brasil, CEP: 36570-000. Tel: 31 3899-1278. E-mail: eliana.gomes@ufv.br

¹Faculdade de Minas – FAMINAS, Muriaé, MG.

Recebido: 08.05.2013 - Aceito para publicação: 03.12.2013

RESUMO

O presente estudo avaliou a tendência do perfil de 167 consumidores de azeite de oliva por meio de uma pesquisa de mercado, realizada em abril de 2013 em supermercados de Muriaé (MG), Brasil. Foi conduzida uma pesquisa descritiva, quantitativa por meio de questionário estruturado em que visava investigar os seguintes parâmetros: sexo, idade, escolaridade, renda familiar, história pessoal de doenças crônicas (hipertensão arterial, diabetes mellitus, dislipidemias, entre outras), bem como o tipo, a marca e a quantidade de azeite consumida e a motivação para o seu consumo. Dos 171 entrevistados, 167 (98 %) relataram o consumo deste produto. Ao traçar o perfil dos consumidores foi verificado que a maioria (61 %) era do sexo feminino, com idade entre 21 e 40 anos, com renda de 1 a 3 salários mínimos, nível médio de escolaridade, ausência de histórico de doenças crônicas, consumo diário de 7,89 mL de azeite puro e 3,54 mL do composto e tendo a motivação “gostar de azeite” para o consumo. Com base nos resultados obtidos, se faz importante direcionar estratégias para estimular o aumento e adequação do consumo de azeite, considerando que este produto pode contribuir na prevenção e/ou redução de doenças crônicas.

Palavras-chave. azeite de oliva, consumidor, pesquisa de mercado.

ABSTRACT

The present study evaluated the tendency of the profile of 167 olive oil consumers by means of a market survey, which was carried out at supermarkets of Muriaé – MG, Brazil, in April 2013. A descriptive and quantitative survey was performed using a structured questionnaire. In this context, the following parameters were investigated: sex, age, education, household income, personal history of chronic diseases (hypertension, diabetes, dyslipidemias, among others); type, brand and quantity of olive oil consumed and motivation for consumption. From among 171 consumers, 167 (98 %) reported that they consume the product. In outlining the consumer profile, the majority was female (61 %), aged between 21 and 40 years, income between one and three minimum wages, secondary education, no history of chronic diseases, daily consumption of 7.89 mL of pure olive oil and 3.54 mL of olive oil/soybean oil blend, and “appreciates olive oil” was the motivation for consumption. Based on the obtained data, it is important to establish the strategies to stimulate the increase and the adequacy in consuming olive oil, considering the attributes of this product for preventing and/or reducing the chronic diseases.

Keywords. olive oil, consumer, market survey.

INTRODUÇÃO

No Brasil, o consumo de azeite de oliva tem aumentado 13,8 % nos últimos anos, de acordo com a Pesquisa de Orçamento Familiar (2008-2009)¹. Diante dos diferentes tipos de azeite faz-se necessário o conhecimento por parte do consumidor para obtenção do produto adequado.

De acordo com a ANVISA², existem três tipos de azeite. O azeite de oliva é obtido dos frutos da oliveira (*Olea europaea* L.), excluídos os óleos obtidos através de solventes ou processos de reesterificação e/ou qualquer mistura de outros óleos. O azeite de oliva virgem, por sua vez, se obtém somente por processos mecânicos ou outros meios físicos, em condições térmicas que não produzam alteração do azeite, e que não tenha sido submetido a outros tratamentos, além da lavagem, decantação, centrifugação e filtração. Já o óleo de bagaço de oliva refinado é aquele obtido pelo tratamento do bagaço de frutos da oliveira com solventes ou outros tipos de tratamentos físicos, excluídos os óleos obtidos por reesterificação ou qualquer mistura de outros óleos. Existem ainda os azeites mistos ou compostos que são obtidos a partir da mistura de azeite de oliva e outro óleo vegetal.

Na composição do azeite de oliva são encontrados 2,5 e 6 vezes mais ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) que em alimentos ricos nesses ácidos graxos como castanha e abacate, respectivamente³.

Os benefícios do consumo do azeite de oliva estão diretamente relacionados aos MUFAs presentes, como o ácido oléico também a baixa concentração de ácidos graxos saturados³. Tal composição favorece o controle do colesterol, pois pode ajudar a reduzir o LDL - colesterol no sangue, mantendo o nível de HDL - colesterol, sendo assim, os MUFAs estão associados à redução de incidência de doenças cardíacas evidenciado pela população adepta da dieta mediterrânea, a qual tem o azeite como componente importante. Esta população apresenta baixo índice de mortalidade e morbidade por doenças cardiovasculares⁴.

A Food and Drug Administration (FDA)⁵ sugere que os consumidores podem reduzir seu risco de doença coronariana se consumirem gorduras monoinsaturadas a partir de azeite de oliva, substituindo os alimentos ricos em gordura saturada e a IV Diretriz Brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose⁶ também faz uma recomendação diária de ácido graxo

monoinsaturado que deve ser de 20 % das calorias totais da dieta.

O estudo do comportamento dos consumidores é essencial para o entendimento do consumo ou não de um determinado produto e quais fatores estão envolvidos no processo de compra de um alimento. Assim, as pesquisas de mercado são extremamente importantes, pois permitem a identificação do nível de conhecimento sobre um determinado produto, entender o que leva ao seu consumo e quais fatores estão envolvidos no processo de compra de um alimento. Assim, pesquisa de mercado tem se mostrado útil na elucidação do comportamento dos consumidores de alimentos e têm contribuído para identificar as preferências, hábitos e costumes, o perfil socioeconômico, imagem de marca, intenções de compra e análise de participação do mercado, entre outras características^{7,8}.

Espera-se com os conhecimentos gerados neste estudo, a obtenção de informações que permitam o conhecimento do perfil dos consumidores de azeite, no município de Muriaé-MG. A ação visa o conhecimento de um padrão de consumo do azeite para estabelecimento de estratégias que possam aumentar o consumo do produto com conseqüente benefício à saúde.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo caracteriza-se por ter um delineamento do tipo transversal, descritivo, quantitativo e não experimental desenvolvido com consumidores, de ambos os gêneros, em supermercados do município de Muriaé-MG.

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)⁹, a estimativa da população residente em Muriaé era de 102.074 habitantes, em 2012.

A coleta dos dados foi realizada utilizando uma amostra intencional aleatória, estatisticamente significativa, composta de 171 consumidores, abordados em dois supermercados da região central da cidade, no período de 01 a 30 de abril de 2013. Para a definição do tamanho da amostra utilizou-se um nível de confiança de 95 % e uma margem de erro $E = 0,06$. Devido ao não conhecimento do comportamento do mercado de azeite na região, estimou-se uma variabilidade máxima de 50 % (onde p e q estimados são iguais a 0,5). Assim, para a população do município analisado, o tamanho da amostra foi definido pela equação abaixo¹⁰.

$$n = qpZ^2 / E^2$$

onde:

n = tamanho da amostra;

Z = 1,96 (abscissa da normal a um nível de confiança de 95 %);

p = 0,5 (variabilidade máxima estimada);

q = 1 - p ; e

E = 0,06 (nível de precisão).

Para coleta dos dados, utilizou-se um questionário estruturado, com linguagem simples, desenvolvido especificamente para este estudo com base na literatura existente¹¹. O questionário foi composto por duas etapas, sendo a primeira formada por questões socioeconômicas: sexo, faixa etária, renda familiar, escolaridade e número de pessoas por família. A segunda etapa continha questões sobre o perfil de consumo do azeite: quantidade por pessoa, tipo e marca do azeite, motivação para o consumo e número de pessoas na família que o consome. O mesmo ainda incluiu perguntas sobre história pessoal de doenças (hipertensão arterial, diabetes mellitus, dislipidemias). Os dados foram coletados por entrevistadores previamente treinados.

Um teste piloto foi realizado com 20 participantes para adequação do questionário.

A quantidade diária de azeite consumida (mL) pelo entrevistado foi calculada dividindo-se o consumo mensal de azeite pelo número de pessoas da família que utilizam o produto, dividindo ainda pelo número de dias no mês (30 dias).

Após aplicação dos questionários, eles foram conferidos, numerados e tabulados, visando à posterior análise e interpretação dos dados. Utilizou-se os softwares *SigmaStat* versão 2.03 e o *Statistical Package for the Social Sciences* – SPSS for Windows versão 13.0.

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Viçosa (UFV), protocolo 230.459/2013. Os consumidores que aceitaram participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme Declaração de Helsinque.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As características socioeconômicas e o histórico familiar para doenças crônicas da população encontram-se na Tabela 1.

O predomínio do sexo feminino pode se justificar pelo fato de que o número de mulheres responsáveis

Tabela 1. Características socioeconômicas e o histórico familiar para doenças crônicas de consumidores de azeite em Muriaé-MG/2013

| Variáveis | N | % |
|-----------------------------|-----|------|
| Sexo | | |
| Masculino | 65 | 39,0 |
| Feminino | 102 | 61,0 |
| Faixa etária | | |
| < 21 anos | 8 | 5,0 |
| 21 – 40 anos | 77 | 47,0 |
| 41 – 60 anos | 60 | 36,0 |
| ≥ 61 anos | 20 | 12,0 |
| Escolaridade | | |
| Ensino Fundamental | 35 | 22,0 |
| Ensino Médio | 78 | 48,0 |
| Ensino Superior | 49 | 30,0 |
| Renda familiar | | |
| <1 salário mínimo | 12 | 8,0 |
| 1-3 salários mínimos | 89 | 55,0 |
| 3-5 salários mínimos | 40 | 25,0 |
| >5 salários mínimos | 18 | 12,0 |
| Histórico pessoal da doença | | |
| Diabetes mellitus | 6 | 4,0 |
| Hipertensão arterial | 19 | 12,0 |
| Hipercolesterolemia | 24 | 15,0 |
| Outras | 5 | 3,0 |

pela compra em mercados é maior que o de homens¹². Observou-se maior prevalência da faixa etária entre 21 e 40 anos de idade e menor abaixo de 21 anos, caracterizando o mercado de azeite pela prevalência de consumidores adultos. Cobra¹¹ afirma que a idade da pessoa exerce forte influência no seu tipo de consumo. Em cada faixa etária, o grupo de consumidores têm um estilo de vida e isso predispõe a um tipo de consumo.

Houve predominância para escolaridade de ensino médio, para renda, a faixa salarial entre 1 a 3 salários mínimos e para histórico familiar de doença, hipercolesterolemia.

Do total dos entrevistados ($n=167$), 98 % utilizavam o azeite na refeição, os demais (2 %) não faziam o uso do mesmo, destes, 75 % utilizavam azeite puro e 25 %, azeite composto. O consumo diário de azeite puro, per capita, foi de 7,89 mL e de composto 3,54 mL. O azeite declarado puro deve conter 100 % de azeite de oliva e o azeite composto possui uma mistura de azeite de oliva e óleos vegetais². O consumo per capita de azeite (puro e não composto) no Brasil é baixo, 200 mL por ano, e muito distante daquele observado na

Espanha e Itália (12 L/ano) e na Grécia (26 L/ano)¹³. No presente estudo, a ingestão per capita anual encontrada foi maior (2,85 L), em relação ao Brasil, pois, a amostra utilizada foi de consumidores de azeite. A FDA⁵ sugere que ingerir cerca de duas colheres de sopa (23 gramas) de azeite de oliva diariamente pode reduzir o risco de doença cardíaca coronária devido à gordura monoinsaturada do azeite.

De acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária¹³, durante muito tempo o brasileiro acostumou-se a consumir mesclas de azeite (azeite de oliva com outros óleos vegetais, tais como óleo de soja, óleo de arroz, óleo de milho, etc.) e, assim, ações promocionais sobre o produto (degustações e distribuições de azeites em supermercados e feiras de exposições, propaganda na mídia televisiva, concursos gastronômicos, etc.) são importantes para que ocorra o aumento de consumo de azeite no Brasil.

Nas entrevistas foram citadas 20 marcas diferentes de azeite consumido, entre azeite composto e puro.

As motivações citadas que induziram à aquisição do azeite foram: porque gosta (64 %), porque é saudável (31 %) e por recomendação de um profissional de saúde (5 %). Pode-se inferir que os benefícios do azeite à saúde ainda não são totalmente conhecidos pelos consumidores, o que minimiza a utilização correta por aqueles cujo consumo poderia fazer parte de uma terapia. É questionável também, se o pouco consumo por recomendação de um profissional de saúde é devido a pouca importância dada a este alimento ou se não houve adesão à recomendação, ou ainda se não houve a procura pelo profissional.

De acordo com a Figura 1, houve predominância do consumo de azeite puro em todas as faixas de renda, sendo maior na faixa superior a 5 salários mínimos (94,44 %). Entre os indivíduos com 1 a 3 salários mínimos destaca-se o grande consumo de azeite composto (37,9 %), dessa forma, pode-se inferir que o alto custo do azeite pode ser um fator limitante na sua aquisição. Em relação à escolaridade, também se observa um maior consumo de azeite puro em todos os níveis, porém, destaca-se o maior consumo no ensino superior (90,56 %) indicando que o nível de conhecimento e/ou acesso às informações pode ter influenciado no aumento de consumo do mesmo.

Observou-se também que a maioria dos consumidores de azeite entrevistados não possuía histórico pessoal de doença crônica (63,74 %) e para os que possuíam (36,26 %) destaca-se o consumo de azeite puro (69,35 %). Entre os consumidores com doença crônica que utilizavam azeite puro, houve predomínio de hipercolesterolêmicos (41,86 %) e hipertensos (37,21 %). O azeite puro contém 63 % de ácido graxo oléico e o azeite composto possui teor reduzido desse ácido graxo¹⁴ e, vale ressaltar, que vários estudos comprovam o benefício do ácido oléico para a saúde¹⁵. Desta forma, justifica-se o incentivo ao aumento do consumo de azeite puro e à leitura dos rótulos. Seria importante também a fiscalização do produto pela Vigilância Sanitária para evitar adulteração já que o mesmo possui custo elevado e, dessa forma, haveria maior segurança em relação à composição e aos benefícios que o produto possui.

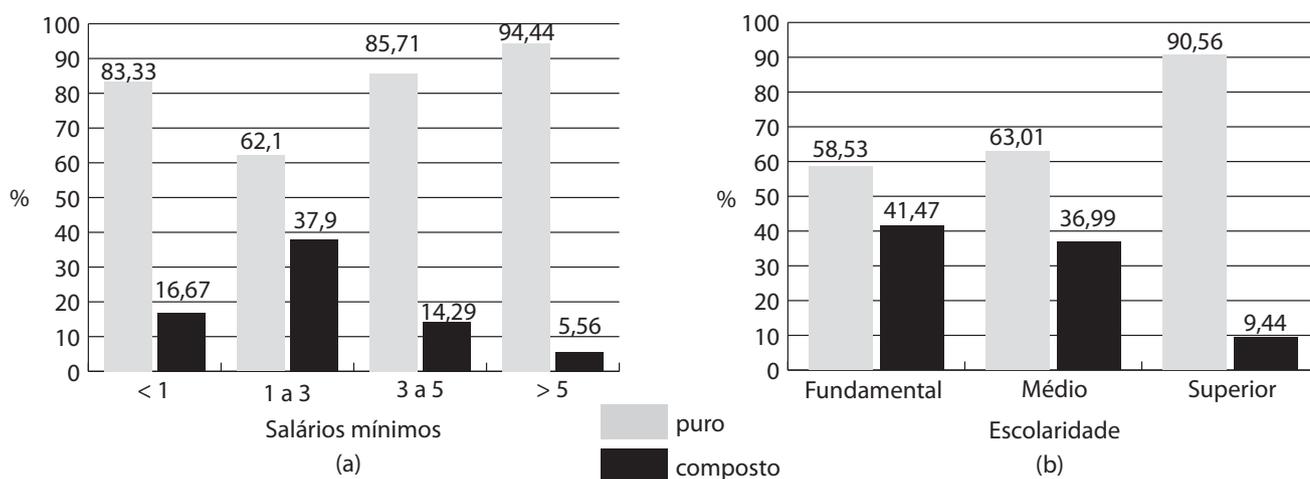


Figura 1. Relação do tipo azeite de oliva consumido com a renda (a) e com a escolaridade (b) dos consumidores, Muriaé-MG, 2013

CONCLUSÃO

A maioria dos entrevistados consumia azeite puro e o consumo se relacionou com a escolaridade e faixa de renda indicando que o nível de conhecimento pode influenciar o consumo do mesmo. Os benefícios do azeite para a saúde ainda não são totalmente conhecidos pelos consumidores. Com base nos resultados obtidos, se faz importante direcionar estratégias para estimular o aumento e adequação do consumo de azeite, considerando que os ácidos graxos monoinsaturados contidos no mesmo podem contribuir para redução de doenças crônicas.

REFERÊNCIAS

1. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística -IBGE. Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2008-2009: Análise da Disponibilidade Domiciliar de Alimentos e do Estado Nutricional no Brasil. Rio de Janeiro; 2010.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução-RDC no-270, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal (azeites). Disponível em: [http://www.anvisa-resolucao-rdc270-de-22-09-2005].
3. Pimentel I, Magnoni D. Azeite de Oliva – composição em ácidos graxos. 2007.(acesso 2013 Abr 12). Disponível em: [http://www.nutricaoclinica.com.br].
4. Buckland G, Mayén AL, Agudo A, Travier N, Navarro C, Huerta JM, et al. Olive oil intake and mortality within the Spanish population (EPIC-Spain) *Am J Clin Nutr*. 2012;96(1):142-9.
5. Food and Drug Administration. Letter Responding to Health Claim Petition dated August 28, 2003: Monounsaturated Fatty Acids from Olive Oil and Coronary Heart Disease. November 1, 2004.
6. Sposito AC, Caramelli B, Fonseca FAH, Bertolami MC. IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq Bras Cardiol*. 2007;88(Supl. I):2-19.
7. Serrano Domínguez C. Retailing establishments: a competitive analysis of commercial formats from the consumer's profile and perceptions. *J Retail Cons Serv*. 2007; 14(5): 297-308.
8. Verbeke W, Vermeir I, Brunso K. Consumer evaluation of fish quality as basis for fish market segmentation. *Food Qual Prefer*. 2007;18(4):651-61.
9. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística -IBGE. Infográficos: evolução populacional e pirâmide etária. Disponível em: [http://cidades.ibge.gov.br/painel/populacao.php?lang=&codmun=314390&search=minas-gerais|muriae|infograficos:-evolucao-populacional-e-piramide-etaria].
10. Triola, MF. Introdução a Estatística. São Paulo: Editora LTC; 2005.
11. Cobra M. Administração de Marketing no Brasil. Rio de Janeiro: Editora Campus; 2006.
12. Arruda AC. Perfil dos consumidores de café de Viçosa-MG: Um estudo exploratório. *In: V Simpósio de Pesquisa de Café no Brasil*. 2007. Águas de Lindoia.
13. EMBRAPA. Embrapa Clima Temperado. Cultivo de oliveira (*Olea europaea* L.). (Acesso 2013 Mai 2). Disponível em: [http://www.cpact.embrapa.br/publicacoes/catalogo/tipo/sistemas/sistema16_novo/11_mercados_e_comercializacao.htm].
14. Vieira FCV, Pierre CT, Castro HF. Influência da composição em ácidos graxos de diferentes óleos vegetais nas propriedades catalíticas de uma preparação comercial de lipase pancreática. *In: IV Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica*. 2003; p.1-6.
15. Santos RD, Gagliardi ACM, Xavier HT, Magnoni CD, Cassani R, Lottenberg AMP, et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz sobre o consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular. *Arq Bras Cardiol*. 2013;100(1Supl.3):1-40.

Compostos bioativos e atividade antioxidante de pseudofrutos de caju arbóreo do Cerrado

Bioactive compounds and antioxidant activity of arboreal cashew pseudo-fruit from Cerrado

RIALA6/1582

Maressa Stephanie Ovidio ALVES, Aline Medeiros ALVES, Maria Margareth Veloso NAVES*

*Endereço para correspondência: Laboratório de Nutrição Experimental, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Goiás (UFG). Rua 227, quadra 68, Leste Universitário, Goiânia, GO, CEP 74605080. Tel: 62 3209-6270. E-mail: mmmvnaves@gmail.com
Recebido: 14.12.2012 - Aceito para publicação: 18.10.2013

RESUMO

Este trabalho analisou a composição centesimal, o conteúdo de vitamina C e de compostos fenólicos, e avaliou a atividade antioxidante de pseudofrutos de caju arbóreo do Cerrado, provenientes de três regiões do estado de Goiás. Os pseudofrutos apresentaram elevados teores de umidade (superiores a 80 %) e baixos teores de proteínas, lipídios, cinzas e carboidratos totais. Os pseudofrutos das regiões de Faina e Santa Terezinha podem ser considerados ricos em vitamina C. Os teores de compostos fenólicos observados nos pseudofrutos foram superiores ao de frutas como cajá, abacaxi e tamarindo. Estes compostos apresentaram atividade antioxidante relevante pelo método DPPH, e o consumo do pseudofruto de caju arbóreo pode ser recomendado como fonte complementar de antioxidantes dietéticos.

Palavras-chave. *Anacardium othonianum* Rizz., composição centesimal, vitamina C, fenólicos, antioxidante.

ABSTRACT

This study aimed to analyze the chemical composition, the vitamin C and total phenolic contents and the antioxidant activity of arboreal cashew pseudo-fruits collected from three regions of the state of Goiás, Brazil. The pseudo-fruits showed high moisture content (above 80 %) and low contents of protein, lipid, ash and total carbohydrates. The pseudo-fruits from Faina and Santa Terezinha's regions might be considered rich in vitamin C. The phenolic contents were higher than those found in fruits like yellow mombin (cajá), pineapple and tamarind. These compounds showed significant antioxidant activity by DPPH methodology. Therefore, the consumption of arboreal cashew pseudo-fruit might be recommended as an additional source of dietary antioxidants.

Keywords. *Anacardium othonianum* Rizz., proximate composition, vitamin C, phenolics, antioxidant.

INTRODUÇÃO

Estudos evidenciam que o consumo regular de frutas, legumes e verduras reduzem o risco de doenças inflamatórias, cardiovasculares e alguns tipos de câncer¹. Sugere-se, na literatura, que essa associação se deve à abundância de substâncias antioxidantes encontradas nesses alimentos¹.

A vitamina C tem papel relevante na saúde humana, pois está envolvida na formação de tecido conjuntivo, produção de hormônios e anticorpos, e proteção antioxidante do organismo². Outras substâncias bioativas, como os compostos fenólicos e os carotenoides, também apresentam atividade antioxidante, podendo proteger o organismo contra os danos oxidativos e, consequentemente, prevenir o surgimento de diversas doenças³. Mais de 90 % do aporte dessas substâncias é proveniente das frutas, legumes e verduras^{2,3}.

O caju arbóreo do Cerrado (*Anacardium othonianum* Rizz.) possui duas partes: o fruto verdadeiro (noz acinzentada e reniforme) e o pseudofruto - caracterizado como pedúnculo avermelhado de polpa suculenta, de sabor doce e levemente ácido, que apresenta baixa densidade energética e de macro e micronutrientes⁴. Apesar da possível contribuição do caju arbóreo como fonte de vitamina C e compostos fenólicos, a escassez de trabalhos sobre o assunto revela a necessidade de mais investigações sobre este fruto nativo. Assim, este trabalho teve o objetivo de analisar a composição centesimal e o conteúdo de vitamina C e de compostos fenólicos totais, e avaliar a atividade antioxidante do pseudofruto do caju arbóreo do Cerrado.

MATERIAL E MÉTODOS

Aquisição dos frutos e preparo das amostras

Os frutos de caju arbóreo foram adquiridos em três regiões localizadas no estado de Goiás, nos municípios de Santa Terezinha (14° 26' 16" S, 49° 42' 21" O), Faina (15° 26' 45" S, 50° 21' 39" O) e Goianésia (15° 19' 1" S, 49° 7' 1" O), no período de agosto a setembro de 2011. Os frutos foram transportados em caixas térmicas com gelo, separados em embalagens opacas com a identificação do local de origem, e armazenados em freezer à temperatura de -40 °C. As castanhas foram manualmente separadas dos pseudofrutos e descartadas, e os pedúnculos (pseudofrutos) foram triturados e homogeneizados

ainda congelados em processador de alimentos imediatamente antes de cada análise.

Determinação da composição centesimal

A composição centesimal do caju arbóreo foi determinada por meio das análises de umidade em estufa de esterilização a 105 °C até obtenção de peso constante⁵; nitrogênio total, segundo o método de micro-kjeldahl⁵ e conversão em proteína bruta utilizando-se o fator 6,25; lipídios totais, extraídos por meio da técnica de Bligh e Dyer⁶ e resíduo mineral fixo, por incineração em mufla a 550 °C⁵. Os carboidratos foram estimados por diferença, subtraindo-se de 100 os valores obtidos para umidade, proteínas, lipídios e cinzas. O valor energético total das amostras foi estimado considerando-se os fatores de conversão de Atwater de 4, 4 e 9 kcal.g⁻¹ para proteína, carboidrato e lipídios, respectivamente.

Determinação de vitamina C

A quantificação da vitamina C foi realizada segundo método padrão da AOAC⁵, com modificações. Homogeneizou-se 25 g de amostra em 50 mL de solução de ácido oxálico 2 %, e retirou-se uma alíquota de 10 g. Esta foi diluída a 50 mL com solução de ácido oxálico 2 % e filtrada. Uma alíquota de 2 mL foi então retirada e titulada com 2,6-diclorofenolindofenol 0,025 %, sendo o ponto de viragem detectado visualmente. Antes da titulação, elevou-se o volume de alíquota de análise com 10 mL de ácido oxálico 2 %, para melhor visualização do ponto de viragem. A solução de 2,6-diclorofenolindofenol foi padronizada pela titulação de 1 mg de ácido ascórbico P.A.

Preparo dos extratos

Os extratos foram obtidos a partir de 10 g de amostra fresca, pesados em tubos falcon e extraídos sequencialmente com 20 mL de metanol (50 %) em temperatura ambiente, sob agitação, por 30 minutos. Os tubos foram centrifugados a 7500 rpm, por 15 minutos, e o sobrenadante foi recolhido. Posteriormente, adicionou-se ao resíduo 20 mL de acetona (70 %), à temperatura ambiente, e os tubos foram agitados por 30 minutos, centrifugados novamente e o sobrenadante foi recolhido. Os sobrenadantes da extração com metanol e acetona foram combinados em balão volumétrico e adicionados de água até completar o volume de 50 mL⁷. Este extrato foi utilizado para determinar o conteúdo de fenólicos totais e a atividade antioxidante.

Tabela 1. Composição centesimal de pseudofrutos de caju arbóreo (*Anacardium othonianum* Rizz.) provenientes de três regiões do estado de Goiás

| Componente (g.100 g ⁻¹) | Santa Terezinha | Faina | Goianésia | Média das três regiões |
|-------------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------|
| Umidade | 83,87 ± 0,57 ^b | 86,44 ± 0,17 ^a | 82,73 ± 0,68 ^b | 84,34 ± 1,71 |
| Proteína | 1,34 ± 0,01 ^a | 1,59 ± 0,28 ^a | 1,55 ± 0,30 ^a | 1,42 ± 0,22 |
| Lipídio | 0,51 ± 0,01 ^{ab} | 0,64 ± 0,05 ^a | 0,49 ± 0,08 ^b | 0,55 ± 0,08 |
| Resíduo mineral fixo | 0,23 ± 0,00 ^a | 0,26 ± 0,02 ^a | 0,26 ± 0,01 ^a | 0,25 ± 0,02 |
| Carboidratos totais | 14,06 ± 0,57 | 11,07 ± 0,76 | 14,97 ± 1,29 | 13,43 ± 2,03 |
| VET (kcal.100 g ⁻¹) | 66,14 | 56,44 | 70,53 | 64,37 |

Valores constituem média ± desvio-padrão. ^{a,b}Letras diferentes em uma mesma linha representam diferenças significativas (p<0,05) entre médias. VET: Valor energético total

Determinação de fenólicos totais

A determinação de fenólicos totais foi conduzida de acordo com o procedimento descrito por Singleton e Rossi⁸. Uma alíquota de 0,25 mL dos extratos foi misturada com 0,25 mL do reagente Folin-Ciocalteu e 2,5 mL de água destilada. Após cinco minutos à temperatura ambiente, 0,25 mL de solução saturada de carbonato de sódio (Na₂CO₃) foi adicionada e a mistura mantida à temperatura ambiente, com luminosidade controlada, durante 60 minutos. A absorbância foi medida a 725 nm, em espectrofotômetro UV/Visível (Jasco, V-630). Os resultados foram expressos como mg equivalente de ácido gálico por 100 g de fruto fresco (mg EAG.100 g⁻¹).

Determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi avaliada por meio da capacidade dos antioxidantes, presentes nas amostras, em sequestrar o radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), conforme o método descrito por Brand-Williams et al⁹. A análise foi feita adicionando-se a 0,1 mL dos extratos, 3,9 mL da solução de DPPH. A solução de DPPH foi usada como controle. Após a reação, foi realizada a leitura da absorbância a 517 nm, em espectrofotômetro UV/Visível (Jasco, V-630). As absorbâncias (Abs) das diluições e da solução controle foram utilizadas no cálculo da porcentagem de inibição (I %) de cada amostra, de acordo com a seguinte equação: $I \% = [(Abs \text{ (controle)} - Abs \text{ (diluição)}) / Abs \text{ (controle)}] \times 100$.

Para o cálculo da porcentagem de inibição, utilizou-se a concentração das diluições necessárias para resultar em um percentual de inibição de 50 % (EC50). Os valores de EC50 foram expressos em g de fruto.g⁻¹ DPPH.

Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste para comparação de médias (Tukey a 5 % de probabilidade).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A umidade dos frutos (Tabela 1) foi de 84 g.100 g⁻¹, com valor mais elevado para pseudofrutos provenientes da região de Faina. Martins et al¹⁰ investigando pseudofrutos de cajuzinho-do-cerrado, provenientes das regiões de Faina e Hidrolândia, observaram valor médio de umidade de 84,99 g.100 g⁻¹, similar ao encontrado no presente estudo.

O teor médio de proteínas foi de 1,42 g.100 g⁻¹, valor superior ao encontrado por Silva et al⁴, de 1,18 g.100 g⁻¹. Observou-se baixo teor de lipídios nos pseudofrutos estudados, embora exista diferença significativa (p<0,05) entre o teor de lipídios das regiões de Faina e Goianésia (Tabela 1). Silva et al⁴ relataram teores médios de lipídios de 0,63 g.100 g⁻¹. A quantidade de resíduo mineral fixo foi similar entre as três regiões e inferior ao valor médio (0,33 g.100 g⁻¹) encontrado por Silva et al⁴.

Devido ao alto teor de umidade, baixa quantidade de proteínas, lipídios e carboidratos, o valor energético total dos pseudofrutos foi reduzido (entre 56 e 70 kcal. 100 g⁻¹) o que representa apenas 2 % a 3 % da necessidade energética de um indivíduo adulto saudável, com dieta de 2000 kcal. Este baixo valor calórico permite a introdução dos pseudofrutos *in natura* e sob diversas preparações, em uma dieta saudável, sem aumento considerável do consumo energético.

O conteúdo de vitamina C dos pseudofrutos de caju variou significativamente entre as três regiões, com valor

Tabela 2. Teor de vitamina C, compostos fenólicos e atividade antioxidante de pseudofrutos de caju arbóreo (*Anacardium othonianum* Rizz.) provenientes de três regiões do estado de Goiás

| Parâmetro | Santa Terezinha | Faina | Goianésia | Média das três regiões |
|--------------------------------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------|
| Vitamina C (mg.100 g ⁻¹) | 38,7 ± 0,0 ^b | 68,6 ± 2,2 ^a | 24,5 ± 2,2 ^c | 43,9 ± 19,5 |
| Fenólicos totais (mg EAG.100 g ⁻¹) | 267,3 ± 10,8 ^b | 273,5 ± 24,8 ^b | 330,0 ± 15,8 ^a | 279,3 ± 50,4 |
| Atividade antioxidante (g fruto. g ⁻¹ DPPH) | 31,8 ± 3,4 ^a | 28,0 ± 2,3 ^a | 8,2 ± 1,6 ^b | 22,7 ± 11,2 |

Valores constituem média ± desvio-padrão. ^{a,b}Letras diferentes em uma mesma linha representam diferenças significativas (p<0,05) entre médias. EAG: equivalente de ácido gálico

mínimo de 24,5 mg.100 g⁻¹ (Goianésia) e máximo de 68,6 mg.100 g⁻¹ (Faina), sendo que a região de Faina apresentou conteúdo até duas vezes superior às demais regiões (Tabela 2). Silva et al¹¹ encontraram valor intermediário de vitamina C (36,92 mg.100 g⁻¹) em pseudofrutos de caju arbóreo *in natura*, oriundos das cidades de Goiás e Hidrolândia. Em duas das regiões estudadas, o teor de vitamina C observado nos pseudofrutos (Tabela 2) foi superior ao relatado em outros frutos, como murici (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth) (11,8 mg.100 g⁻¹)¹², abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merr.) (13,0 mg.100 g⁻¹)¹² e umbu (*Spondias tuberosa* Arruda Câmara) (12,1 mg.100 g⁻¹)¹². Considerando as recomendações diárias de vitamina C para indivíduos adultos (75 a 90 mg) e o teor médio de vitamina C encontrado neste estudo (43,9 mg.100 g⁻¹), o consumo de cinco a sete unidades de pseudofrutos de caju arbóreo (aproximadamente 100 g), fornece 48 a 58 % dessa recomendação¹³. Além disso, o pseudofruto pode ser considerado rico em vitamina C de acordo com a legislação brasileira¹⁴.

O conteúdo de compostos fenólicos totais observado para os pseudofrutos de caju arbóreo do Cerrado variou de 267 a 330 mg EAG.100 g⁻¹. Destaca-se que o teor de fenólicos da região de Goianésia foi maior que os valores observados para as demais regiões. Não foram identificados relatos do conteúdo de fenólicos em pseudofrutos de caju arbóreo do Cerrado, obtidos por metodologia semelhante à utilizada neste estudo. Porém, o valor médio observado para as três regiões (Tabela 2) é bem superior ao do caju comum (118 mg EAG.100 g⁻¹)⁷, e aos valores relatados para outros frutos, como mangaba (169 mg EAG.100 g⁻¹)⁷, tamarindo (83,8 mg EAG.100 g⁻¹)¹², cajá (72 mg EAG.100 g⁻¹)⁷ e abacaxi (38,1 mg EAG.100 g⁻¹)¹².

Quanto à capacidade de sequestro do radical DPPH, houve diferença significativa entre a região de Goianésia e as demais regiões (p<0,05), sendo que os pseudofrutos da região de Goianésia apresentaram maior atividade antioxidante em relação às outras regiões (Tabela 2). Além da escassez de dados, a comparação dos resultados obtidos por meio do

método DPPH é limitada, uma vez que a diversidade dos protocolos adotados gera muitas variações nos resultados.

Vale acrescentar que o acúmulo de radicais livres no organismo, gerados pela exposição a fatores ambientais, como alimentação inadequada, sedentarismo, radiação solar, poluição e tabagismo, pode desencadear processos oxidativos que têm sido associados ao envelhecimento precoce e ao desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis. Considerando que compostos com atividade antioxidante reduzem o risco dessas doenças e os resultados do nosso estudo, é importante incentivar a domesticação dos frutos do Cerrado para atender à demanda de consumo dos pseudofrutos de caju arbóreo em dietas saudáveis, visando contribuir com a ingestão de substâncias antioxidantes potencialmente protetoras contra diversas doenças crônicas, tais como diabetes mellitus, obesidade, dislipidemias e cânceres¹⁵.

CONCLUSÃO

Os pseudofrutos de caju arbóreo do Cerrado das regiões de Faina e Santa Terezinha são ricos em vitamina C, com destaque para os pseudofrutos da região de Faina, cujo conteúdo desta vitamina foi duas vezes superior às demais. Os pseudofrutos contêm quantidades apreciáveis de compostos fenólicos, sobressaindo os oriundos de Goianésia, pelo elevado conteúdo de compostos fenólicos e boa atividade antioxidante. Portanto, recomenda-se o consumo do pseudofruto de caju arbóreo para aumentar a ingestão de compostos bioativos pela população e colaborar na prevenção de doenças crônicas não transmissíveis.

REFERÊNCIAS

1. Wootton-Beard PC, Ryan L. Improving public health?: the role of antioxidant-rich fruit and vegetable beverages. *Food Res Int*. 2011;44(10):3135-48.
2. Valente A, Albuquerque TG, Sanches-Silva A, Costa HS. Ascorbic acid content in exotic fruits: a contribution to produce quality data for food composition databases. *Food Res Int*. 2011;44(7):2237-42.

3. Faller ALK, Fialho E. Disponibilidade de polifenóis em frutas e hortaliças consumidas no Brasil/ Polyphenol availability in fruits and vegetables consumed in Brazil. *Rev Saúde Pública*. 2009;43(2):211-8.
4. Silva MR, Lacerda DBCL, Santos GG, Martins DMO. Caracterização química de frutos nativos do cerrado/ Chemical characterization of native species of fruits from Savanna ecosystem. *Ciênc Rural*. 2008;38(6):1790-3.
5. Association of Official Analytical Chemists -AOAC. Official methods of analysis. 17. ed. Washington: AOAC; 2002.
6. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. 1959;37(8):911-7.
7. Rufino MSM, Alves RE, Brito ES, Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto F, Mancini-Filho J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chem*. 2010;121(4):996-1002.
8. Singleton VL, Rossi, JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. *Am J Enol Vitic*. 1965;16(3):144-58.
9. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci Technol*. 1995;28(1):25-30.
10. Martins MCP, Cunha TL, Silva MR. Efeito das condições da desidratação osmótica na qualidade de passas de caju-do-cerrado/ Effect of dehydration osmotic conditions on the quality of cashew apple from Cerrado. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2008;28(supl.):158-65.
11. Silva MR, Silva MS, Oliveira JS. Estabilidade de ácido ascórbico em pseudofrutos de caju-do-cerrado refrigerados e congelados/ Stability of ascorbic acid in refrigerated and frozen Cerrado cashew apple. *Pesq Agropec Trop*. 2004;34(1):9-14.
12. Almeida MMB, Sousa PHM, Arriaga AMC, Prado GM, Magalhães CEC, Maia GA, et al. Bioactive compounds and antioxidant activity os fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Res Int*. 2011;44(7):2155-9.
13. Institute of Medicine -IOM. Dietary References Intakes for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids. Washington: National Academic Press; 2000.
14. BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 27, de 13 de janeiro de 1998. Aprova o regulamento técnico sobre a informação nutricional complementar. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 16 Jan. 1998. [acesso 2012 Ago 3]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/27_98.htm].
15. Vetrani C, Costabile G, Di Marino L, Rivellese AA. Nutrition and oxidative stress: a systematic review of human studies. *Int J Food Sci Nutr*. 2013;64(3):312-26.

Validation of methodology for determining As, Pb and Cd in fish by using ICP-MS: Preliminary studies

Validação de método para análise de As, Pb e Cd em peixe por meio de ICP-MS: Estudos preliminares

RIALA6/1583

Lidiane Raquel Verola MATAVELI*, Luciana Juncioni de ARAUZ, Maria de Fátima Henriques CARVALHO, Paulo TIGLEA

*Endereço para correspondência: Núcleo de Contaminantes Inorgânicos, Centro de Contaminantes, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr Arnaldo, 355, Cerqueira César, São Paulo, SP, Brasil, CEP 01246-000. Tel.: (11) 3068-2923. E-mail: lmataveli@ial.sp.gov.br
Recebido: 28.08.2013 - Aceito para publicação: 25.11.2013

ABSTRACT

The progress of industry has led to the increased emission of pollutants into ecosystems, and fish consumption has been a remarkable source of human exposure to toxic metals. Arsenic, cadmium and lead constitute a potentially significant threat to human health because they are associated with several adverse health effects. Therefore, fish biomonitoring has been a crucial tool for assessing the environmental exposure to contaminants. This study aimed at determining arsenic, cadmium and lead contents in fish samples from a Proficiency Testing for Metals conducted by the Nuclear and Energy Research Institute (IPEN), in order to develop a routine analytical methodology using ICP-MS. The methodology was evaluated by using the certified reference oyster tissue material, which indicated good agreement between the certified and the determined concentrations for As, Cd and Pb. The report on the Proficiency Test performance evaluation, based on the *z-score* index, evidenced satisfactory results in both samples of the analyzed elements.

Keywords. fish, arsenic, cadmium, lead, ICP-MS

RESUMO

O progresso das indústrias tem causado aumento da emissão de poluentes em ecossistemas, e o consumo de peixe tem sido importante fonte de exposição dos homens aos metais tóxicos. Arsênio, cádmio e chumbo constituem uma potencial ameaça para a saúde humana, pois estão associados a efeitos adversos à saúde. Portanto, o biomonitoramento em peixe é fundamental ferramenta para realizar a avaliação da exposição aos contaminantes ambientais. O objetivo deste estudo foi de determinar a ocorrência de arsênio, cádmio, e chumbo em amostras de peixe, a fim de iniciar o desenvolvimento de um método analítico de rotina por meio de ICP-MS. Para conduzir este estudo, foram utilizadas as amostras provenientes do Teste de Proficiência em Metais organizado pelo Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN). A metodologia foi avaliada de acordo com os valores obtidos em material de referência certificado de tecido de ostra, que indicaram boa concordância entre as concentrações certificadas e aquelas determinadas para As, Cd e Pb. O relatório de avaliação de desempenho para o Teste de Proficiência, com base no índice *z-score*, mostrou resultados satisfatórios para as duas amostras dos elementos analisados.

Palavras-chave. peixe, arsênio, cádmio, chumbo, ICP-MS.

Elements such as arsenic, cadmium and lead, are natural trace components of the aquatic environment, but their levels have increased due to several human activities, such as industry, agriculture and mining.

When toxic elements accumulate to certain levels in the environment or in the human body, they can cause ecological damage and health problems to humans^{1,2}. Even low metal concentrations may affect the health of aquatic and terrestrial organisms, including men, since it is known that the consumption of contaminated food can provide the transfer of these metals to human beings through the food chain¹.

That is why fish and other edible aquatic animals contamination caused by toxic metals has become a concern worldwide, not only because of the threat to these animals lives, but also due to health risks associated to the consumption of these animals. This problem already showed its effects in Brazilian ecosystems: Medeiros et al³ observed arsenic levels of 0.002 and 11.8 mg.kg⁻¹ for two species of fish and, in another study⁴, cadmium and lead contents were detected in different aquatic species with values ranging from 0.01 to 1.04 mg.kg⁻¹ and from 0.10 to 5.40 mg.kg⁻¹, respectively. It is important to notice that the highest concentration found in these studies are above (As, Pb) or in the limit (Cd) of the Brazilian legislation⁵ maximum level. According to other recent studies carried out in Brazil, in which authors analyzed fish liver⁶ and muscle⁷, the results showed concentrations higher than the level allowed by legislation for these elements in a variety of species.

Thus the aim of this work was to start studying the validation of a method to analyze arsenic, lead and cadmium in aquatic organisms, and, as a public health laboratory, to provide methods that are able to analyze samples in concentrations that meet the Brazilian legislation.

The oyster tissue Certified Reference Material (CRM 1566b), used for the digestion procedure evaluation, was purchased from National Institute of Standards and Technology (NIST). Samples for the Proficiency Testing for Metals in Fish Tissue were sent to the inorganic contaminants laboratory of Instituto Adolfo Lutz by the Nuclear and Energy Research Institute (IPEN). According to IPEN information, these samples were acquired in the Amazon region, with Cd, As and Pb in concentration values within the Brazilian legislation.

Approximately 0.3 g from both CRM and samples for the analysis of Cd, Pb and As were weighed on an analytical balance (Ohaus AdventurerTM). The CRM and

Table 1. Instrumental parameters of ICP-MS

| | |
|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| RF power | 1400 W |
| Plasma gas flow rate | 18 L.min ⁻¹ |
| Auxiliary gas flow rate | 1.0 L.min ⁻¹ |
| Nebulizer gas flow | 0.99 L.min ⁻¹ |
| Integration time | 750 ms (per element)* |
| Isotopes monitored | ⁷⁵ As, ¹¹⁴ Cd, ²⁰⁶ Pb**, ²⁰⁷ Pb**, ²⁰⁸ Pb** |
| Cell gas | NH ₃ , for As analysis |

* For Pb, 750 ms per isotope ** Concentration values are expressed as the mean between the 3 isotopes

samples, as well as blanks, were digested in a Marconi[®] digestion block at 90 °C for two hours, using 2.0 mL of Suprapur[®] HNO₃ (Merck) and 0.5 ml of H₂O₂ (30 % w/w, Merck). The digested sample had a final volume of 35 mL, completed with deionized water.

Analysis were performed using Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer (ICP-MS, ELAN DRC II, PerkinElmer), equipped with a glass Meinhard nebulizer and a cyclonic glass spray chamber. Daily performance of the equipment was checked using a multi-element standard solution (PerkinElmer). Relevant operating conditions of the equipment are shown in Table 1.

Metal concentration in the CRM and samples was calculated using analytical curves specific for each element, using 5 standard concentration ranging, with ranges from 1.0 to 40, 1.2 to 24 and 1.0 to 20 µg.L⁻¹ for As, Cd and Pb, respectively.

Main figures of merit were calculated as follows: instrumental limits of detection (LD) were calculated as 3 x standard deviation of ten repeated measures of blanks digested independently; instrumental limits of quantification (LQ) were calculated as 10x the standard deviation of ten repeated measures of blanks digested independently; precision was calculated as relative standard deviation (RSD), and accuracy was evaluated using the CRM 1566b subjected to the same digestion procedure as the samples.

Results for the measurement of As, Pb and Cd in two samples of fish and oyster certified reference material,

Table 2. Results of As, Pb and Cd in fish and oyster certified reference material using ICP-MS

| | Certified Reference Material ^c | | | | | Samples | |
|----|-------------------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| | Obtained values | | Certified values | | | Sample 1 (mg.kg ⁻¹) ^d | Sample 2 (mg.kg ⁻¹) ^d |
| | LD ^a (µg.L ⁻¹) | LQ ^b (µg.L ⁻¹) | Concentration (mg.kg ⁻¹) | Concentration (mg.kg ⁻¹) | Recovery (%) | | |
| As | 0.15 | 0.48 | 7.10 ± 0.19 | 7.65 ± 0.65 | 92.8 | 0.65 ± 0.09 | 1.09 ± 0,09 |
| Cd | 0.15 | 0.51 | 2.48 ± 0.02 | 2.48 ± 0.08 | 100.2 | 0.48 ± 0.003 | 1.73 ± 0,04 |
| Pb | 0.30 | 0.99 | 0.33 ± 0.030 | 0.31 ± 0.009 | 108.3 | 1.03 ± 0.002 | 0.67 ± 0,02 |

^a LD – Limits of detection for the analyzed elements

^b LQ – Limits of quantification for the analyzed elements

^c Results of NIST CRM 1566b analysis after oxidative digestion (average values, n=3 ± standard deviations)

^d Results of sample 1 and 2 analysis after oxidative digestion (average values, n=9 ± standard deviations)

as well as limit of detection and limit of quantification using ICP-MS are shown in Table 02.

Accuracy of the sample preparation analysis was verified by analyzing CRM 1566b in the ICP-MS, and results are given in Table 02. Recoveries of measured elements were within 92.8-108.3 %, indicating a good agreement between certified and determined concentrations. Precision, as RSD, for analysis of 3 digested CRM samples varied from 0.8 to 9.7 %.

Two samples sent to the laboratory as part of the Proficiency Test for metals in fish tissue were analyzed, and the results are shown in Table 2. According to the report received, the performance evaluation of the analysis, based on the *z-score* index, showed satisfactory results for both samples regarding the analyzed elements. Precision as RSD for analysis of the digested samples varied from 0.9 to 12 %.

Lead absorption may constitute a serious risk to public health. It is well documented to cause neurotoxicity, nephrotoxicity, increase in blood pressure and cardiovascular diseases. In children, Pb can also cause slow cognitive development and impair intellectual performance⁸. The maximum Pb level established by the Brazilian legislation for fish is 0.3 mg.kg⁻¹ (raw weight)⁵. Concentrations for the analyzed samples are higher (0.67 ± 0.02 mg.kg⁻¹ and 1.03 ± 0.002 mg.kg⁻¹) than the maximum concentration allowed by the legislation⁹.

Cadmium absorption also constitutes a risk to humans, since it may induce kidney dysfunction, skeletal damage and reproductive disorders⁸, and the maximum Cd level established by the Brazilian legislation⁵ for fish range from 0.05 to 0.30 mg.kg⁻¹ (raw weight)⁵ according to the species. Concentrations for both the analyzed samples (Table 02) are higher (0.48 ± 0.003 mg.kg⁻¹ and 1.73 ± 0.04 mg.kg⁻¹) than the maximum concentration

allowed by the Brazilian legislation, demonstrating the capability of this method to meet its requirements.

The toxicity of arsenic differs mainly in terms of oxidation states and whether it is present in inorganic or organic forms. Studies² indicate that fish and other seafood account for 90 % of total As exposure, and the toxic species account for 1-3 % of the total As present⁹. This explains the lack of legislation regarding this element worldwide. For example, there is presently no legislation for arsenic in foodstuff in the European Union, and in the USA, only a regulatory limit for oral As reference dose is provided by EPA (3x10⁻⁴ mg/kg/day)⁹. Brazilian legislation establishes the maximum As level for fish as 1.0 mg kg⁻¹ (raw weight)⁵, and the method developed in this work is able to meet these values (0.65 ± 0.09 and 1.09 ± 0,09 mg.kg⁻¹).

According to the results, the concentration values found for the oyster CRM indicated a good agreement between certified and determined concentrations for As, Cd and Pb. In this preliminary study, the main figures of merit were established, and the results in the samples analysis (in this case, the Proficiency Testing samples) were promising. This provides data to develop a well established method capable of analyzing these elements, meeting the Brazilian legislation for As, Cd and Pb in fish.

ACKNOWLEDGMENT

To Luci Elaine Machado for all the help provided in the laboratory.

REFERENCES

1. Olmedo P, Pla A, Hernández AF, Barbier F, Ayouni L, Gil F. Determination of toxic elements (mercury, cadmium, lead, tin and arsenic) in fish and shellfish samples. Risk assessment for the consumers. *Environ Int*. 2013;59:63-72.
2. Rahman MS, Molla AH, Saha N, Rahman A. Study on heavy metals levels and its risk assessment in some edible fishes from Bangshi River, Savar, Dhaka, Bangladesh. *Food Chem*. 2012;134:1847-54.

3. Medeiros RJ, Santos LMG dos, Freire AS, Santelli RE, Braga AMCB, Krauss TM, et al. Determination of inorganic trace elements in edible marine fish from Rio de Janeiro State, Brazil. *Food Control*. 2012; 23:535-41.
4. Santos LFP, Trigueiro INS, Lemos VA, Furtunato DMN, Cardoso RCV. Assessment of cadmium and lead in commercially important seafood from São Francisco do Conde, Bahia, Brazil. *Food Control*. 2013; 33:193-9.
5. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 42, de 29 de agosto de 2013. Dispõe sobre o Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Limites Máximos de Contaminantes Inorgânicos em Alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 30 ago. 2013. Seção 1, p. 33-35.
6. Meche A, Martins MC, Lofrano BESN, Hardway CJ, Verdade L. Determination of heavy metals by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry in fish from the Piracicaba River in Southern Brazil. *Microchem J*. 2010; 94: 171-4.
7. Weber P, Behr ER, Knorr CL, Vendruscolo DS, Flores EMM, Dressler VL, et al. Metals in the water, sediment, and tissues of two fish species in a subtropical Brazilian river. *Microchem J*. 2013; 106: 61-6.
8. European Union. Summaries of EU Legislation. [acesso em 2013 Jul 10]. Disponível em: http://europa.eu/legislation_summaries/food_safety/contamination_environmental_factors/121290_en.htm
9. Copat C, Arena G, Fiore M, Ledda C, Fallico R, Sciacca S, et al. Heavy metals concentrations in fish and shellfish from eastern Mediterranean Sea: Consumption advisories. *Food Chem Toxicol*. 2013;53:33-7.

COLABORADORES

Agradecimentos aos relatores

O Corpo Editorial agradece a todos os relatores abaixo relacionados que, com seu trabalho voluntário e anônimo ao longo de 2013, contribuíram para o bom andamento das atividades e elevação do nível dos artigos publicados pela Revista.

- **Adelaide Del Pino Beileia** Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Tecnologia de Alimentos. Londrina, PR
- **Adriana Palma de Almeida** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Contaminantes, Núcleo de Contaminantes Orgânicos. São Paulo, SP
- **Adriano Gomes da Cruz** Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Tecnologia de Alimentos. Campinas, SP
- **Afonso de Liguori Oliveira** Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Departamento de Tecnologia e Inspeção. Belo Horizonte, MG
- **Alaise Gil Guimarães** Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Departamento de Análises Bromatológicas. Salvador, BA
- **Alberto Keidi Kurebayashi** Protocolo Consultoria em Personal e Health Care. São Paulo, SP
- **Alceu Afonso Jordão Junior** Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Clínica Médica. Ribeirão Preto, SP
- **Alexandre Tourino Mendonça** Universidade Vale do Rio Verde. Três Corações, MG
- **Amanda de Souza da Motta** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia. Porto Alegre, RS
- **Ana Flávia Santos Coelho** Fundação Universidade Federal do Tocantins, Engenharia de Alimentos, Laboratório de Microbiologia de Alimentos. Palmas, TO
- **Ana Paula D'Alincourt Carvalho** Assef Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar. Rio de Janeiro, RJ
- **Ana Paula Guedes Frazzon** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia. Porto Alegre, RS
- **André Kipnis** Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Departamento de Microbiologia. Goiânia, GO
- **Antonio Hugo José Fróes Campos** Fundação Antonio Prudente, Hospital do Câncer AC Camargo, Departamento de Anatomia Patológica. São Paulo, SP
- **Aurélia Santos Faraoni** Universidade Federal de Sergipe. São Cristovão, SE
- **Carina Martins Moraes** Universidade Federal do Pará, Faculdade de Medicina Veterinária. Castanhal, PA
- **Carlos Eugenio Daudt** Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Santa Maria, RS
- **Cecília Geraldine Martins** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Alimentos, Núcleo de Microbiologia. São Paulo, SP
- **Célia Maria Carvalho Pereira Araujo Romão** Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Departamento de Microbiologia. Rio de Janeiro, RJ
- **Celia Maria de Sylos** Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Alimentos e Nutrição. Araraquara, SP
- **Celso Spada** Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas. Florianópolis, SC
- **Charles Windson Isidoro Haminiuk** Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Departamento Acadêmico de Tecnologia e Engenharia de Alimentos. Campo Mourão, PR
- **Cibele Cristina Osawa** Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Rio de Janeiro, RJ
- **Clarissa Damiani** Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia, Departamento de Tecnologia de Alimentos. Goiânia, GO
- **Clícia Maria de Jesus Benevides** Universidade do Estado da Bahia, Centro de Ciências da Saúde e dos Alimentos, Departamento de Ciências da Vida. Salvador, BA
- **Cristiana Ferreira Jardim de Miranda** Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG
- **Cristiane Gattini Sbampato** Universidade Vale do Rio Verde. Três Corações, MG
- **Cristiano Corrêa de Azevedo Marques** Instituto Butantan, Laboratório Especial de História da Ciência. São Paulo, SP
- **Daniel Granato** Wageningen University, Institute of Food Safety. Wageningen, Holanda
- **Deborah dos Santos Garruti** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Agroindústria Tropical. Fortaleza, CE
- **Deborah Ines Teixeira Favaro** Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares, Laboratório de Análise por Ativação Neutrônica. São Paulo, SP
- **Denise Perdomo Azeredo** Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo. Vila Velha, ES
- **Edna Froeder Arcuri** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite. Juiz de Fora, MG
- **Edna Regina Amante** Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Florianópolis, SC
- **Eduardo Aléxis Lobo Alcayaga** Universidade de Santa Cruz do Sul, Departamento de Biologia. Santa Cruz do Sul, RS

- **Elayse Maria Hachich** Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. São Paulo, SP
- **Eliane Cristina Pires do Rego** Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. Rio de Janeiro, RJ
- **Eliana Peresi** Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, Laboratório de Pesquisa em Doenças Tropicais. Botucatu, SP
- **Eliana Rodrigues Machado** Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Departamento de Química. Rio de Janeiro, RJ
- **Elisa Teshima** Universidade Estadual de Feira de Santana, Departamento de Tecnologia. Feira de Santana, BA
- **Elizabeth A. Accioly** Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição “Josué de Castro”, Departamento de Nutrição e Dietética. Rio de Janeiro, RJ
- **Ernesto Hofer** Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Zoonoses Bacterianas. Rio de Janeiro, RJ
- **Ester Yoshie Yosino da Silva** Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde. Brasília, DF
- **Felipe Rebello Lourenço** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia. São Paulo, SP
- **Flávio Alves da Silva** Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia. Goiânia, GO
- **Foued Salmen Espindola** Universidade Federal de Uberlândia, Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular. Uberlândia, MG
- **Francisca Janaina Rocha** Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde. Recife, PE
- **Francisco de Assis Baroni** Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Veterinária. Seropédica, RJ
- **Geraldo Arraes Maia** Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, CE
- **Grasiele Scaramal Madrona** Universidade Estadual de Maringá. Maringá, PR
- **Hans Fröder** Centro Universitário Univates. Lajeado, RS
- **Helena Margarida de Oliveira Marques Ribeiro** Universidade de Lisboa, Faculdade de Farmácia, Departamento de Farmácia Galênica e Tecnologia Farmacêutica. Lisboa, Portugal
- **Helena Rodrigues Lopes** Universidade Federal Fluminense, Instituto Biomédico, Centro de Ciências Médicas. Niterói, RJ
- **Heloísa Werneck de Macedo** Universidade Federal Fluminense, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia. Niterói, RJ
- **Ijoni Hilda Costabeber** Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Morfologia. Santa Maria, RS
- **Irene Satiko Kikuchi** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia, Laboratório de Controle Biológico de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos. São Paulo, SP
- **Isabel Cristina Ferreira Damin** Laboratório Nacional Agropecuário do Rio Grande do Sul. Rio Grande do Sul, RS
- **Joice Neves Reis Pedreira** Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Salvador, BA
- **Jorge Luiz Fortuna** Universidade do Estado da Bahia, Departamento de Educação, Laboratório de Microbiologia. Teixeira de Freitas, BA
- **Juliane Elisa Welke** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Química. Porto Alegre, RS
- **Karina Correia da Silveira** Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Nutrição. Recife, PE
- **Larissa Lagoa Ribeiro Furtini** Universidade Federal de Lavras, Laboratório de Microbiologia. Lavras, MG
- **Leonardo Neves de Andrade** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular. Ribeirão Preto, SP
- **Letícia Nishi** Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Engenharia Química, Laboratório de Parasitologia Ambiental. Maringá, PR
- **Lilian Viana Teixeira** Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Departamento de Tecnologia e Inspeção. Belo Horizonte, MG
- **Lina Yamachita Oliveras** Fundação de Ciência e Tecnologia, Superintendência de Produção, Departamento de Alimentos. Porto Alegre, RS
- **Luciana Maria Ramires Esper** Universidade Federal Fluminense, Faculdade de Farmácia, Departamento de Bromatologia, Laboratório de Controle Microbiológico de Alimentos. Niterói, RJ
- **Luciana Pereira Lobato** Universidade Federal de Sergipe. Lagarto, SE
- **Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman** Universidade de São Paulo, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Laboratório de Protozoologia. São Paulo, SP
- **Luciana Weidlich** Centro Universitário Univates, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Lajeado, RS
- **Luiz Francisco Zafalon** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa de Pecuária do Sudeste., São Carlos, SP
- **Luiz Simeão do Carmo** Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia. Belo Horizonte, MG
- **Marcia Barreto da Silva Feijó** Universidade Federal Fluminense, Departamento de Bromatologia. Rio de Janeiro, RJ
- **Márcia de Aguiar Ferreira** Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Brasília, DF
- **Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha** Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Departamento de Microbiologia e Imunologia. Botucatu, SP
- **Márcia Elena Zanutto** Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde. Vitória da Conquista, BA
- **Márcia Helena de Rizzo da Matta** Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Departamento de Química. Campo Grande, MS
- **Maria Helena Wohlers Morelli** Cardoso Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Departamento de Química, Laboratório de Alimentos e Contaminantes. Rio de Janeiro, RJ
- **Márcia Monks Jantzen** Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Ciência dos Alimentos. Pelotas, RS

- **Marcia Regina Beux** Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas. Curitiba, PR
- **Marcos Ereno Auler** Universidade Estadual do Centro-Oeste, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia, Laboratório de Microbiologia e Micologia. Guarapuava, PR
- **Maria Auxiliadora de Brito Rodas** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Alimentos, Núcleo de Química, Física e Sensorial. São Paulo, SP
- **Maria Carolina Batista Campos von Atzingen** Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Nutrição. São Paulo, SP
- **Maria da Penha Piccolo** Universidade Federal do Espírito Santo, Centro Universitário Norte do Espírito Santo, Departamento de Ciências da Saúde. São Mateus, ES
- **Maria das Graças de Luna Gomes** Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia. Rio de Janeiro, RJ
- **Maria das Graças Gomes de Azevedo Medeiros** Universidade Federal Fluminense, Faculdade de Nutrição. Niterói, RJ
- **Maria da P Spinola Miranda** Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Departamento de Análises Bromatológicas. Salvador, BA
- **Maria Luiza Bazzo** Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas, Laboratório de Biologia Molecular e Micobactérias. Florianópolis, SC
- **Maria Nogueira Marques** Instituto Tecnológico e de Pesquisas do Estado de Sergipe, Laboratório de Águas e Despejos Industriais. Aracaju, SE
- **Maria Petronília de Oliveira Hellqvist** Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, Laboratório de Microalgas. Fortaleza, CE
- **Mário Tavares** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Laboratórios Regionais de Santos, Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas. Santos, SP
- **Marta Fonseca Martins Guimarães** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite. Juiz de Fora, MG
- **Maurício Henriques Louzada Silva** Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais. Rio Pomba, MG
- **Mirian Ribeiro Galvão Machado** Universidade Federal de Pelotas, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos. Pelotas, RS
- **Myrian Morato Duarte** Fundação Ezequiel Dias, Laboratório de Biologia Molecular. Belo Horizonte, MG
- **Myrna Sabino** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Contaminantes, Núcleo de Contaminantes Orgânicos. São Paulo, SP
- **Paula Dias Bevilacqua** Universidade Federal de Viçosa, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Veterinária. Viçosa, MG
- **Paula Cristhina Niz Xavier** Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande, MS
- **Paulo Afonso Lopes** Instituto Militar de Engenharia, Seção de Engenharia de Construção. Rio de Janeiro, RJ
- **Pedro Ysmael Cornejo Mujica** Universidade Federal do Tocantins, Laboratório de Tecnologia de Carnes, Pescados e Derivados. Palmas, TO
- **Raquel Gouvêa** Universidade Federal Fluminense, Centro de Ciências Médicas, Departamento de Tecnologia de Alimentos. Niterói, RJ
- **Raul Borges Guimarães** Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Departamento de Geografia. Presidente Prudente, SP
- **Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira** Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Engenharia de Pesca. Fortaleza, CE
- **Rita de Cássia Avellaneda Guimarães** Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Curso de Nutrição. Campo Grande, MS
- **Roberto Mitsuyoshi Hiramoto** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Parasitologia e Micologia, Núcleo de Parasitoses Sistêmicas. São Paulo, SP
- **Sabria Aued Pimentel** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Alimentos, Núcleo de Química, Física e Sensorial. São Paulo, SP
- **Silvane Maria Braga Santos** Universidade Federal da Bahia, Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Serviço de Imunologia. Salvador, BA
- **Silvia Conceição Reis Pereira Mello** Centro Universitário Augusto Motta. Rio de Janeiro, RJ
- **Silvia Maria Santos Carvalho** Universidade Estadual de Santa Cruz, Departamento de Ciências Biológicas, Ciências Biológicas. Ilhéus, BA
- **Silvia Yuko Eguchi Allergisa** Pesquisa Dermato-Cosmética. São Paulo, SP
- **Solange Cadore** Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química. Campinas, SP
- **Tatiana Pacheco Nunes** Universidade Federal de Sergipe, Departamento de Tecnologia de Alimentos. São Cristóvão, SE
- **Tatiana Valesca Rodriguez** Alicieo Universidade Federal de Pelotas, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos. Pelotas, RS
- **Thelma de Filippis** Universidade Federal de Viçosa, Faculdade de Saúde e Ecologia Humana, Campus Florestal. Vespasiano, MG
- **Valéria Adriana Pereira Martins** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Medicamentos, Cosméticos, Saneantes, Núcleo de Ensaios Físicos e Químicos em Medicamentos. São Paulo, SP
- **Vanessa Riani Olmi Silva** Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais. Juiz de Fora, MG
- **Verônica Ortiz Alvarenga** Universidade Federal de Rondônia. Ariquemes, RO
- **Victor Eduardo Arrúa Arias** Centro de Referência da Saúde da Mulher Hospital Pérola Byington, Núcleo de Patologia. São Paulo, SP
- **Waldomiro Borges Neto** Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Química, Laboratório de Quimiometria do Triângulo. Uberlândia, MG

Agradecimento especial pela revisão do inglês

Dra. Mirthes Ueda

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

A Revista do Instituto Adolfo Lutz (RIAL), iniciada em 1941, é uma publicação trimestral com a missão de divulgar resultados de investigações científicas relacionadas às ações de promoção à saúde, prevenção e controle de agravos e doenças de interesse em saúde pública, além de incentivar a produção de artigos científicos nas áreas de vigilância epidemiológica e sanitária e de proporcionar a atualização e aprimoramento de profissionais da área em âmbito nacional e internacional. A RIAL é inter e multidisciplinar, arbitrada, aberta a contribuições de autores nacionais e estrangeiros. Publica prioritariamente pesquisas originais com contribuições relevantes na área laboratorial em saúde pública, realizadas com rigor científico e que possam ser replicadas e generalizadas.

POLÍTICA EDITORIAL

Editada nos formatos impresso e eletrônico, a RIAL tem interesse por trabalhos originais em todas as áreas laboratoriais em saúde pública. São também publicadas outras contribuições inéditas, desde que sobre temas atuais e importantes – revisões de literatura, comunicações breves e notas científicas – além de resumos de teses e dissertações.

Os manuscritos devem destinar-se exclusivamente à RIAL, não sendo permitida sua apresentação simultânea a outro periódico. As contribuições podem ser apresentadas em português ou inglês.

Os manuscritos submetidos são analisados inicialmente pelos editores quanto ao atendimento aos padrões da RIAL e às normas para o envio dos originais. Aqueles manuscritos selecionados são encaminhados para avaliação por pares externos de área pertinente, sempre de instituições distintas àquela da origem do manuscrito, sendo garantido o anonimato e a confidencialidade durante todo o processo de avaliação. Após receber os pareceres, o Corpo Editorial, que detém a decisão final sobre a publicação ou não do texto, avalia a aceitação do texto sem modificações, a recusa ou a devolução ao autor com as sugestões apontadas pelos relatores.

Os manuscritos submetidos devem atender à política editorial da RIAL e às Instruções aos Autores, que seguem os *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication* (<http://www.icmje.org>), além dos critérios éticos da pesquisa humana e animal.

Os autores devem explicitar em MÉTODOS que a pesquisa foi conduzida dentro dos padrões exigidos pela Resolução 466 de 12 de dezembro de 2012 do Ministério da Saúde – Conselho Nacional de Saúde, em caso de ética humana, e pela Lei Federal 11.794 de 08 de outubro de 2008, pela Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos - DBCA de 2013 e pelas Resoluções Normativas Nº 12, Nº 13 e Nº 14 no caso de experimentação animal. A pesquisa deverá ser aprovada por comissão de ética humana (CEP) reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) – vinculada ao Conselho Nacional de Saúde (CNS), bem como registro dos estudos de ensaios clínicos em base de dados, conforme recomendação aos editores da Lilacs e Scielo, disponíveis em: <http://bvsmodelo.bvsalud.org/site/lilacs/homepage.htm>. No caso de experimentação animal o projeto deverá ser aprovado por Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) reconhecida pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal do Ministério de Ciência e Tecnologia e Inovação (CONCEA). O nome da base de dados, sigla e/ou número do ensaio clínico, assim como o número do processo e o nome da comissão de ética que aprovou o projeto, deverão ser colocados ao final do RESUMO. Nos casos de ensaios envolvendo animais, estes deverão atender a Lei Federal 9605 contra crimes ambientais, a Lei federal 6638/76 e a Lei 11.794/08, que normatiza a utilização de animais em pesquisa científica. Os autores deverão ter em seu poder todos os documentos referentes a este procedimento, que poderão ser solicitados em qualquer momento pelos editores.

Os autores serão responsáveis por reconhecer e revelar conflitos financeiros, de interesse comercial e/ou associativo, relacionados ao material de trabalho ou outros que possam influenciá-los, apresentando uma declaração sobre a existência ou não de tais conflitos. Os relatores também devem revelar aos editores qualquer conflito que possa influir ou impedir as suas avaliações.

Os manuscritos publicados são de propriedade da RIAL. A transferência de direitos autorais será solicitada após a aprovação do manuscrito para publicação.

INFORMAÇÕES GERAIS

Os manuscritos submetidos à publicação na RIAL devem ser apresentados de acordo com as Instruções aos Autores.

São aceitos manuscritos nos idiomas: português e inglês.

O manuscrito deve ser encaminhado em formato eletrônico (e-mail) ou impresso, aos cuidados do editor-chefe da RIAL, no seguinte endereço:

Revista do Instituto Adolfo Lutz (RIAL)

Núcleo de Acervo

Av. Dr. Arnaldo, 355 - Cerqueira César - São Paulo - SP - Brasil - CEP: 01246-902

Ou por meio eletrônico em rial@saude.sp.gov.br

Pormenores sobre os itens exigidos para apresentação do manuscrito estão descritos a seguir.

1. CATEGORIA DE ARTIGOS

1.1 ARTIGOS ORIGINAIS: Incluem estudos relacionados à prevenção e controle de agravos e à promoção à saúde. Devem ser baseados em novos dados ou perspectivas relevantes para saúde pública. Cada artigo deve conter objetivos e hipóteses claras, desenho e métodos utilizados, resultados, discussão e conclusões.

INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES:

- Devem ter até 20 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 05 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.

▪ As referências bibliográficas, limitadas a 40, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.

▪ Os resumos em português e em inglês (abstract) devem ter até 200 palavras, com a indicação de 3 a 6 palavras-chave (keywords).

A estrutura dos artigos originais de pesquisa é a convencional: Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão e Conclusão, embora outros formatos possam ser aceitos, mas respeitando a lógica da estrutura de artigos científicos.

1.2 ARTIGOS DE REVISÃO: Dedicados à apresentação e à discussão de temas de interesse científico e de relevância para a saúde pública. Devem apresentar formulação clara de um objeto científico de interesse, argumentação lógica, crítica teórico-metodológica dos trabalhos consultados e síntese conclusiva. Devem ser elaborados por pesquisadores com experiência no campo em questão ou por especialistas de reconhecido saber.

Informações complementares:

▪ Devem ter até 25 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.

▪ As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 03 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.

▪ As referências bibliográficas, limitadas a 50, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.

▪ Os resumos em português e em inglês (abstract) devem ter até 200 palavras, com a indicação de 3 a 6 palavras-chave (keywords).

1.3 COMUNICAÇÕES BREVES: São relatos sucintos destinados à rápida divulgação de eventos significativos no campo da pesquisa de interesse em saúde pública e que não comportam uma análise mais abrangente.

Informações complementares:

▪ Devem ter até 10 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.

▪ As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 02 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.

▪ As referências bibliográficas, limitadas a 15, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.

▪ Os resumos em português e em inglês (abstract) devem ter até 200 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (keywords).

▪ Sua apresentação deve acompanhar as mesmas normas exigidas para artigos originais.

1.4 NOTAS CIENTÍFICAS: São relatos sucintos destinados à rápida divulgação de eventos relevantes de uma pesquisa experimental que justifique a publicação de resultados parciais.

Informações complementares:

▪ Devem ter até 06 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.

▪ As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 02 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.

▪ As referências bibliográficas, limitadas a 10, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.

▪ Os resumos em português e em inglês (abstract) devem ter até 200 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (keywords).

▪ Sua apresentação deve acompanhar as mesmas normas exigidas para artigos originais, porém na forma de texto único.

1.5 RELATOS DE CASO: São textos que contemplam principalmente a área médica, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada.

Informações complementares:

▪ Devem ter até 03 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.

▪ As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 02 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.

▪ As referências bibliográficas, limitadas a 10, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.

- Os resumos em português e em inglês (abstract) devem ter até 200 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (keywords).
- Devem apresentar Introdução, Relato de caso, Discussão e Conclusão, na forma de texto único.

1.6 RESUMOS DE TESES E DISSERTAÇÕES: São aceitos resumos de teses e dissertações até um ano após a defesa.

Informações complementares:

- Devem ter até 400 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (keywords).
- Sua apresentação deve conter o nome do autor e do orientador, título do trabalho em português e em inglês, nome da instituição em que foi apresentado, área de concentração e ano da defesa.

2. APRESENTAÇÃO DO MANUSCRITO: Os textos devem ser redigidos em processador de texto Word for Windows 2003 ou compatível, no formato A4, espaço duplo, fonte Times New Roman, tamanho 12. Devem ser evitados arquivos compactados. A estrutura do manuscrito deve estar em conformidade com as normas do Sistema Vancouver – Título; Autores e Instituições; Resumo e Abstract; Introdução; Material e Métodos; Resultados; Discussão; Conclusão; Agradecimentos; Referências; Tabelas; Figuras e Fotografias.

2.1 PÁGINA DE IDENTIFICAÇÃO: Deve constar:

Título em português e em inglês: O título deve ser conciso, completo e conter informações. Se o manuscrito for submetido em inglês, deve ser fornecido um título em português.

Autores: De acordo com o International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), são considerados autores aqueles que contribuíram substancialmente para a concepção e planejamento, ou análise e interpretação dos dados; contribuíram significativamente na elaboração do rascunho ou na revisão crítica do conteúdo e participaram da aprovação da versão final do mesmo. Somente a aquisição de financiamento, a coleta de dados ou supervisão geral de grupos de pesquisa não justificam autoria – maiores esclarecimentos sobre autoria podem ser encontrados na página do ICMJE (<http://www.icjme.org>). Deve constar o nome completo, sem abreviações e com último sobrenome em caixa alta (exemplo: Ana Maria Camargo da SILVA) e o e-mail do autor responsável. O autor responsável para troca de correspondência deve estar assinalado com asterisco (*) e apresentar também o endereço completo.

Afiliação: Deve ser indicada a instituição à qual cada autor está afiliado, na seguinte ordem de hierarquias institucionais de afiliação: laboratório, setor, seção, serviço, divisão, departamento, instituto, faculdade e universidade.

Financiamento da pesquisa: Se a pesquisa foi subvencionada, indicar o tipo de auxílio, o nome da agência financiadora e o respectivo número do processo.

Apresentação prévia: Quando baseado em tese ou dissertação, indicar o nome do autor, título, ano, nome do programa de pós-graduação e instituição onde foi apresentada. Quando apresentado em evento científico, indicar o nome do evento, local e ano da realização.

2.2 PREPARO DO MANUSCRITO:

Resumo/Abstract: Todos os textos deverão ter resumos em português e inglês, dimensionados para ter até 200 palavras. Como regra geral, o resumo deve incluir objetivos do estudo, principais procedimentos metodológicos, principais resultados e conclusões.

Palavras-chave/keywords: Devem ser indicados entre 3 a 6 descritores do conteúdo, extraídos do vocabulário Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) da Bireme (disponível em <http://www.bireme.br>) nos idiomas português e inglês. Em inglês, com base no Medical Subject Headings (MeSH).

Caso não sejam encontrados descritores adequados para a temática do manuscrito, poderão ser indicados termos não existentes nos conjuntos citados.

Estrutura do texto:

A) Introdução: Deve ser breve, relatando o contexto e a justificativa do estudo, apoiados em referências pertinentes ao objetivo do manuscrito, sintetizando a importância e destacando as lacunas do conhecimento abordadas. Não deve incluir dados ou conclusões do estudo em referência

B) Material e Métodos: Os procedimentos adotados devem ser descritos claramente, bem como as variáveis analisadas, com a respectiva definição, quando necessária, e a hipótese a ser testada. Devem ser descritas a população e a amostra, instrumentos de medida, com a apresentação, se possível, de medidas de validade e conter informações sobre a coleta e processamento de dados. Deve ser incluída a devida referência para os métodos e técnicas empregados, inclusive os métodos estatísticos; métodos novos ou substancialmente modificados devem ser descritos, justificando as razões para seu uso e mencionando suas limitações.

Os critérios éticos da pesquisa devem ser respeitados; os autores devem explicitar que a pesquisa foi conduzida dentro de padrões éticos e foi aprovada por comitê de ética, indicando o nome do comitê de ética, número e data do registro.

C) Resultados: Devem ser apresentados em uma sequência lógica, iniciando-se com a descrição dos dados mais importantes. Tabelas e figuras devem ser restritas àquelas necessárias para argumentação e a descrição dos dados no texto deve ser restrita aos mais importantes. Os gráficos devem ser utilizados para destacar os resultados mais relevantes e resumir relações complexas. Dados em gráficos e tabelas não devem ser duplicados nem repetidos no texto. Os resultados numéricos devem especificar os métodos estatísticos utilizados na análise.

D) Discussão: A partir dos dados obtidos e resultados alcançados, os novos e importantes aspectos observados devem ser interpretados à luz da literatura científica e das teorias existentes no campo. Argumentos e provas baseadas em comunicação de caráter pessoal ou divulgadas em documentos restritos não podem servir de apoio às argumentações do autor. Tanto as limitações do trabalho quanto suas implicações para futuras pesquisas devem ser esclarecidas. Incluir somente hipóteses e generalizações baseadas nos dados do trabalho. As conclusões podem finalizar esta parte, retomando o objetivo do trabalho ou serem apresentadas em item separado.

E) Agradecimentos: Este item é opcional e pode ser utilizado para mencionar os nomes de pessoas que, embora não preencham os requisitos de autoria, prestaram colaboração ao trabalho. Será preciso explicitar o motivo do agradecimento, por exemplo, consultoria científica, revisão crítica do manuscrito, coleta de dados etc. Deve haver permissão expressa dos nomeados e o autor responsável deve anexar a Declaração de Responsabilidade pelos Agradecimentos. Também pode constar desta parte apoio logístico de instituições.

2.3 CITAÇÃO NO TEXTO: A exatidão das referências é de responsabilidade dos autores. Devem ser indicadas pelo seu número na listagem, na forma de expoente, sem uso de parênteses, colchetes e similares. Nos casos em que há citação do nome do autor, o número da referência deve ser colocado a seguir do nome do autor. Trabalhos com dois autores devem fazer referência aos dois autores ligados por “e”. Nos outros casos apresentar apenas o primeiro autor (seguido de et al, em caso de autoria múltipla).

Exemplos: Nos Estados Unidos e Canadá, a obrigatoriedade da declaração dos nutrientes no rótulo do alimento é mais antiga e foram desenvolvidos métodos hidrolíticos, como o AOAC 996.06¹, de extração e determinação da GT por cálculo a partir dos AG obtidos por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC/DIC)^{2,3}.

Segundo Chang et al³¹, o aumento do tamanho das partículas resulta numa redução da área de superfície conferindo uma melhora na retenção e estabilidade das mesmas.

2.4 REFERÊNCIAS: Listadas ao final do texto, devem respeitar a quantidade definida para cada categoria de artigos aceitos pela RIAL. As referências devem ser normalizadas de acordo com o estilo Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication, numeradas consecutivamente na ordem em que foram mencionadas a primeira vez no texto.

Os títulos de periódicos devem ser referidos de forma abreviada, de acordo com o Medline, disponível no endereço <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=journals>. Para consultar periódicos nacionais e latino-americanos: <http://portal.revistas.bvs.br/main.php?home=true&lang=pt>.

No caso de publicações com até seis autores, citam-se todos; acima de seis, citam-se os seis primeiros, seguidos da expressão latina “et al”. Referências de um mesmo autor devem ser organizadas em ordem cronológica crescente.

Exemplos:

Artigos de periódicos:

Aued-Pimentel S, Zenebon O. Lipídios totais e ácidos graxos na informação nutricional do rótulo dos alimentos embalados: aspectos sobre legislação e quantificação. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2009;68(2):121-6.

Weihrauch JL, Posati LP, Anderson BA, Exler J. Lipid conversion factors for calculating fatty acids contents of foods. *J Am Oil Chem Soc*. 1977;54:36-40.

Henington EA. Acolhimento como prática interdisciplinar num programa de extensão. *Cad Saude Coletiva* [Internet]. 2005;21(1):256-65. Disponível em: [<http://www.scielo.br/pdf/csp/v21n1/28.pdf>].

Livros:

Ringsven MK, Bond D. *Gerontology and leadership skills for nurses*. 2ª ed. Albany (NY):Delmar Publishers;1996.

Lopez D, organizador. *Estudos epidemiológicos qualitativos*. São Paulo: James Martim; 2009.

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

Foley KM, Gelband H, editors. *Improving palliative care for cancer*. Washington: National Academy Press 2001 [acesso 2003 Jul 13]. Disponível em: [http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=10149].

Capítulos de livro:

Wirdh L. História da Epidemiologia. In: Lopez D, organizador. *Estudos epidemiológicos qualitativos*. São Paulo: James Martim; 2009.p.64-76.

Dissertações, teses e monografias:

Santos EP. Estabilidade química da manteiga da terra [dissertação de mestrado]. Bananeiras (PB): Universidade Federal da Paraíba;1995.

Moreschi ECP. Desenvolvimento e validação de métodos cromatográficos e avaliação da estabilidade de vitaminas hidrossolúveis em alimentos [tese de doutorado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2006.

Trabalhos de congressos, simpósios, encontros, seminários e outros:

Barboza et al. Descentralização das políticas públicas em DST/AIDS no Estado de São Paulo. III Encontro do Programa de Pós-Graduação em Infecções e Saúde Pública; agosto de 2004; São Paulo: Rev Inst Adolfo Lutz. p. 34 [resumo 32-SC].

Dados eletrônicos:

Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo – SABESP. O que fazemos/Qualidade da água. [acesso 2008 Set 17]. Disponível em: [http://www.sabesp.com.br/CalandraWeb/CalandraRedirect/?temp=4&proj=sabesp&pub=T&db=&doci].

Legislação:

Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil. Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1, nº7-E. p.45-53.

Autoria institucional:

Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - Brasil). Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4ª ed. [1ª ed. digital]. São Paulo (SP): Instituto Adolfo Lutz; 2008. Disponível em: [http://www.ial.sp.gov.br/index.php?option=com_remository&Itemid=7&func=select&orderby=1&Itemid=7].

Organización Mundial de la Salud – OMS. Como investigar el uso de medicamentos em los servicios de salud. Indicadores seleccionados del uso de medicamentos. Ginebra; 1993. (DAP. 93.1).

Patente:

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

Casos não contemplados nesta instrução devem ser citados conforme indicação do Committee of Medical Journals Editors (Grupo Vancouver), disponível em: <http://www.cmje.org>.

Referências a documentos não indexados na literatura científica mundial, em geral de divulgação circunscrita a uma instituição ou a um evento (teses, relatórios de pesquisa, comunicações em eventos, dentre outros) e informações extraídas de documentos eletrônicos, não mantidas permanentemente em sites, se relevantes, devem figurar no rodapé das páginas do texto onde foram citadas.

2.5 Números de figuras e tabelas: A quantidade de figuras e tabelas de cada manuscrito deve respeitar a quantidade definida para cada categoria de artigos aceitos pela RIAL. Todos os elementos gráficos ou tabulares apresentados serão identificados como figura ou tabela, e numerados sequencialmente a partir de um, e não como quadros, gráficos etc.

A) Tabelas: Devem ser redigidas em processador de texto Word for Windows 2003 ou compatível e serem apresentadas em arquivos separados, numeradas consecutivamente com algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto. A cada uma deve-se atribuir um título breve, não se utilizando traços internos horizontais ou verticais. As notas explicativas devem ser limitadas ao menor número possível e colocadas no rodapé das tabelas e não no cabeçalho ou título. Se houver tabela extraída de outro trabalho, previamente publicado, os autores devem solicitar formalmente autorização da revista que a publicou, para sua reprodução.

B) Figuras: As ilustrações (fotografias, desenhos, gráficos etc.) devem ser citadas como Figuras, apresentadas em arquivos separados e numeradas consecutivamente com algarismos arábicos na ordem em que foram citadas no texto. Devem conter título e legenda apresentados na parte inferior da figura. Só serão admitidas para publicação figuras suficientemente claras e com qualidade digital que permitam sua impressão, preferencialmente no formato vetorial. No formato JPEG, a resolução mínima deve ser de 300 dpi. Figuras em cores serão publicadas quando for necessária à clareza da informação e os custos deverão ser cobertos pelos autores. Se houver figura extraída de outro trabalho, previamente publicado, os autores devem solicitar autorização, por escrito, para sua reprodução.

3. DECLARAÇÕES E DOCUMENTOS SOLICITADOS: Em conformidade com as diretrizes do International Committee of Medical Journal Editors, são solicitados alguns documentos e declarações do(s) autor(es) para a avaliação de seu manuscrito. Observe a relação dos documentos abaixo e, nos casos em que se aplique, anexe o documento ao processo. O momento em que tais documentos serão solicitados é variável:

| Documento/declaração | Quem assina | Quando anexar |
|---------------------------------------|-------------------|---------------|
| Carta de Apresentação | Todos | Submissão |
| Responsabilidade pelos Agradecimentos | Autor responsável | Aprovação |
| Transferência de Direitos Autorais | Todos | Aprovação |

A carta de Apresentação do manuscrito, assinada por todos os autores, deve conter:

▪ Um parágrafo declarando a responsabilidade de cada autor: ter contribuído substancialmente para a concepção e planejamento ou análise e interpretação dos dados; ter contribuído significativamente na elaboração do rascunho ou na revisão crítica do conteúdo; e ter participado da aprovação da versão final do manuscrito. Para maiores informações sobre critérios de autoria, consulte a página do ICMJE (<http://www.icjme.org>).

Um parágrafo contendo a declaração de potenciais conflitos de interesses dos autores.

Um parágrafo contendo a declaração que o trabalho não foi publicado, parcial ou integralmente, em outro periódico. Todos os autores devem ler, assinar e enviar documento transferindo os direitos autorais. O artigo só será liberado para publicação quando esse documento estiver de posse da RIAL.

4. VERIFICAÇÃO DOS ITENS EXIGIDOS NA SUBMISSÃO:

1. Nome e instituição de afiliação de cada autor, incluindo e-mail e telefone do autor responsável.
2. Título do manuscrito, em português e inglês.
3. Texto apresentado em letras Times New Roman, corpo 12, em formato Word ou similar (doc, txt, rtf).
4. Resumos em dois idiomas, um deles obrigatoriamente em inglês.
5. Carta de Apresentação assinada por todos os autores.
6. Nome da agência financiadora e número(s) do processo(s).
7. No caso de artigo baseado em tese/dissertação, indicar o nome da instituição/Programa, grau e o ano de defesa.
8. Referências normalizadas segundo estilo Vancouver, ordenadas pela citação no texto e numeradas, e se todas estão citadas no texto.
9. Tabelas numeradas sequencialmente, com título e notas, e no máximo com 12 colunas, em formato Word ou similar (doc, txt, rtf).
10. Figura no formato vetorial ou em pdf, ou tif, ou jpeg ou bmp, com resolução mínima 300 dpi.

5. REVISÃO DA REDAÇÃO CIENTÍFICA: Para ser publicado, o manuscrito aprovado é submetido à revisão da redação científica, gramatical e de estilo. A RIAL se reserva o direito de introduzir alterações nos originais, visando a manutenção da homogeneidade e qualidade da publicação, respeitando, porém, o estilo e as opiniões dos autores. Inclusive a versão em inglês do artigo terá esta etapa de revisão.

6. PROVAS: Após sua aprovação pelos editores, o manuscrito será revisado quanto à redação científica. O autor responsável pela correspondência receberá as provas gráficas para revisão por correio eletrônico em formato pdf (portable document format). O prazo máximo para a revisão da prova é de dois dias. É importante cumprir os prazos de revisão para garantir a publicação no fascículo programado. Atrasos nesta fase poderão resultar em remanejamento do artigo para fascículos subsequentes.

7. PUBLICAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO: Os artigos serão publicados em ordem cronológica de aprovação. As datas de recebimento e de aprovação do artigo constarão obrigatoriamente no mesmo.

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

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

Assessoria Editorial:

TIKINET

www.tiki.net.br/tiki



SECRETARIA
DA SAÚDE

