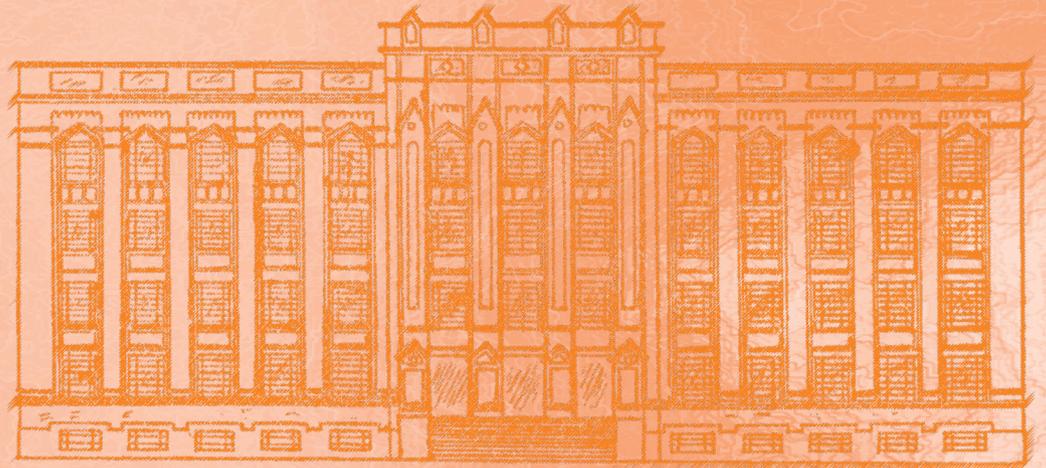


# REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

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



Volume 74 número 4, 2015







Secretaria de Estado da Saúde  
Coordenadoria de Controle de Doenças  
Instituto Adolfo Lutz

# REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

---

Volume 74 número 4, 2015  
Outubro – Dezembro 2015

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



## Diretor Geral do Instituto Adolfo Lutz

Hélio Hehl Caiaffa Filho

### 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  
Lilian Nunes Schiavon  
Sylia Rehder

### Editor Chefe

Pedro Luiz Silva Pinto

### Editor Adjunto

Adriana Bugno

### Núcleo de Acervo

Rocely Aparecida Bueno Moita

### Diagramação

Claudia Cristiane de Araujo

---

## 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.  
Ligia 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  
2015, 74(4)

ISSN 0073-9855      CDD<sub>18</sub> 614.07205

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

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

Normas para catalogação de publicações seriadas especializadas, São Paulo, Ed. Polígono, 1072.

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://www.ial.sp.gov.br/>

Portal de Revistas em Veterinária e Zootecnia

<http://revistas.bvs-vet.org.br/rialutz>

Portal de Revistas Saúde SP

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

Cartas ao editor:

Endereço / Address

Núcleo de Acervo

Av. Dr. Arnaldo, 355, 01246-000 São Paulo/ SP – Brasil

Tel/ Fax. + 55 11 3068-2869

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



## Rev Inst Adolfo Lutz. 2015; 74 (4)

### ■ ARTIGO ORIGINAL/ORIGINAL ARTICLE

- 1666 Padronização da metodologia dot-ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* em saliva**  
Standardization of dot-ELISA methodology for detection of IgG antibodies anti-*Toxoplasma gondii* in saliva  
Barbara Fialho Carvalho SAMPAIO, Luciana Regina MEIRELES, Heitor Franco de ANDRADE JÚNIOR..... 310-319
- 1667 Validação de ensaio imunoenzimático utilizando-se o Conceito do Erro Total, os Perfis de Exatidão e o Índice de Exatidão como alternativa à abordagem clássica do ICH**  
Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay by using the Total Error Concept, the Accuracy Profiles and the Accuracy Index as alternatives to the traditional ICH approach  
Jorge Luiz dos Santos POSSAS, Jarbas Emilio dos SANTOS, Michele Cardoso do NASCIMENTO, Patrícia Alves dos SANTOS, Deivid Wanderson Couto dos ANJOS, Eduardo de Bonis de BRITTO, Antônio Eugênio Castro Cardoso de ALMEIDA, Wlamir Corrêa de MOURA ..... 320-336
- 1668 Avaliação da concordância entre as linhagens de camundongos Swiss Webster e B6D2F1 no teste de potência da Eritropoietina Humana Recombinante (rhEPO): a experiência do Laboratório Nacional de Controle**  
Evaluation of the agreement between Swiss Webster and B6D2F1 mice lineages in the potency test of Recombinant Human Erythropoietin (rhEPO): the Brazilian National Control Laboratory experience  
Michele Cardoso do NASCIMENTO, Clarice Lima do Canto ABREU, Rodrigo Netto COSTA, Wlamir Corrêa de MOURA, Isabella Fernandes DELGADO..... 337-346
- 1669 Determinação de fluoreto em baixas concentrações: validação de método com eletrodo íon seletivo para análise da água utilizada na preparação de soluções de diálise**  
Determination of fluoride at low concentrations: validation of method using ion selective electrode to analyze the water used in the preparation of dialysis solutions  
Sérgio DOVIDAUSKAS, Isaura Akemi OKADA, Marina Miyuki OKADA, Rita de Cássia BRIGANTI, Camila Cardoso de OLIVEIRA..... 347-360
- 1670 Validação de um método prático para determinação de níveis de amoxicilina em águas naturais por CLAE-UV e sua aplicação na qualidade ambiental**  
Validation of a practical method for determination of amoxicillin contents in natural waters by means of HPLC-UV and its application in the environmental quality  
Caio Matheus da Rocha Couqueiro Monteiro de OLIVEIRA, Kaíque Mesquita CARDOSO, Milena Mendes de SOUZA, José Soares dos SANTOS, Maria Lúcia Pires dos SANTOS ..... 361-370

- 1671 Avaliação da técnica PCR *multiplex* para detecção de fraude por adição de carne bubalina em carne moída bovina**  
Evaluation of a multiplex PCR for detection of a fraud in the minced beef meat by adding buffalo meat  
Andrey Carlos do Sacramento de OLIVEIRA, Bárbara Cristina Amorim FERREIRA, Gabrielle Virgínia Ferreira CARDOSO, Cleyzer Lopes SILVA, Andréia Silva da SILVA, Flávio da SILVA, Rafael Monteiro de MELO, Diogo José CARDILLI, Fábio Pereira Leivas LEITE, Talita Bandeira ROOS, Carina Martins de MORAES ..... 371-379
- 1672 Composição centesimal de iogurtes tradicionais e iogurtes líquidos: incompatibilidade com as descrições da rotulagem**  
Centesimal composition of traditional yoghurts and drinking yoghurts: inconsistency with the descriptions on the labels  
Heloísa Fernanda Bandeira PACHECO, Letícia Maria Nogueira SÍGOLO, Ana Paula Badan RIBEIRO, Julicristie Machado de OLIVEIRA ..... 380-389
- 1673 Composição proximal e mineral de biscoitos tipo amanteigado enriquecidos com diferentes farinhas de casca de frutas**  
Proximal and mineral composition of buttery biscuits enriched with different fruits peel flours  
Myrian Dayane Santana NOVAES, Adriana Paiva de OLIVEIRA, Thais HERNANDES, Erika Cristina RODRIGUES, Keyla dos Santos SIGARINI, Francisca Graciele Gomes PEDRO, Ricardo Dalla VILLA ..... 390-398
- 1674 Ocorrência de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* resistentes a antimicrobianos e parasitos *Entamoeba coli* e *Ascaris lumbricoides* em merendas escolares**  
Occurrence of antibiotic-resistant *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* and of *Entamoeba coli* and *Ascaris lumbricoides* parasites in the school snacks  
Daiane Bertholin ANSELMO, Catierine Hirsh WERLE, Fernando Leite HOFFMANN<sup>(in memorian)</sup> ..... 399-409
- 1675 Qualidade de frutas e hortaliças orgânicas comercializadas em feiras livres**  
Quality of organic fruits and vegetables sold in street markets  
Amanda Brinco FERREIRA, Sandra Helena Ferreira de ALVARENGA, Jackline Freitas Brilhante de SÃO JOSÉ ..... 410-419
- 1676 Qualidade microbiológica do alho (*Allium sativum*) produzido e comercializado em mercados públicos**  
Microbiological quality of garlic (*Allium sativum*) produced and sold in public markets  
Luiza Mayara dos Santos FONTENELE, Maria Liliame Ximendes AZEVEDO, Francisco das Chagas CARDOSO FILHO, Maria Christina Sanches MURATORI, Leonel Rômulo Souza de SÁ, Maria Marlúcia Gomes PEREIRA ..... 420-425
- 1677 Parâmetros de qualidade de polpas de frutas congeladas**  
Parameters of quality of frozen fruit  
Tânia Maria Neves CASTRO, Pâmella Volpato ZAMBONI, Silvia DOVADONI, Adelino CUNHA NETO, Luiz José RODRIGUES ..... 426-436
- COMUNICAÇÃO BREVE/ BRIEF COMMUNICATION
- 1678 Detection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* by PCR in samples collected by scraping the lesion edges from patients of an endemic area**  
Detecção de *Leishmania (Viannia) braziliensis* por PCR em amostras coletadas por raspagem de bordas de lesões de pacientes de uma área endêmica  
Aparecida Helena de Souza GOMES, Izabel Madornado ARMELIN, Vera Lucia PEREIRA-CHIOCCOLA ..... 437-441
- 1679 Importância da atuação do Laboratório de Saúde Pública nas perícias judiciais relacionadas a matérias estranhas em alimentos**  
Importance of the Public Health Laboratory on the expert advice requested by the courts regarding foreign matter in food  
Sonia de Paula Toledo PRADO, Cristina Eico YOKOSAWA, Roberta Ribeiro Costa ROSALES ..... 442-446

---

<b>1680</b>	<b>Avaliação das características físico-químicas da carne de perna de avestruz (<i>Struthio camelus</i>) para produção de embutidos</b>	
	Evaluation of physical-chemical characteristics of the meat from the of ostrich ( <i>Struthio camelus</i> ) leg for sausage production	
	Edvaldo Vasconcelos de CARVALHO FILHO, João Andrade da SILVA.....	447-452
■ RELATO DE CASO/ CASE REPORT		
<b>1681</b>	<b>Esporotricose em cão Yorkshire Terrier na cidade de São Paulo, SP – Brasil: relato de caso</b>	
	Sporotrichosis in Yorkshire Terrier dog in the city of São Paulo, SP – Brazil: case report	
	Fernanda Fidelis GONSALES, Juliana Mariotti GUERRA, Danilo Gouveia WASQUES, Rodrigo Albegaria RÉSSIO, Paulo Eduardo BRANDÃO, Laura Yaneth VILLARREAL Buitrago, Natália Coelho Couto de Azevedo FERNANDES.....	453-457
■ RESUMOS DE TESES E DISSERTAÇÕES		
<b>1682</b>	<b>Avaliação de diferentes vias de imunização com novo adjuvante para <i>Neisseria meningitidis</i> em diferentes linhagens de camundongos</b>	
	Evaluation of different immunization routes with new adjuvant for <i>Neisseria meningitidis</i> in different strains of mouse	
	Brito LT.....	458
<b>1683</b>	<b>Imunogenicidade de antígenos de vesículas de membrana externa (OMVs) de <i>Neisseria meningitidis</i> B associado a lipíde catiônico (DDA-BF)</b>	
	Immunogenicity of <i>Neisseria meningitidis</i> B outer membrane vesicles (OMVs) associated with cationic lipid (DDA-BF)	
	Rinaldi FM.....	459
■ COLABORADORES .....460-467		
■ INSTRUÇÕES AOS AUTORES.....468-476		

# Padronização da metodologia *dot*-ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* em saliva

## Standardization of *dot*-ELISA methodology for detection of IgG antibodies anti-*Toxoplasma gondii* in saliva

RIALA6/1666

---

Barbara Fialho Carvalho SAMPAIO\*, Luciana Regina MEIRELES, Heitor Franco de ANDRADE JÚNIOR

\*Endereço para correspondência: Laboratório de Protozoologia, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo. Av. Dr. Eneas de Carvalho Aguiar, 470, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 05403-000. Tel: 11 3061-7010. E-mail: bcarvalho@usp.br

Recebido: 15.07.2015 - Aceito para publicação: 21.12.2015

---

### RESUMO

O diagnóstico da infecção pelo *T. gondii* é usualmente feito pelas técnicas sorológicas, mas a amostra (soro ou plasma) pode ser restrita em determinados grupos protegidos, em que a coleta de sangue é considerada agressiva e invasiva. Os anticorpos são encontrados em outros materiais biológicos, de coleta não invasiva, como a saliva. Os métodos de detecção de anticorpos no mercado estão padronizados para utilizar amostras de soro, e há metodologias alternativas de maior sensibilidade utilizando-se saliva, mas estas requerem equipamentos de difícil uso no campo. *Dot*-ELISA tem alta sensibilidade e leitura visual sem equipamentos, que facilita a execução de ensaio em campo utilizando-se técnica de triagem rápida e eficiente. Neste contexto, foi padronizado o *dot*-ELISA de alta sensibilidade para detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em saliva e soro, utilizando-se amostras de 20 voluntários adultos. A sensibilidade e a especificidade do *dot*-ELISA padronizado foram semelhantes em soro e saliva, com exata distinção de amostras positivas e negativas, mesmo na ocorrência de baixas concentrações de anticorpos como na saliva. A saliva mostra ser material biológico adequado para detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em estudos epidemiológicos da toxoplasmose em crianças ou outros grupos protegidos, em que a coleta de sangue é restrita.

**Palavras-chave.** toxoplasmose, saliva, imunoglobulina G, imunoenensaio, *dot*-ELISA.

### ABSTRACT

The diagnosis of *T. gondii* infection is usually performed by serological tests, but the blood collection could be restricted in some groups as children. Antibodies are also found in other biological materials, such as saliva, whose sampling has been done by means of non-invasive procedure. Commercially available assays for performing antibody detection are standardized for analyzing serum samples. There are alternative techniques for detecting antibody in saliva, however they demand the use of equipment which is not easy to be used in field. *Dot*-ELISA is highly sensitivity and the results are of visual reading without any equipments, being available to be used in field studies, by means a rapid and efficient screening technique. Thus, a *dot*-ELISA with high sensitivity was standardized for detecting anti-*T. gondii* antibodies in saliva and serum by using samples from 20 adult volunteers. Sensitivity and specificity of the standardized *dot*-ELISA were similar in both saliva and serum samples, and precisely distinguishing the positive and negative samples, even in low antibody concentration-containing sample as saliva. Saliva showed to be as a potential biological material for detecting anti-*T. gondii* antibody in epidemiological studies on toxoplasmosis in children or other protected groups, where the blood collection is restricted.

**Keywords.** toxoplasmosis, saliva, immunoglobulin G, immunoassay, *dot*-ELISA.

## INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma doença causada pelo coccídeo *Toxoplasma gondii* que apresenta alta infecciosidade e baixa patogenicidade em hospedeiros humanos com abrangência cosmopolita, afetando grande fração da população humana<sup>1</sup>. A infecção é adquirida através da ingestão de oocistos, em solo, água ou presentes em frutas e verduras mal lavadas, cistos em carne crua ou malcozida e pela infecção transplacentária<sup>2</sup>. Outras formas menos frequentes de adquirir a doença são transfusão sanguínea, transplantes de órgãos e acidentes laboratoriais<sup>3</sup>. O agente pode ser isolado durante a fase aguda da infecção ou em reativações em componentes orgânicos de diversos tipos, tais como sangue, líquido cefalorraquidiano, saliva e medula óssea, assim como dos conteúdos coletados de infiltrados cutâneos, de manifestações exantemáticas, do baço e especialmente, de gânglios linfáticos, mas o isolamento é demorado e a detecção de ácidos nucleicos de sensibilidade variável<sup>4</sup>.

Assim, a principal ferramenta para o diagnóstico da toxoplasmose é a detecção de anticorpos no sangue. Diversas provas sorológicas foram preconizadas para o diagnóstico laboratorial da toxoplasmose, como: reação de Sabin – Feldman<sup>5</sup>; reação de aglutinação do látex<sup>6</sup>; reação de fixação de complemento<sup>7</sup>; reação de hemaglutinação indireta<sup>8</sup>; reação de imunofluorescência indireta<sup>2</sup> e diversas reações imunoenzimáticas (ELISA) de diversos desenhos e revelações, além de *immunoblotting* ou *western blotting* e *dot-ELISA*<sup>9</sup>.

Todos os testes comerciais de detecção de anticorpos na toxoplasmose são desenhados para o uso de soro, que apresenta concentração alta e semelhante de IgG entre as amostras, mas sua coleta implica em pequena invasão do hospedeiro. Em estudos de incidência de doenças de alta prevalência e cicatriz sorológica, como a toxoplasmose<sup>10</sup>, o grupo alvo de detecção de incidência é o menos exposto ou recentemente exposto, ou seja, crianças e escolares pela pouca idade e tempo de exposição, já que a toxoplasmose é cosmopolita

e tem poucas regiões de baixa prevalência<sup>11</sup>.

A saliva é um fluido específico proveniente da secreção das glândulas salivares como a parótida, submandibular, sublingual e glândulas menores, acrescida de substâncias oriundas do fluido crevicular gengival com IgG, secreções brônquicas ou nasais, células epiteliais descamadas, restos de alimentos, micro-organismos e produtos de seus metabólicos<sup>12</sup>.

Como alternativa na detecção de IgG específica, a saliva pode oferecer a facilidade de coleta, de baixo custo e conforto ao paciente (principalmente crianças), além de ser um material de fácil manuseio nos procedimentos diagnósticos. Sua principal desvantagem é a quantidade variável de IgG e a necessidade de refrigeração<sup>13</sup>. Granade et al<sup>14</sup> já preconizavam o uso da saliva para a detecção de IgG específico para rubéola e vírus da imunodeficiência humana tipo I, e Santos et al<sup>15</sup> também demonstraram o potencial da saliva para o imunodiagnóstico da infecção por *Schistosoma mansoni*. Na toxoplasmose, a saliva foi eficiente para pesquisa de anticorpos IgA, IgM e IgG quando comparada a amostras pareadas de soro, usando *immunoblot* e aglutinação direta<sup>16</sup>. A presença de IgG anti-*T. gondii* em saliva foi demonstrada por *immunoblot*, com alta especificidade para triagem laboratorial da toxoplasmose<sup>17</sup>. Para investigar o potencial uso da saliva para detecção de anticorpos contra *Toxoplasma gondii*, Loyola et al<sup>18</sup> realizaram estudos epidemiológicos e de vigilância da toxoplasmose, demonstrando a aplicabilidade da detecção de anticorpos IgA na saliva como marcadores de toxoplasmose aguda em ensaios de ELISA.

O *dot-ELISA* tem sido descrito como um método diagnóstico eficiente para doenças infecciosas parasitárias como a esquistossomose<sup>19</sup>, a toxoplasmose<sup>20,21</sup> e a angiostrongilíase<sup>22</sup>. Este teste é um método sensível, rápido, de baixo custo e de fácil aplicação na rotina laboratorial, permitindo a detecção de anticorpos em pequenas quantidades de amostra sem uso de equipamentos.

Normalmente, os estudos sorológicos têm utilizado a coleta de sangue, através de punção

clássica por agulha com produção de soro ou coletas de sangue total com lanceta e em papel filtro. Os dois materiais, com diferentes graus de pureza, são fontes de IgG específica, detectadas por testes de diferentes sensibilidades e especificidades, no caso da toxoplasmose humana.

Nossa alternativa foi o uso de saliva, que possuem IgG secretada, através de coleta simples seguida de concentração, o que permite a detecção de IgG específica contra o agente em diversos grupos. Por estas razões, otimizamos o teste dot-ELISA para detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em amostras pareadas de soro e saliva, trabalhando com uma saliva concentrada 10X como descrito em metodologia, permitindo resultados mais específicos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras e antígenos

A pesquisa foi conduzida dentro dos padrões exigidos pela Resolução 466 de 12 de dezembro de 2012 do Ministério da Saúde. Todos os voluntários trouxeram ou assinaram o TCLE, contendo todos os procedimentos a serem desenvolvidos, conforme a resolução nº 196/96, que regulamenta a pesquisa envolvendo seres humanos. Vale ressaltar que este estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP e aprovado sob o processo nº 23109613.1.0000.0065.

Foram testadas 20 amostras de soro e saliva pelas técnicas de ELISA e dot-ELISA. Todas as amostras de soro foram validadas pelo teste comercial Elecsys Toxo IgG/IgM (Roche Diagnostics®, Somerville, NJ, USA), no setor de Imunologia da Divisão do Laboratório Central do Hospital das Clínicas – FMUSP. Das 20 amostras de soro validadas pelo Laboratório Central do Hospital das Clínicas – FMUSP, 4 amostras de soro foram positivas e 16 amostras de soro foram negativas. Os voluntários eram alunos de pós-graduação do Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

Suspensões de taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* foram mantidas no Laboratório

de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, por meio de sucessivas passagens com intervalos de 3 a 4 dias, em camundongos *Swiss* não isogênicos, pesando em torno de 20 g, e com idade variando entre 30 e 60 dias. Os animais previamente infectados foram submetidos à eutanásia por narcose em câmara de CO<sub>2</sub> e o peritônio lavado com 5 mL de solução salina tamponada com fosfato 0,01M pH 7,2 (PBS) estéril contendo penicilina cristalina 2500 UI/mL e estreptomicina 10 mg/mL. Após quantificação em câmara de Neubauer, os parasitas foram diluídos apropriadamente em PBS e cada animal recebeu 10<sup>7</sup> taquizoítos por inóculo intraperitoneal. A suspensão parasitária, obtida através do lavado peritoneal de animais infectados, foi purificada por filtração em membrana de policarbonato 5 µm (Millipore®) e centrifugada a 700 g por 10 min a 4 °C. Estes taquizoítos livres de células foram contados e estocados a -20 °C até o momento do uso. O extrato antigênico salino (antígeno salino<sup>23</sup>) foi obtido de antígeno protéico solúvel de *T. gondii* com concentração de 3 x 10<sup>8</sup> taquizoítos da cepa RH. O precipitado foi suspenso em 5 mL de água destilada submetido à sonicação (0,40 MHz, 4 Vdc) por 4 períodos de 30 segundos, em banho de gelo via sonicador de ponta Thornton®. Após certificação microscópica da lise total dos taquizoítos, foi acrescentado 5 mL de solução de NaCl 0,3 M sendo a suspensão centrifugada a 10.000g a 4 °C por 30 min, em centrífuga refrigerada Eppendorf 5403. O sobrenadante foi separado em alíquotas e mantidas à -70 °C até o momento de seu uso. Todas as reações foram realizadas com uma mesma partida de antígeno. O extrato antigênico alcalino (antígeno alcalino) foi obtido a partir de uma suspensão de 3 x 10<sup>8</sup> taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* que foi tratada com 20 mL de NaOH a 0,15 M e mantida a 4 °C por 6 h. Em seguida, a solução antigênica foi neutralizada com HCl 0,3 M para o pH 7,5, e estocada em alíquotas a -20 °C. Para aumentar o rendimento também foi realizada a extração de antígeno de parasita por detergente suave, desoxicolato de sódio.

Extrato protéico solúvel por detergente desoxicolato de sódio (DOC): uma suspensão de  $3 \times 10^8$  taquizoítos da cepa RH foi tratada com DOC nas concentrações de 0,1 % e 0,5 % em Tris-HCl. Após 30 min de incubação a 4 °C, a suspensão foi centrifugada a 10000g por 15 min a 4 °C e o precipitado descartado. O sobrenadante foi aliquoteado e estocado a -20 °C.

As dosagens protéicas dos diferentes preparados antigênicos foram efetuadas empregando-se o método de Bradford<sup>24</sup>. A qualidade do antígeno foi avaliada por eletroforese em poliacrilamida<sup>25</sup>, seguida de transferência para membranas e imunomarcção usando soro positivo humano, seguido de conjugado peroxidase anti-IgG humano, em condições convencionais<sup>26</sup>. As membranas foram fotografadas para documentação. Utilizamos o mesmo antígeno em ambos os testes imunoenzimáticos, diferenciando-se apenas as concentrações antigênicas para cada metodologia.

### Saliva

Para a intervenção da coleta de saliva utilizamos o que denominamos “kit coleta de saliva”, entregue a cada voluntário. Após a entrega do Termo de Consentimento Livre Esclarecido, os voluntários eram conduzidos para a coleta da saliva. Era realizada a higiene da cavidade oral, com uso de 25-40 mL de enxaguante oral (Listerine®), de uso comercial, bochechos e 03 lavagens da cavidade com água potável sem aditivos. Sem qualquer outro estímulo, foi solicitado para que os voluntários completassem com saliva até a marca de 05 mL ou mais do tubo de coleta, na dependência da produção individual de cada um. Nenhum voluntário foi convidado a coletar mais saliva do que o necessário para o teste. Após a intervenção, os tubos coletados contendo a saliva eram colocados em banho de gelo para evitar perdas e mantidos assim até seu transporte e processamento no Laboratório de Protozoologia, no mesmo dia.

### ELISA (Enzyme - Linked Immunosorbent Assay)

A técnica foi desenvolvida de acordo com a metodologia descrita por Venkatesan e Walklin<sup>27</sup>. Placas de poliestireno de 96 poços para microtitulação (Costar®) foram sensibilizadas com 100 µL/poço com proteínas de *T. gondii* em suas diferentes preparações. A leitura das densidades ópticas (D.O.) foi realizada em leitor automático de microplacas (Labsystems Multiskan MS) a 492 nm.

### Dot-ELISA

A técnica de *dot*-ELISA foi executada segundo a metodologia descrita por Hakes e Armstrong<sup>9</sup>, com modificações realizadas pelo Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical/USP, utilizando membrana de nitrocelulose (BioRad®), foram sensibilizadas com 50 µL/poço com antígeno solúvel de *T. gondii*, suspensos em tampão 0,1 M carbonato-bicarbonato de sódio pH 9,5, nas concentrações de 0,5 µg/mL para triagem de amostras de soro e 1,5 µg/mL de antígeno para amostras de saliva, utilizando-se um sistema *dot blot* de 96 poços (BioRad®). Após sensibilização, as membranas eram retiradas do sistema *dot blot*, cortadas em tiras de aproximadamente 0,4 mm e colocadas em bandejas de incubação com canaletas de 10,5 cm x 5 mm (BioRad®), onde foram bloqueadas com Solução Salina Tamponada Tween Leite 5 % (SSTTL), por 2 h em temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram lavadas três vezes por 5 min com SSTTL 0,05 % sob agitação. Em seguida, foram aplicados volumes de 500 µL/canaleta de amostras de soro ou saliva, com incubação por 1 h sob agitação em temperatura ambiente. Após a incubação, as membranas foram novamente lavadas três vezes e foram aplicados 500 µL/canaleta do conjugado anti-IgG humano na diluição de 1/10.000, sendo as amostras incubadas por 1 h em temperatura ambiente. Decorrido o tempo de incubação, as membranas foram novamente lavadas três vezes. A reação foi revelada utilizando-se como cromógeno o 3,3-diaminobenzidina (DAB), sendo aplicados 500 µL/canaleta da solução cromógena (10 µg DAB,

acrescido de 10 mL PBS e 15 µL de água oxigenada 30 %).

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os índices de sensibilidade relativa, especificidade relativa, co-positividade e co-negatividade, valores preditivos positivo e negativo, os intervalos de confiança de 95 % para proporções e a concordância entre testes (Índice Kappa) foram calculados pelo programa EpiInfo 6.04, usando a reação de ELISA como teste de referência. Os intervalos de confiança de 95 % e os índices relativos foram incluídos em todas as citações dada a amostragem reduzida.

## RESULTADOS

Para padronização dos nossos testes, utilizamos 20 amostras de soro e saliva estocadas no banco de material biológico do Laboratório de Protozoologia do IMTSP. As amostras de soro foram submetidas ao teste convencional de ELISA e validados pelo Laboratório Central do HC-FMUSP, sendo considerado nosso padrão ouro para análise da sensibilidade relativa, especificidade relativa e valores preditivos positivos e negativos para o teste de dot-ELISA. Estas amostras foram ensaiadas na diluição 1/100 frente às diferentes preparações antigênicas como demonstrado na Figura 1A. Dos 20 soros testados, 4 foram reagentes ao *T. gondii* e 16 foram

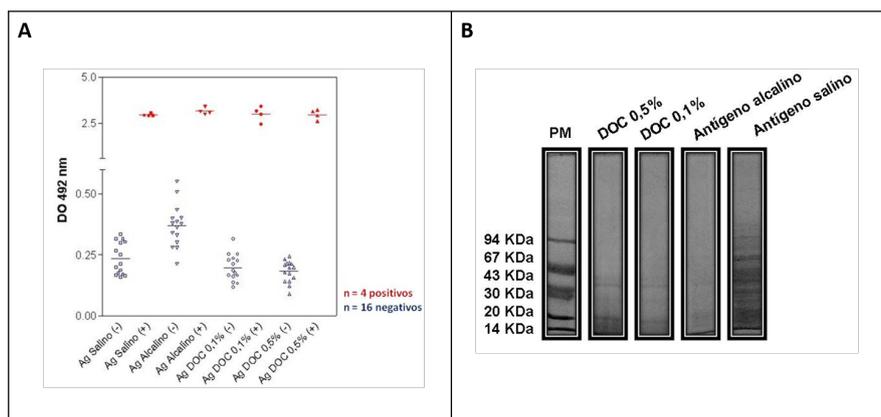
não reagentes.

Utilizando o teste estatístico *t student*, verificamos que o antígeno salino apresentou os melhores resultados, com clara distinção entre amostras positivas e negativas.

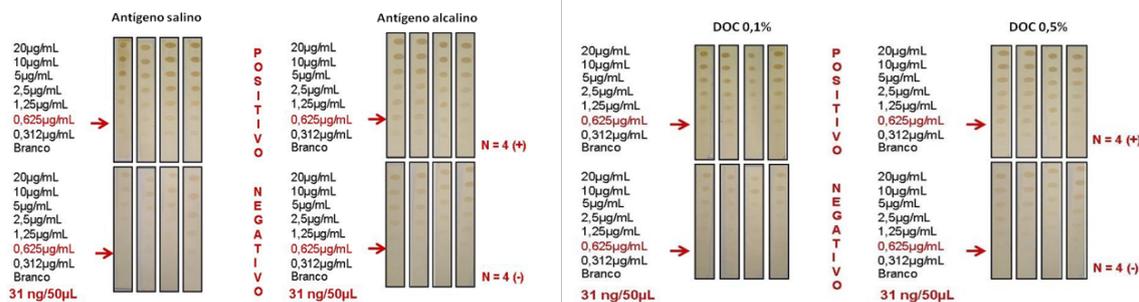
A partir dos resultados obtidos no ELISA para as amostras de soro, realizamos uma eletroforese das diferentes preparações antigênicas de *T. gondii* para verificarmos o perfil dos antígenos de cada preparação. Como podemos observar na Figura 1B, o extrato protéico salino foi o antígeno que revelou um maior número de frações antigênicas, mantendo, portanto, um maior número de epítomos protéicos capazes de se ligarem aos anticorpos presentes nos soros, o que confirma os melhores resultados do ELISA para esta preparação. As demais preparações apresentaram um número menor de bandas, provavelmente, por perdas maiores de epítomos durante o processamento do antígeno. Contudo, é possível visualizar em todas as preparações, uma banda de 30 KDa, que corresponde à proteína (p30), a mais abundante na superfície de taquizoítos de *T. gondii*.

Assim, o ensaio de ELISA com extrato protéico salino foi considerado o teste padrão ouro para análise posterior dos resultados do dot-ELISA.

Inicialmente, padronizamos o ensaio de dot-ELISA em amostras de soro, onde a concentração de IgG específica é maior, facilitando a detecção dos anticorpos e, em



**Figura 1.** A - Resultados do teste imunoenzimático ELISA para amostras de soro humano. Os soros positivos estão representados em vermelho e os negativos em azul. As linhas representam as médias de cada grupo; B- resultados da eletroforese para as diferentes preparações antigênicas de *T. gondii*. PM = padrão de peso molecular



**Figura 2.** Resultados da padronização da concentração protéica do antígeno salino, antígeno alcalino, antígenos DOC 0,1 % e DOC 0,5 % para a reação de *dot*-ELISA em amostras de soro humano

seguida, partimos para a padronização da técnica em amostras de saliva. Embora o extrato protéico salino tenha fornecido os melhores resultados no ELISA, continuamos a trabalhar com as diferentes preparações antigênicas durante a padronização do *dot*-ELISA, a fim de obtermos o máximo de eficiência em nosso teste.

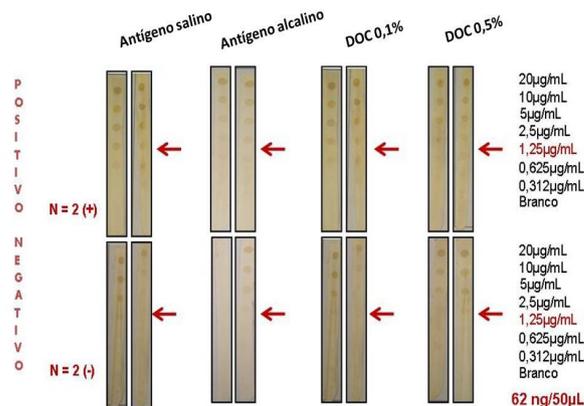
Para padronização da reação de *dot*-ELISA, utilizamos os soros na diluição 1/100, sendo as membranas de nitrocelulose sensibilizadas com diferentes preparações antigênicas em diferentes concentrações protéicas.

Como podemos observar na Figura 2, a concentração protéica ideal para todas as preparações antigênicas utilizadas no *dot*-ELISA para soro foi a de 0,625 µg/mL, que corresponde a 31 ng/50 µL, volume utilizado em cada poço da membrana no *dot blot* (Bio Rad®). Nesta concentração, foi possível distinguir claramente os soros positivos, com marcação (*dot*) bem definida, dos soros negativos, sem marcação visível ou com apenas uma pequena marcação de fundo sem definição, que corresponde ao *background* da reação.

Após padronização do *dot*-ELISA para soro, partimos para padronização da reação em amostras de saliva. Esta padronização foi realizada da mesma forma que a do *dot*-ELISA dos soros. Assim, podemos verificar na Figura 3 que a concentração protéica ideal em todas as preparações antigênicas foi a de 1,25 µg/mL que corresponde a 62 ng/50 µL, volume utilizado em cada poço da membrana no *dot blot* (Bio Rad®). Nesta concentração, foi possível

distinguir claramente as amostras de saliva positivas, com marcação (*dot*) bem definida, das amostras negativas, sem marcação visível ou com apenas uma pequena marcação de fundo sem definição, que corresponde ao *background* da reação.

Após padronização da concentração protéica ideal para as diferentes preparações antigênicas, avaliamos a reprodutibilidade intrateste da reação de *dot*-ELISA para saliva, através das marcações obtidas nos (*dots*) das quadruplicatas de cada saliva testada. Como podemos observar na Figura 4, os quatro (*dots*) da mesma amostra tiveram marcação semelhante, com mesmo grau de intensidade, confirmando a reprodutibilidade intrateste do *dot*-ELISA. Estes dados também



**Figura 3.** Resultados da padronização da concentração protéica para as diferentes preparações antigênicas utilizadas nas reações de *dot*-ELISA em amostras de saliva humana

podem ser confirmados nas Figuras 5A, 5B, 5C e 5D, que apresentam os resultados das quadruplicatas das amostras de saliva frente às diferentes preparações antigênicas. Já, para avaliar a reprodutibilidade interteste, comparamos as marcações (*dots*) das quadruplicatas de cada amostra, testadas em dias diferentes. Na Figura 4, podemos verificar uma boa reprodutibilidade dos resultados do primeiro e segundo teste, indicando que o dot-ELISA apresentou uma boa reprodutibilidade interteste.

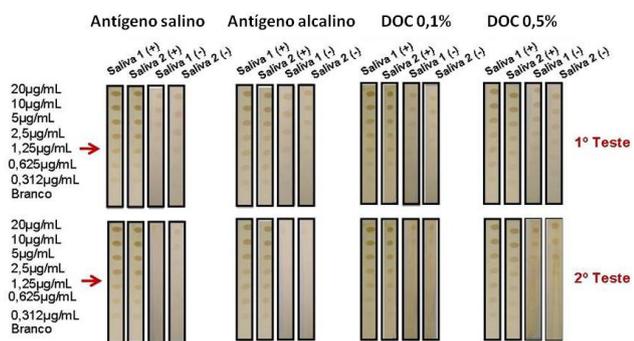
Após padronização da concentração protéica ideal de antígeno, avaliamos 20 amostras de saliva com seus respectivos soros, estocadas no banco de

material biológico do laboratório de Protozoologia do IMSTSP. Estas amostras foram testadas por dot-ELISA em quadruplicatas frente às diferentes preparações antigênicas. A sensibilidade relativa, especificidade relativa e valores preditivos positivos e negativos, de cada antígeno, foram calculados no programa EpiInfo 6.04, utilizando o ELISA do soro como teste de referência.

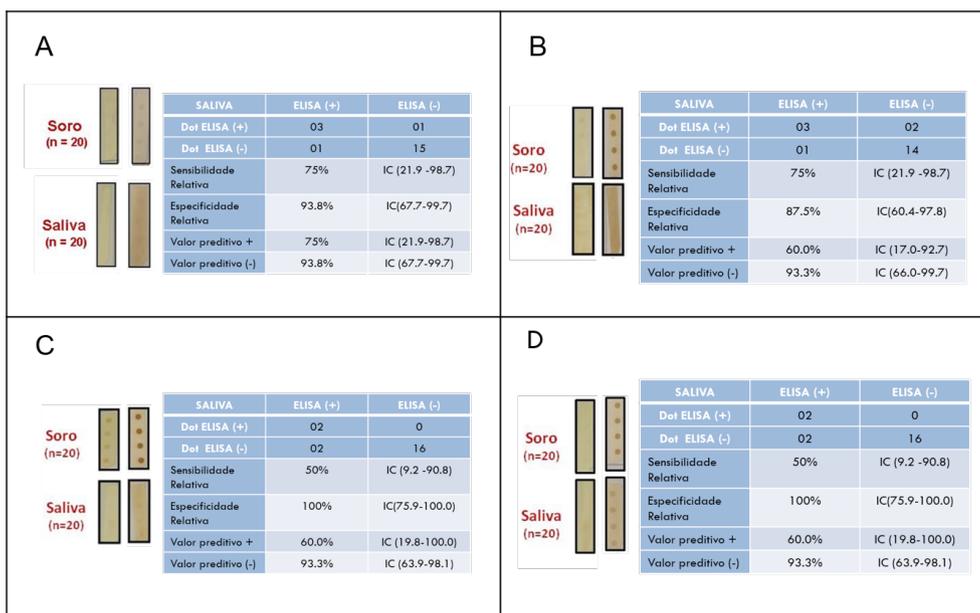
Como podemos observar na Figura 5A, o teste dot-ELISA com antígeno alcalino apresentou resultados discordantes do teste ELISA para as amostras de saliva, com um resultado falso positivo e um resultado falso negativo, diminuindo assim a sensibilidade relativa do dot-ELISA, tendo uma sensibilidade relativa de 75 % e especificidade relativa de 93,8 %.

O dot-ELISA com antígeno DOC 0,1 % (Figura 5B), apresentou resultados discordantes do teste ELISA, tanto para as amostras de soro como saliva, sendo um resultado falso negativo e dois resultados falsos positivos para saliva e 13 resultados falsos positivos para soro, com isso a sensibilidade relativa foi de 75 % e a especificidade relativa de 87,5 %.

Para o dot-ELISA com antígeno DOC 0,5 %, a presença de resultados discordantes do teste ELISA foi ainda maior como podemos verificar na Figura 5C, com dois resultados falso negativo



**Figura 4.** Resultado da reprodutibilidade da técnica dot-ELISA intrateste e interteste



**Figura 5.** Resultados dot-ELISA com antígeno alcalino (A), dot-ELISA com antígeno DOC 0,1 % (B), dot-ELISA com antígeno DOC 0,5 % (C) e dot-ELISA com antígeno salino (D), para amostras de soro e saliva estocadas no Laboratório de Protozoologia – IMTSP

para soro e dois resultados falsos positivos para saliva e 13 resultados falsos positivos para soro, sendo assim a sensibilidade relativa foi de 50 % e a especificidade relativa de 100 %.

O *dot*-ELISA com antígeno salino (Figura 5D) apresentou resultados concordantes com o teste ELISA, tanto para as amostras de soro como de saliva, tendo uma co-positividade e co-negatividade em amostras de soro e saliva, com 100 % de sensibilidade relativa e 100 % de especificidade relativa, sendo o antígeno mais promissor para ensaios futuros.

## DISCUSSÃO

Nossos dados mostram que o ensaio imunoenzimático *dot*-ELISA foi capaz de detectar anticorpos IgG anti-*T. gondii* em saliva com a mesma eficiência de detecção em soro, material mais utilizado para este fim. Esta abordagem de coleta de saliva é extremamente importante para determinados grupos específicos de pacientes, como as crianças, que são, muitas vezes, protegidas da coleta invasiva convencional de sangue. Isto tem uma implicação muito importante para o diagnóstico das doenças infecciosas, em especial, da toxoplasmose, já que permite a utilização de um material de fácil obtenção, sem necessidade de métodos invasivos de coleta, como é o caso do sangue.

Esta abordagem também tem apresentado resultados positivos para grupos de indivíduos adultos, colaborando com a adesão dos pacientes em estudos, já que aumenta a confiança e a perseverança dos mesmos no tratamento, por não envolver sistematicamente a invasão pela agulha durante a consulta, evitando o absenteísmo<sup>28</sup>.

Em nosso trabalho, padronizamos um ensaio de *dot*-ELISA com alta sensibilidade e especificidade, permitindo a detecção de IgG em pequenas quantidades de material, que é extremamente importante no caso da saliva, que apresenta baixa concentração de IgG. Outros autores já haviam relatado anteriormente a importância e aplicabilidade da reação de *dot*-ELISA para outras protozooses, mas para a toxoplasmose estes dados são escassos<sup>29</sup>, sempre utilizando soro como fonte de anticorpos.

Na toxoplasmose, há relatos da utilização da saliva para detecção de anticorpos a partir de ensaios de ELISA e *immunoblotting*<sup>16-18</sup>, sendo o nosso trabalho pioneiro na utilização da técnica de *dot*-ELISA para saliva.

Nossos dados de padronização mostram que o extrato salino foi o antígeno que apresentou os melhores resultados no *dot*-ELISA, possibilitando uma clara distinção entre amostras positivas e negativas. Estes resultados são corroborados pelos dados descritos por outros autores<sup>20,29</sup> que utilizaram o *dot*-ELISA com antígeno salino para detecção de IgG anti-*T. gondii* em amostras de soro.

Estudos comparativos entre a eficiência de diferentes métodos de detecção de IgG anti-*T. gondii* em saliva são raros, mas os resultados do ELISA e do *dot*-ELISA do nosso estudo foram semelhantes aos descritos por Stroehle<sup>17</sup> em um trabalho comparativo entre o ELISA e o *immunoblotting* para detecção de IgG anti-*T. gondii* em saliva, com valores altos de sensibilidade e especificidade, sendo estes resultados semelhantes aos descritos por Morris et al<sup>30</sup> em estudos de detecção de anticorpos IgG anti-rubéola em saliva.

Contudo, alguns autores relataram valores menores de sensibilidade e especificidade do *dot*-ELISA, propondo um aprimoramento do teste como demonstrado por Shukla et al<sup>31</sup> em um estudo utilizando antígenos de *Cysticercus fasciolaris*, com 88 % de sensibilidade e 74 % de especificidade. Verificamos em nossos ensaios de padronização, que a concentração necessária de antígeno salino para detecção de IgG em saliva correspondeu ao dobro da concentração necessária para detecção no soro. Este dado pode ser explicado pelo fato da saliva total conter altos níveis de IgA secretora e baixos níveis de IgG. Além disso, a presença de bactérias, leucócitos, mucina, células epiteliais e restos de alimento podem provocar a degradação da IgG por proteases bacterianas e salivares, podendo, também, dificultar o processamento do material dada sua viscosidade<sup>32</sup>.

Em nosso trabalho obtivemos valores altos de sensibilidade relativa 100 % e especificidade relativa 100 % para o *dot*-ELISA com antígeno

salino em saliva. Estes dados são corroborados pelo estudo pioneiro em detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em saliva<sup>16</sup>, que utilizaram a técnica de *immunoblotting* com antígeno salino, muito similar ao nosso antígeno.

Nossos resultados demonstraram que o dot-ELISA com antígeno salino é um método excelente para o diagnóstico e triagem da toxoplasmose, utilizando tanto amostras de soro quanto de saliva, com altos valores de sensibilidade e especificidade. Stroehle et al<sup>17</sup> ressaltam a importância da utilização da saliva como material por não ser um método invasivo, mas destacam que é necessário o aprimoramento das técnicas diagnósticas, bem como o processamento da saliva após sua obtenção, que é uma meta futura do nosso trabalho. Além disso, em estudos futuros iremos aprimorar o nosso teste, aumentando sua capacidade de detecção de IgG em saliva, através da utilização de dot-ELISA de captura com proteína A ou utilizando sistemas de revelação de maior sensibilidade.

## CONCLUSÃO

Entendemos que os resultados advindos do aprimoramento do teste possam permitir, no futuro, o desenvolvimento e aplicação de um teste comercial para detecção de IgG anti-*T. gondii* em saliva, a semelhança do que é feito atualmente com o teste rápido para diagnóstico de indivíduos reagentes ao vírus HIV, a partir da detecção de IgG em saliva.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado por LIM 49-HC-FMUSP, CNPq e CAPES.

## REFERÊNCIAS

1. Amato Neto V, Marchi CR. Toxoplasmose. In: Cimerman B, Cimerman S. *Parasitologia Humana e seus Fundamentos Gerais*. São Paulo: Editora Atheneu; 1999.p.159-78.
2. Camargo, ME. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1964;6(3):117-8.
3. Rynning FW, McLeod R, Maddox JC, Hunts S, Remington JS. Probable transmission of *Toxoplasma gondii* by organ transplantation. *Ann Intern Med*. 1979;90(1):47-9. [DOI: 10.7326/0003-4819-90-1-47].
4. Buxton D, Innes EA. A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis. *Parasitology*. 1995;110 (Suppl):S11-6. [DOI: 10.1017/S00311820000144X].
5. Sabin AB, Feldman HA. Dyes as microchemical indicators of a new phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). *Science*. 1948;108(2815):660-3. [DOI: 10.1126/Science.108.2815.660].
6. Desmonts G, Remington JS. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. *J Clin Microbiol*. 1980;11(6):562-8.
7. Welch PC, Masur H, Jones TC, Remington JS. Serologic diagnosis of acute lymphadenopathic toxoplasmosis. *J Infect Dis*. 1980;142(2):256-64. [DOI: 10.1093/infdis/142.2.256].
8. Balfour AH, Bridges JB, Harford JP. An evaluation of the ToxHA test for the detection of antibodies to *Toxoplasma gondii* in human serum. *J Clin Pathol*. 1980;33(7):644-7.
9. Hakes TB, Armstrong D. Toxoplasmosis: problems in diagnosis and treatment. *Cancer*. 1983;52(8):1535-40. [DOI: 10.1002/1097-0142(19831015)52:8<1535::AID-CNCR2820520833>3.0.C.O.;2-I].
10. Cantos GA, Prando MD, Siqueira MV, Teixeira RM. Toxoplasmose: ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e diagnóstico. *Rev Assoc Med Bras*. 2000;46(4):335-41. [DOI: 10.1590/S0104-4230200000400033].
11. Kijlstra A, Jongert E. Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat. *Int J Parasitol*. 2008;38(12):1359-70. [DOI: 10.1016/j.ipara.2008.06.002].
12. Kaufman E, Lamster IB. The diagnostic applications of saliva a review. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002;13(2):197-212. [DOI: 10.1177/154411130201300209].

13. Wong DT. Salivary diagnostics for oral cancer. *J Calif Dent Assoc*. 2006;34(4): 303-8.
14. Granade TC, Phillips SK, Parekh B, Pau CP, George JR. Oral fluid as a specimen for detection and confirmation of antibodies to human immunodeficiency virus type I. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1995;2(4):395-9.
15. Santos MM, Garcia TC, Orsini M, Disch J, Katz N, Rabello A. Oral fluids for the immunodiagnosis of *Schistosoma mansoni* infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2000;94(3):289-92. [DOI: 10.1016/S0035-9203(00)90326-2].
16. Hajeer AH, Balfour AH, Mostratos A, Crosse B. *Toxoplasma gondii*: detection of antibodies in human saliva and serum. *Parasite Immunol*. 1994;16(1):43-50. [DOI: 10.1111/j.1365-3024.1994.tb00303.x].
17. Stroehle A, Schmid K, Heinzer I, Naguleswaran A, Hemphill A. Performance of a western immunoblot assay to detect specific anti-*Toxoplasma gondii* IgG antibodies in human saliva. *J Parasitol*. 2005;91(3):561-3. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1645/GE-423R>].
18. Loyola AM, Durighetto Jr AF, Silva DAO, Mineo JR. Anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulins A and G in human saliva and serum. *J Oral Pathol Med*. 1997;26(4):187-91. [DOI: 10.1111/j.1600-0714.1997.tb00456.x].
19. Pinto PL, Kanamura HY, Silva RM, Rossi CRN, Andrade Jr HF, Amato Neto V. Dot-ELISA for the detection of IgM and IgG antibodies to *Schistosoma mansoni* worm and egg antigens, associated with egg excretion by patients. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 1995;37(2):109-15.
20. Pappas MG, Lunde MN, Hajkowski R, McMahon J. Determination of IgM and IgG antibodies to *Toxoplasma* using the IFA test, ELISA, and Dot-ELISA procedures. *Vet Parasitol*. 1986;20(1-3):31-42.
21. Angel S, Maero E, Blanco JC, Pzsenny V, Zala C, Gonzolez R, et al. Early diagnosis of toxoplasmic encephalitis in AIDS patients by Dot blot hybridization analysis. *J Clin Microbiol*. 1992;30(12):3286-7.
22. Eamsobhana P, Yoolek A, Punthuprapasa P, Suvouttho S. A dot-blot ELISA comparable to immunoblot for the specific diagnostics of human parascryptosporidiosis. *J Helminthol*. 2004;78(4):287-91.
23. Camargo ME, Ferreira AW, Mineo JR, Takiguti CK, Nakahara OS. Immunoglobulin G and immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assay and defined toxoplasmosis serological patterns. *Infect Immun*. 1978;21(1):55-8.
24. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72(1-2):248-54. [DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3].
25. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5. [DOI:10.1038/227680a0].
26. Mahmood T, Yang PC. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci*. 2012;4(9):429-34. [DOI: 10.4103/1947-2714.100998].
27. Venkatesan P, Wakelin D. ELISAs for parasitologists: or lies, damned lies and ELISAs. *Parasitol Today*. 1993;9(6):228-32. [DOI: 10.1016/0169-4758(93)90020-G].
28. Stekler JD, Swenson PD, Coombs RW, Dragavon J, Thomas KK, Brennan CA, et al. HIV testing in a high-incidence population: is antibody testing alone good enough? *Clin Infect Dis*. 2009;49(3):444-53. [DOI: 10.1086/600043].
29. Brooks RG, Sharma SD, Remington JS. Detection of *Toxoplasma gondii* antigens by a dot-immunobinding technique. *J Clin Microbiol*. 1985;21(1):113-6.
30. Morris M, Cohen B, Andrews N, Brown D. Stability of total and rubella-specific IgG in oral fluid samples: the effect of time and temperature. *J Immunol Methods*. 2002;266(1-2):111-6. [DOI: 10.1016/S0022-1759(02)00114-X].
31. Shukla N, Husain N, Agarwal GG, Husain M. Utility of *Cysticercus fasciolaris* antigen in dot-ELISA for the diagnosis of neurocysticercosis. *Indian J Med Sci*. 2008;62(6):222-7. [DOI: 10.4103/0019-5359.41608].
32. Malamud D, Nagashunmugam T, Davis C, Kennedy S, Abrams WR, Kream R, et al. Inhibition of HIV infectivity by human saliva. *Oral Dis*. 1997;3 (Suppl 1):S58-63. [DOI: 10.1111/j.1601-0825.1997.tb00376.x].

# Validação de ensaio imunoenzimático utilizando-se o Conceito do Erro Total, os Perfis de Exatidão e o Índice de Exatidão como alternativa à abordagem clássica do ICH

## Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay by using the Total Error Concept, the Accuracy Profiles and the Accuracy Index as alternatives to the traditional ICH approach

RIALA6/1667

Jorge Luiz dos Santos POSSAS, Jarbas Emílio dos SANTOS, Michele Cardoso do NASCIMENTO, Patrícia Alves dos SANTOS, Deivid Wanderson Couto dos ANJOS, Eduardo de Bonis de BRITTO, Antônio Eugênio Castro Cardoso de ALMEIDA, Wlamir Corrêa de MOURA\*

\*Endereço para correspondência: Laboratório de Vacinas Virais, Departamento de Imunologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, FIOCRUZ. Av. Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, CEP: 21040-900. Tel: 21 3865-5130. E-mail: wlamir.moura@incqs.fiocruz.br

Recebido: 23.06.2015 - Aceito para publicação: 29.12.2015

### RESUMO

O uso do conceito do Erro Total em validação de métodos analíticos é uma abordagem que incorpora a soma da veracidade e precisão. Este método utiliza ainda Perfis de Exatidão baseados em intervalos de tolerância para decidir se um modelo de calibração dará resultados de qualidade, e realiza o controle do risco de aceitar uma metodologia imprópria. Foram aplicados o Conceito do Erro Total, os perfis de Exatidão e o Índice de Exatidão na validação de um ensaio imunoenzimático (ELISA) para determinar o teor residual de ovoalbumina em vacinas. Este estudo testou uma amostra pura e fortificada com três diferentes concentrações (baixa, média e alta). A abordagem foi usada também para avaliar o método de cálculos que renderia resultados mais exatos. Os resultados obtidos no intervalo de concentrações testado com o modelo de cálculos escolhido foram: veracidade - ER% de 1,61 % a 12,15 %; precisão intermediária - CV% de 6,91 % a 9,31 % e o Erro Total de 9,83 % a 19,07 %, obtendo-se dados em conformidade com os guias internacionais. O estudo demonstrou que o método empregado é confiável para avaliar o teor de ovoalbumina, e que a abordagem do Conceito do Erro Total apresenta aplicabilidade na validação de ensaios imunoenzimáticos.

**Palavras-chave.** validação, imunoensaio, erro total, perfis de exatidão, índices de exatidão, ELISA.

### ABSTRACT

The use of Total Error Concept for validating analytical methods is an approach that incorporates the sum of the Trueness and the Precision. This method also uses the accuracy profiles based on the tolerance intervals for whether a calibration model will give the quality results and it enables to control the risk in accepting an inappropriate methodology. The Total Error Concept, the Accuracy Profiles and the Accuracy Index were applied in this study for validating an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to determine the residual contents of ovalbumin in vaccines. This study tested a pure vaccine sample and spiked with three different concentrations (low, medium and high). Also an approach was used for evaluating the calculations methods which would yield the most accurate results. The obtained results in the concentrations range tested with the chosen model were: Trueness - ER% from 1.61 % to 12.15 %; intermediate precision - CV% from 6.91 % to 9.31 %; and the Total Error from 9.83 % to 19.07 %, which are in conformity with the international guides. This study showed that the method is reliable to evaluate the ovalbumin contents, and that the Total Error Concept approach has applicability for validating enzyme immunoassays..

**Keywords.** validation, immunoassay, total error, accuracy profile, accuracy index, ELISA.

## INTRODUÇÃO

A Febre Amarela é a febre viral hemorrágica original, uma sepse viral pansistêmica apresentando virêmia, febre, prostração, injúrias hepáticas, renais e miocárdicas, hemorragia, choque e alta letalidade<sup>1</sup>. O nome da doença se deve à icterícia que afeta alguns pacientes, causada pelas severas injúrias hepáticas<sup>2</sup>.

É estimado que ocorram 200.000 casos de Febre Amarela causando 30.000 mortes, a cada ano mundialmente, 90 % dos casos acontecendo na África. O vírus é endêmico em áreas tropicais da África e América Latina<sup>2</sup>. A doença não ocorre na Ásia e países do Pacífico mesmo com a presença do vetor do ciclo urbano, o mosquito *Aedes aegypt*, o que ainda não é completamente entendido<sup>3</sup>.

A vacinação é a medida de maior importância na prevenção da Febre Amarela. Em áreas de alto risco onde a cobertura vacinal é baixa, o pronto reconhecimento e controle de surtos, usando a imunização, são fundamentais para conter epidemias<sup>2</sup>.

No Brasil, a vacina contra Febre Amarela é produzida com vírus atenuado. É adotado o sistema de lote semente primário da cepa vacinal 17D, por meio de passagens em ovos de galinha SPF (Specific Pathogen Free – Livre de Patógenos Específicos) embrionados para obter o lote semente secundário<sup>4</sup>.

A ovoalbumina, que corresponde a mais de 50 % das proteínas presentes na clara do ovo, é um resíduo da produção capaz de induzir reações em indivíduos alérgicos, devendo ser verificado seu teor. A Farmacopeia Brasileira<sup>4</sup> descreve o método imunoenzimático de detecção e estabelece o limite  $\leq 5,0 \mu\text{g/dose}$ . No Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), o Laboratório Nacional de Controle, a quantificação de ovoalbumina residual é feita usando o ensaio imunoenzimático (ELISA), desenvolvido por Biomanguinhos (FIOCRUZ - RJ)<sup>4</sup>. O ELISA para Detecção do Teor de Ovoalbumina (EDTO) é do tipo sanduíche, utilizando anticorpos de captura e conjugado à peroxidase, que são reagentes derivados de fontes biológicas.

## Validação

A implementação de sistemas de acreditação de laboratórios de análise, com base na norma ISO 17.025<sup>5</sup>, é no presente uma realidade. Dois requisitos fundamentais figuram na parte 5 da ISO 17.025<sup>5</sup>: a definição de procedimentos para validar métodos e estimar a incerteza de medição<sup>6</sup>.

Na indústria farmacêutica, validações de métodos analíticos seguem o guia ICH Q2(R1)<sup>7</sup>, onde é definido como objetivo principal deste tipo de estudo demonstrar que o método analítico é apropriado ao uso a que se destina. Entretanto, este guia faz a ressalva de que métodos analíticos utilizados em produtos biológicos e biotecnológicos podem ser validados, em alguns casos, com abordagens diferentes das descritas naquele guia. Isto se deve ao fato de ser difícil seguir o guia ICH<sup>7</sup>, especialmente no caso de produtos derivados de matrizes biológicas (soros e vacinas), e/ou usando ensaios biológicos ou de ambos<sup>8</sup>.

No entanto, a norma ISO 17.025<sup>5</sup>, adotada no INCQS, só considera necessária a validação de métodos normalizados quando tenham sofrido modificações. Por esta razão, após a adoção de alguns desvios na técnica descrita na Farmacopéia Brasileira<sup>4</sup>, o EDTO foi submetido a um pré-estudo de validação no INCQS, utilizando a abordagem do Erro Total, demonstrando sua relevância e precisão apropriadas ao objetivo de uso e a confiabilidade da aplicação da abordagem alternativa de validação do Conceito do Erro Total. O estudo foi descrito por Possas et al<sup>9</sup>.

## Conceito do Erro Total e Perfis de Exatidão

A abordagem do Erro Total se baseia na construção de perfis de exatidão como descrito pela “Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques” (SFSTP)<sup>10-13</sup> e tem sido amplamente discutida<sup>14</sup>. Em 2003, a “American Association of Pharmaceutical Scientists” (AAPS) recomendou sua utilização na validação de ensaios de ligação de macromoléculas<sup>15</sup>. A partir de 2012, a “European Medicines Agency” (EMA) implementou as normas para validação de métodos bioanalíticos que incluem a abordagem do Erro Total<sup>16</sup> e o

FDA publicou, em 2013, uma revisão de seu guia para validação de métodos bioanalíticos<sup>17</sup>, incorporando a abordagem do Erro Total<sup>18</sup>, embora ainda não tenha sido implementada. Apesar destes guias serem focados em métodos bioanalíticos para medir a concentração de drogas em matrizes biológicas obtidas em estudos clínicos ou toxicológicos, eles contêm orientações úteis sobre algumas questões fundamentais e definições no domínio das validações de ensaios do tipo imunoenzimáticos aplicáveis à área de controle da qualidade para liberação de lotes<sup>16,18</sup>.

O princípio básico dos perfis de exatidão consiste em combinar figuras de mérito, obtidas em condições de precisão intermediária, e limites de tolerância de expectativa  $\beta$  em uma ilustração gráfica que permite tomar uma decisão sobre a validade do método<sup>6</sup>.

Em resumo, a abordagem do Erro Total e dos perfis de exatidão consiste de: a) construir um intervalo bicaudal com limites de tolerância de expectativa  $\beta$  (Limite Inferior - LI, Limite Superior - LS) com o nível de confiança desejado  $\gamma$  (por exemplo, 95 %); b) comparar o intervalo (LI, LS) com os limites de aceitação adotados (A, B); c) se (LI, LS) estiverem completamente dentro (A, B), o método é aceito; caso contrário, o método não é aceito.

O ICH<sup>7</sup> recomenda que os parâmetros mais relevantes para validação de métodos quantitativos são linearidade (do inglês *linearity* - habilidade, dentro um dado intervalo, de obter resultados de teste que sejam diretamente proporcionais à quantidade de analito nas amostras<sup>7</sup>) e exatidão (do Inglês *accuracy* - grau de concordância entre um resultado de teste ou resultado de medição e o valor verdadeiro<sup>19</sup>).

### **Escolha do modelo estatístico de cálculo de resultados de ensaio**

Uma fonte significativa de variabilidade nas curvas de calibração pode ser proveniente do modelo estatístico utilizado para o ajuste da curva, portanto, é extremamente importante a escolha de um modelo apropriado para este cálculo<sup>20</sup>. Alguns autores<sup>10,21</sup> introduziram

o uso do perfil de exatidão baseado nos intervalos de tolerância para decidir se um modelo de calibração obterá resultados de qualidade<sup>22</sup>.

### **Definições dos parâmetros de validação**

É importante ressaltar que tem sido incentivado no meio científico a adoção das definições do Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM)<sup>23</sup>, no entanto este vocabulário é direcionado às medições de grandezas. Ao se trabalhar com testes como um ELISA, que medem características, uma alternativa mais apropriada é a adoção das definições da norma ISO 3534-2<sup>19</sup>, guia que incorpora definições que abrangem tanto medições (de grandezas), quanto testes (de características).

Também há divergências entre as definições de importantes parâmetros de validação em diferentes normas e áreas científicas<sup>22,24</sup>. A veracidade, precisão e a exatidão são três termos fundamentais como parâmetros de validação de métodos analíticos. A veracidade (do inglês *trueness*) é o grau de concordância entre a expectativa de um resultado de teste/medição e um valor verdadeiro<sup>16</sup>. A medida da veracidade é normalmente expressa em termos de tendência (do inglês *bias*), sendo a diferença entre a expectativa de um resultado de teste/medição e um valor verdadeiro, é o erro sistemático total em contraste com o erro aleatório<sup>19</sup>. A precisão (do inglês *precision*) é definida como o grau de concordância entre resultados de testes/medições independentes, obtidos em condições estipuladas (repetibilidade, entre ensaios, precisão intermediária, reprodutibilidade). A medida da precisão é normalmente expressa em termos de imprecisão e calculada como desvio padrão (e.g. coeficiente de variação) dos resultados dos testes/medições. Depende apenas da distribuição dos erros aleatórios e não se relaciona com o valor verdadeiro<sup>19</sup>. A exatidão dos resultados do método (do inglês *accuracy*), grau de concordância entre o resultado do teste/medição e o valor verdadeiro<sup>19</sup>, por conseguinte, refere-se a um erro total de medição<sup>25</sup>, determinado pela combinação da veracidade e da precisão<sup>26</sup>.

## Validação em uso

O presente trabalho tem a finalidade de confirmar a aplicabilidade do conceito do Erro Total e dos perfis de exatidão, avaliados pelo índice de exatidão, como alternativa à abordagem pontual recomendada pelo ICH na validação de métodos analíticos. Para tanto, dá continuidade ao processo de validação do EDTO anteriormente avaliado em um pré-estudo de validação<sup>9</sup>, agora na fase de validação em uso do ensaio. Um avanço em relação ao pré-estudo foi a adoção de características e critérios de aceitação para validação preconizados pela EMA<sup>16</sup>, específicos para ensaios bioanalíticos do tipo ensaios de ligação, categoria que abrange os imunoenaios. Esta norma oficial não estava em vigor no período da realização do pré-estudo de validação. Dentre as principais características de um método bioanalítico preconizadas pela EMA<sup>16</sup> essenciais para garantir a aceitabilidade do desempenho e da confiabilidade dos resultados analíticos, as que se aplicam ao EDTO são: seletividade, curva de calibração (função de resposta), intervalo de quantificação, limite inferior de quantificação, veracidade e precisão.

O estudo de validação em uso foi desenvolvido em duas etapas:

a) Avaliação do método estatístico de cálculos de resultados capaz de prover resultados mais exatos, onde foram avaliados a regressão logística de quatro parâmetros (4PL), a regressão logística de cinco parâmetros (5PL) e o modelo de linhas paralelas (PAR), pelo uso dos perfis de exatidão e do índice de exatidão como descrito anteriormente por Possas et al<sup>9</sup>.

b) Usando os resultados obtidos no modelo escolhido para os cálculos de resultados, foram determinados os seguintes parâmetros recomendados em EMA<sup>16</sup> para ensaios imunoenzimáticos: veracidade; precisão (repetibilidade, inter-ensaios e precisão intermediária); linearidade; intervalo de quantificação; limites de quantificação avaliados como descrito por Possas et al<sup>9</sup>; curva de calibração e seletividade foram avaliados como recomendado em USA<sup>17,18,27</sup>, respectivamente.

Faz-se necessário ressaltar algumas

diferenças metodológicas entre o presente estudo, a validação em uso, e o pré-estudo de validação<sup>9</sup>: algumas abordagens na fase de validação em uso foram adotadas em consequência dos resultados do pré-estudo<sup>9</sup>, como a concentração 2,0 µg.mL<sup>-1</sup> para o padrão de calibração. Na fase de pré-estudo foram usados apenas padrões de calibração e padrões de validação (diluídos em PBS) e as concentrações foram expressas em µg.mL<sup>-1</sup>. Na fase de validação em uso, foram testados o padrão de calibração e uma amostra de vacina ora pura, ora fortificada com três concentrações de ovoalbumina (amostras de validação) e as concentrações destas foram expressas em µg.0,5 mL<sup>-1</sup>, volume da dose da vacina. Na fase de pré-estudo a versão do programa de computador utilizado para cálculo de resultados não incluía o modelo de cálculos 5PL que foi incorporado à nova versão lançada em 2013, o que permitiu a comparação dos três modelos na fase de validação em uso. No entanto, na realização do pré-estudo, foi realizada uma comparação dos resultados utilizando os dois modelos disponíveis 4PL e PAR que não foi incluída na publicação, servindo apenas para embasar a escolha do modelo adotado naquela fase, o 4PL.

Outro avanço em relação ao pré-estudo foi a adoção de características e critérios de aceitação para validação preconizados pela EMA<sup>16</sup>, específicos para ensaios bioanalíticos do tipo ensaios de ligação, categoria que abrange os ELISAs. Esta norma oficial não estava em vigor no período da realização do pré-estudo de validação.

Em relação ao pré-estudo, o cálculo da incerteza também foi modificado para uma abordagem mais abrangente, incorporando em sua determinação os dados de Veracidade e Precisão Intermediária obtidos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Padrão de Calibração

Para o ajuste da curva de calibração uma solução estoque padrão de calibração de ovoalbumina de ovos de galinha (Sigma, A2512, pó liofilizado, ≥ 98 %) na concentração de

100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (p/v) foi preparada e diluída em água destilada a 2,0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (p/v).

### Amostras de validação

Na fase de validação em uso, foi testado um único lote de vacina contra febre amarela. A cada ensaio, foi testada a amostra pura paralelamente à mesma amostra deliberadamente fortificada (“spiked”) com três concentrações de ovoalbumina. O conjunto de amostras pura (doravante referida como 0,18  $\mu\text{g}\cdot 0,5 \text{ mL}^{-1}$ , teor médio determinado em três ensaios prévios) e fortificadas, foi denominado “amostras de validação”. Para fortificação das amostras, foi utilizada a solução estoque padrão de ovoalbumina diluída na amostra de vacina para obter as seguintes concentrações em relação ao limite de aceitação do teor de ovoalbumina de 5,0  $\mu\text{g}\cdot 0,5 \text{ mL}^{-1}$ : baixa = 25 % (1,25  $\mu\text{g}\cdot 0,5 \text{ mL}^{-1}$ ), Média = 100 % (5,0  $\mu\text{g}\cdot 0,5 \text{ mL}^{-1}$ ), e Alta = 300 % (15  $\mu\text{g}\cdot 0,5 \text{ mL}^{-1}$ ). Na prática, foram usadas alíquotas arredondadas e foi aplicada uma correção a estas concentrações para efeito de cálculo, os valores assumidos foram: 0,18; 1,26; 5,05 e 14,9  $\mu\text{g}\cdot 0,5 \text{ mL}^{-1}$ .

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

Os padrões de calibração de ovoalbumina e amostras de validação foram submetidos ao EDTO como descrito por Possas et al<sup>9</sup>, exceto onde mencionado. A curva padrão de ovoalbumina foi elaborada com oito diluições contendo de 0,2  $\mu\text{g}$  a 0,0016  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . A cada ensaio, o padrão de calibração e as amostras de validação foram pré diluídas visando obter as concentrações desejadas. Como no ensaio de rotina, foram diluídos a 1/10 e aplicados nos primeiros poços, sendo diluídos com fator dois a partir dos segundos poços da placa até completar um total de oito diluições para o padrão e para cada amostra. Controles positivos e negativos (branco) foram incluídos em cada placa. A leitura das Densidades Óticas (DOs) foi feita em leitor de microplacas (VersaMax - Molecular Devices, Califórnia, EUA) a um comprimento de onda bicromático de 450/630 nm. O teor de ovoalbumina residual foi calculado utilizando os modelos 4PL, 5PL e

PAR no software estatístico CombiStats<sup>®</sup> do EDQM<sup>28</sup>.

### Desenho do estudo - Matriz de Ensaios

Com a finalidade de avaliar os parâmetros definidos, uma matriz de ensaios foi desenhada visando obter o máximo de informações de cada corrida. Foram realizadas cinco corridas válidas (p = 5) com amostras de um mesmo lote de vacina contra febre amarela, fortificadas com três concentrações de padrão de ovoalbumina mais a amostra pura (m = 4) em placas duplicatas (n = 2). Visando incluir concentrações pura, baixa, média e alta. A amostra de vacina pura serviu para determinar a diferença entre o teor original (média dos resultados de todos os ensaios) e o recuperado nas amostras fortificadas. Um total de 40 resultados foi obtido nesta etapa.

Posteriormente, foram realizados quatro ensaios para avaliação da seletividade como recomendado em USA<sup>27</sup> onde foram testados uma amostra de vacina e o padrão de ovoalbumina (2,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ): a) como padrão de calibração diluído em PBS, b) como padrão de validação também diluído em PBS, c) como padrão de validação utilizando a amostra de vacina como diluente (matriz). Um total de 20 resultados foi obtido nesta etapa.

### Análise Estatística

#### *Escolha do modelo de cálculos usando o conceito do Erro Total*

Os resultados do teor de ovoalbumina foram calculados para as duplicatas de placa e concentrações dos ensaios pelos métodos de 4PL, 5PL e PAR, utilizando o programa de computador CombiStats<sup>®28</sup>, versão 5, visando determinar qual destes modelos rende resultados mais exatos.

Posteriormente, os resultados obtidos com o modelo escolhido foram utilizados para calcular os demais parâmetros de validação definidos.

Foi empregada a abordagem do Conceito do Erro Total seguindo as recomendações da SFSTP<sup>10-13</sup> e o perfil de exatidão dos resultados obtidos com os três modelos de curva nas diferentes concentrações estudadas, construído

como descrito por Rozet et al<sup>25</sup>. Para interpretar a adequação do perfil de exatidão obtido, foi empregado o índice de exatidão<sup>25</sup>, para tanto, uma planilha do Microsoft Excel<sup>®</sup> foi elaborada e validada frente aos dados do referido artigo. Os gráficos apresentados e análises complementares como teste de desvio de linearidade, coeficientes de regressão e de inclinação das curvas padrão, foram feitos utilizando o programa estatístico GraphPad Prism<sup>®</sup> (San Diego, Califórnia, EUA).

#### Veracidade

A veracidade do método, expressa como a tendência em Erro Relativo % (ER%), foi determinada como descrito por Rozet et al<sup>25</sup>, utilizando a equação 1.

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

Onde:

ER% = Erro Relativo percentual

$\mu$  = média dos resultados obtidos

$\mu_T$  = concentração nominal

#### Precisão

A partir das concentrações estimadas, utilizando uma ANOVA como descrito por Rozet et al<sup>25</sup>, foram calculadas a variância da repetibilidade ( $\sigma_i^2 \sigma_i^2$ ), utilizando os resultados das diferentes replicatas em cada ensaio; da precisão entre-ensaios ( $\sigma_e^2 \sigma_e^2$ ), utilizando os resultados obtidos nas diferentes corridas de ensaios e da precisão intermediária, pela soma das variâncias intra e entre-ensaios ( $\sigma_{IP}^2 = \sigma_i^2 + \sigma_e^2$ ), que permitiram avaliar a precisão do método pela determinação da repetibilidade, da precisão entre-ensaios e da precisão intermediária, expressas como coeficiente de variação percentual (CV%) obtidos por divisão dos desvios padrões calculados pela concentração nominal ( $(\sqrt{\sigma^2})/\mu_T$ ) nos quatro níveis de concentrações como anteriormente descrito por Hubert et al<sup>10</sup> e por Rozet et al<sup>25</sup>.

#### Exatidão

Na abordagem do Conceito do Erro Total,

foi construído um Intervalo de Tolerância de Expectativa- $\beta$ , com nível de confiança  $\gamma$  de 95 %. O intervalo (LI, LS), que é calculado utilizando o ER% e a precisão intermediária e apresenta a exatidão dos resultados obtidos no método, foi comparado com os limites de aceitação adotados de  $\pm 30\%$  (A, B). Quando o intervalo (LI, LS) se apresentou completamente entre os limites de aceitação (A, B), o método foi aceito como apresentando resultados exatos; quando não, o método foi rejeitado. A exatidão foi então analisada pelos perfis de exatidão construídos e avaliados pelo índice de exatidão.

#### Índice de exatidão

Derringer e Suich<sup>29</sup> e Derringer<sup>30</sup> elaboraram os índices globais de conveniência (IGC) baseados nos critérios mais importantes de validação, variando de 0 a 1, para aumentar a objetividade da tomada de decisão permitindo avaliar a qualidade geral do método sendo validado sob o Intervalo estudado. Para tanto foi necessário atribuir um IGC ao intervalo de doses ( $I_D$ ), à veracidade ( $I_V$ ) e à precisão ( $I_P$ ), os cálculos foram feitos segundo Rozet et al<sup>25</sup>. Finalmente para estimar a qualidade geral do método, foi calculado um Índice denominado índice de exatidão ( $I_E$ ), que é definido como a combinação dos critérios anteriores obtido da média geométrica dos três Índices.

#### Crítérios de aceitação da Exatidão

Para que um método de imunoenensaio seja aceito, é recomendado que a precisão intermediária (CV%) e a veracidade (ER%) sejam ambas  $\leq 20\%$  (25 % no Limite Inferior de Quantificação - LIQ)<sup>16</sup> e o Erro Total  $\leq 30\%$  (40 % no LIQ)<sup>16</sup>.

Foram computados para cada concentração estudada os intervalos de tolerância de expectativa  $\beta$  (IT- $\beta$ ) ajustados para 95 %, que foram comparados aos limites de aceitação  $\pm 30\%$  ( $\lambda$ ). Os resultados obtidos nos três modelos de cálculos foram plotados em gráficos para construir o perfil de exatidão. Assim, o IT- $\beta$  é o intervalo que contém uma proporção de 95 % dos futuros resultados.

## Determinação dos Parâmetros de Validação

Uma vez escolhido o modelo de cálculos que rende resultados mais exatos, foram calculados os demais parâmetros de validação.

### *Seletividade*

Para produtos associados a matrizes complexas, seletividade (às vezes referida como especificidade) envolve a comprovação da ausência de interferência dos componentes da matriz ou a presença daqueles relacionados ao produto. Isto pode ser avaliado pela diluição paralela do padrão com e sem a presença dos componentes potencialmente interferentes. Se as curvas forem similares e os resultados estiverem de acordo com o esperado para uma comparação de padrão-com-padrão, o ensaio é específico para o componente. Para esta finalidade tanto os resultados quanto a similaridade devem ser avaliados usando testes de equivalência apropriados<sup>27</sup>.

Para avaliar a seletividade do método foram analisados paralelamente, em quatro ensaios adicionais, um padrão de calibração (2,0 µg.mL<sup>-1</sup>), um padrão de validação (idêntico ao anterior, 2,0 µg.mL<sup>-1</sup>), uma amostra de vacina e um padrão diluído em amostras de vacina (2,0 µg.mL<sup>-1</sup>). O ER% obtido para os padrões de validação e para o padrão diluído em amostra de vacina (subtraído o valor obtido para a amostra de vacina) deve ser  $\pm 20\%$  ( $\pm 25\%$  no LIQ). Para avaliar a equivalência das curvas de calibração foram comparadas as inclinações obtidas para cada padrão testado.

### *Curva de Calibração (Função de Resposta)*

É a relação entre a resposta instrumental e a concentração<sup>17</sup>. Foi avaliada pela curva de calibração, determinada para o padrão de calibração nos ensaios realizados, avaliando as concentrações introduzidas em função das respostas obtidas (absorbância medida em Densidades Óticas - DOs). As curvas devem ser capazes de adequadamente descrever a relação concentração-resposta<sup>17</sup>. Serão comparados os parâmetros coeficiente de determinação ( $r^2$ ) e inclinação (Hill Slope) de cada curva obtida.

### *Linearidade*

A linearidade de um método analítico é sua capacidade dentro de um intervalo definido de obter resultados diretamente proporcionais às concentrações de analito na amostra. As concentrações calculadas devem apresentar os valores das concentrações introduzidas  $\pm 20\%$ <sup>16</sup>. A Linearidade foi analisada utilizando os perfis de linearidade para avaliar o método. Foram considerados os valores absolutos obtidos nos ensaios, para determinar qual o intervalo em que seria possível obter resposta linear utilizando o método.

### *Intervalo e Limite Inferior de Quantificação*

O Intervalo de um ensaio é definido como as concentrações ou potências para as quais tenha sido confirmado que o método analítico tenha níveis conformes de veracidade e precisão intermediária e o limite inferior de quantificação será a menor concentração ou potência em que estas condições forem atendidas.

### *Cálculo da Incerteza*

É o parâmetro associado ao resultado da medição ou ao resultado do teste, que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser razoavelmente atribuídos à quantidade particular sujeita à medição ou a característica sujeita a teste<sup>19</sup>. Foi realizada uma avaliação do Tipo A, a partir de uma série de observações repetidas, utilizando métodos estatísticos. Foram utilizados os resultados da precisão intermediária e da Tendência dos resultados obtidos com o modelo escolhido. Foram calculadas a Incerteza padrão combinada ( $u_c$ ) e a incerteza expandida (U) com um fator de abrangência (k) igual a 2, próximo ao intervalo de 95 % de confiança. Os cálculos foram realizados como descrito pelo Nordtest Project<sup>31</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi avaliada no presente estudo a eficácia do uso do conceito do Erro Total e dos perfis de exatidão, avaliados pelo índice de exatidão na validação de métodos analíticos,

como alternativa à abordagem pontual recomendada pelo ICH. Para tanto foi realizada a validação em uso de um imunoenensaio, o EDTO em vacinas contra febre amarela dando continuidade ao processo iniciado com o pré-estudo de validação descrito por Possas et al<sup>9</sup>.

O estudo de validação em uso incorporou mudanças metodológicas em relação ao pré-estudo de validação<sup>9</sup>, como descrito na introdução. Assim, foi aplicada a abordagem de validação do Conceito do Erro Total para construir os perfis de exatidão do EDTO, como descrito pela comissão da SFSTP<sup>10-13,25</sup>. Em uma primeira etapa, para selecionar o modelo de ajuste de curvas que rendia resultados mais exatos, foram avaliados os modelos 4PL, 5PL e PAR utilizando os perfis de exatidão e os índices de exatidão calculados a partir dos parâmetros veracidade e precisão, combinados para demonstrar a exatidão dos resultados. O modelo 5PL apresentou os resultados mais exatos e foi o escolhido. Em uma segunda etapa, foram utilizados os resultados obtidos com o modelo 5PL para avaliar as demais características recomendadas em EMA<sup>16</sup> para validação de ensaios bioanalíticos do tipo imunoenzimáticos: linearidade, intervalo de quantificação, limite inferior de quantificação, curva de calibração e seletividade.

De acordo com a ISO 17.025<sup>5</sup>, validação não pode simplesmente ser a caracterização do método em termos de valores de mérito, ou seja, apenas calcular um desvio padrão de repetibilidade não quer dizer que o método esteja válido. Esses dados são úteis, mas devem confrontar o objetivo do método<sup>6</sup>. A utilização do critério do Erro Total, que incorpora a avaliação simultânea dos erros sistemáticos e aleatórios, é uma abordagem estatística e cientificamente lógica.

Os guias de validação de métodos bioanalíticos da EMA<sup>16</sup> e do FDA<sup>18</sup> incorporam a abordagem do Erro Total com especificações para este parâmetro para os diferentes tipos de ensaios, destacando a relevância desta abordagem alternativa em validações de ensaios desta natureza. No entanto, esses documentos utilizam o termo “exatidão”, como no guia ICH<sup>7</sup>,

em lugar do termo veracidade, como definido pela ISO<sup>26</sup>, expressando o Erro Total como a soma da “exatidão” e da precisão. No documento do FDA<sup>18</sup>, é feita a ressalva de que o termo Exatidão é às vezes substituído pelo termo veracidade em algumas normas.

Uma busca na base de dados PubMed por estudos de validação de ELISAs, publicados nos últimos 10 anos, revelou 736 artigos. Usando os termos “Accuracy profile” e “Total Error” foram encontrados 34 e 55 artigos, respectivamente e finalmente usando os termos “Immunoassay” e “Total Error”, aparecem 29 artigos. Um levantamento na base Scielo encontrou apenas quatro (Validação e ELISA) e dois (Validação e Ensaio). No Laboratório de Vacinas Virais do INQCS, foi aplicada a abordagem do Erro Total em validações de ensaios biológicos<sup>32</sup> e imunoenzimáticos<sup>9</sup>. Os números revelam a relevância de estudos de validação no cenário científico internacional e a escassez de publicações destes estudos em periódicos nacionais.

### **Escolha do modelo de cálculo usando o conceito do Erro Total**

Uma fonte significativa de variabilidade nas curvas de calibração pode ser proveniente do modelo estatístico utilizado para o ajuste, portanto, é extremamente importante a escolha de um modelo apropriado para este cálculo<sup>20</sup>. Os resultados obtidos no estudo utilizando os métodos 4PL, 5PL e PAR por replicata, por dia e por concentração, podem ser observados na Tabela 1 com os valores brutos recuperados nas amostras de validação fortificadas após a subtração da média de resultados obtidos pela amostra pura. Os resultados de cada grupo foram submetidos a uma análise de variância para verificar sua homogeneidade. Não houve valores aberrantes em nenhum dos grupos.

O controle estatístico de processo realizado com as inclinações da curva de calibração demonstrou que as curvas obtidas em cada placa replicata foram válidas e estavam sob controle (dados não apresentados). Os resultados puderam então ser utilizados nos cálculos dos parâmetros avaliados.

**Tabela 1.** Resultados calculados para cada concentração, por replicata e por corrida de ensaio no intervalo de concentrações de 0,18 a 14,9  $\mu\text{g}, 0,5\text{mL}^{-1}$  subtraídas as médias dos resultados obtidos com a amostra pura (0,18). Utilizando: A – Curva Logística de 4 parâmetros; B - Curva Logística de 5 parâmetros; C – Modelo de Linhas Paralelas

**A - 4PL**

CI $\mu\text{g}, 0,5\text{mL}^{-1}$	Pura(0,18)	1,26		5,05		14,9	
Replicatas	Média	n1	n2	n1	n2	n1	n2
Ensaio 1	0,183	1,317	1,342	5,685	5,341	14,966	14,198
2		1,300	1,094	5,661	5,027	15,406	13,973
3		1,429	1,387	6,055	5,784	16,362	15,087
4		1,358	1,297	5,641	5,541	15,231	15,112
5		1,305	1,367	5,580	6,296	14,823	17,836

**B - 5PL**

CI $\mu\text{g}, 0,5\text{mL}^{-1}$	Pura(0,18)	1,26		5,05		14,9	
Replicatas	Média	n1	n2	n1	n2	n1	n2
Ensaio 1	0,183	1,321	1,346	5,682	5,329	14,949	14,077
2		1,305	1,097	5,670	5,031	15,327	13,936
3		1,437	1,389	6,050	5,779	16,286	15,038
4		1,362	1,309	5,649	5,572	15,193	15,103
5		1,307	1,368	5,580	6,294	14,793	17,816

**C - PAR**

CI $\mu\text{g}, 0,5\text{mL}^{-1}$	Pura(0,18)	1,26		5,05		14,9	
Replicatas	Média	n1	n2	n1	n2	n1	n2
Ensaio 1	0,215	1,280	1,339	6,077	5,610	16,370	14,072
2		1,271	1,072	6,009	5,313	16,156	13,929
3		1,478	1,383	6,810	6,154	17,955	15,203
4		1,353	1,215	6,045	5,942	15,567	16,128
5		1,312	1,404	5,715	6,772	13,245	16,812

CI – concentração introduzida

A Tabela 2 apresenta os resultados dos parâmetros determinados para a construção dos Perfis de Exatidão do EDTO quando os resultados foram calculados com o ajuste de curva logística de 4PL, curva logística de 5PL e modelo de PAR. Os limites de tolerância de expectativa  $\beta$  (relativos e absolutos) foram calculados para 95 % de conteúdo e os limites de aceitação  $\pm \lambda$  foram definidos como  $\pm 30$  % como preconizado para o Erro Total de ensaios de ligação<sup>16</sup>.

Os resultados obtidos para veracidade, determinada pela tendência (ER%; amplitude 1,61 % 5PL a 19,31 % PAR) e precisão intermediária (CV%; amplitude 7,31 % 5PL a 11,38 % PAR) estavam

todos respectivamente dentro  $\pm 20$  % e foram  $\leq 20$  %, critérios de aceitação recomendados para estes parâmetros avaliados individualmente<sup>16</sup>. O Erro Total variou de 9,83 % no modelo 5PL a 31,09 % no PAR.

No pré-estudo de validação do EDTO, foi obtido o valor máximo de tendência (ER%) = -4,91 % (amplitude -0,45 a -4,91 %) e de precisão intermediária, o CV% máximo de 6,65% (amplitude de 5,25 a 6,65%). Os resultados obtidos no presente estudo para veracidade e precisão intermediária, embora satisfatórios em relação aos critérios de aceitação, apresentaram valores superiores aos da fase de pré-estudo,

**Tabela 2.** Resultados obtidos para construção dos Perfis de Exatidão do ensaio de determinação do teor de Ovoalbumina por modelo de cálculo: A – Curva Logística de 4 parâmetros; B - curva Logística de 5 parâmetros; C – Modelo de Linhas Paralelas

A		4PL			
Introduzido*	0,18	1,26	5,05	14,9	
Média*	0,18	1,32	5,66	15,54	
ER%	1,83	4,72	12,10	4,32	
CV% <sub>PI</sub>	9,46	7,30	6,96	9,75	
LST%	24,13	22,06	28,68	27,45	
LIT%	-20,47	-12,62	-4,48	-18,81	
LST*	0,22	1,54	6,50	18,99	
LIT*	0,14	1,10	4,82	12,10	
Erro Total	11,29	12,02	19,06	14,07	

B		5PL			
Introduzido*	0,18	1,26	5,05	14,9	
Média*	0,18	1,32	5,66	15,25	
ER%	1,61	5,08	12,15	2,36	
CV% PI	9,31	7,31	6,91	7,46	
LST%	23,59	22,45	28,62	20,07	
LIT%	-20,36	-12,28	-4,31	-15,35	
LST*	0,22	1,54	6,50	17,89	
LIT*	0,14	1,11	4,83	12,61	
Erro Total	10,93	12,39	19,07	9,83	

C		PAR			
Introduzido*	0,18	1,26	5,05	14,9	
Média*	0,22	1,31	6,04	15,54	
ER%	19,31	4,03	19,70	4,32	
CV% PI	11,78	9,11	9,27	9,75	
LST%	47,26	25,69	41,69	27,45	
LIT%	-8,63	-17,63	-2,29	-18,81	
LST*	0,27	1,58	7,16	18,99	
LIT*	0,16	1,04	4,93	12,10	
Erro Total	31,09	13,14	28,97	14,07	

ER – Erro Relativo; CV – Coeficiente de Variação; PI – Precisão Intermediária; LST e LIT Limites Superior e Inferior de Tolerância de expectativa  $\beta$ ; \* - Valores absolutos em  $\mu\text{g},0,5\text{mL}^{-1}$

provavelmente devido a um efeito da matriz de componentes biológicos do produto, uma vez que na fase de pré-estudo foram testados apenas padrões de validação diluídos em PBS e não amostras fortificadas. No entanto, tal efeito não foi significativo e não interferiu na seletividade do método, apresentando-se conforme com os critérios de aceitação adotados para este parâmetro<sup>27</sup>.

Os parâmetros veracidade (ER%) e precisão intermediária (%CV) foram combinados na escolha do melhor modelo de ajuste para cálculo dos resultados (4PL, 5PL e PAR) utilizando a construção dos perfis de exatidão.

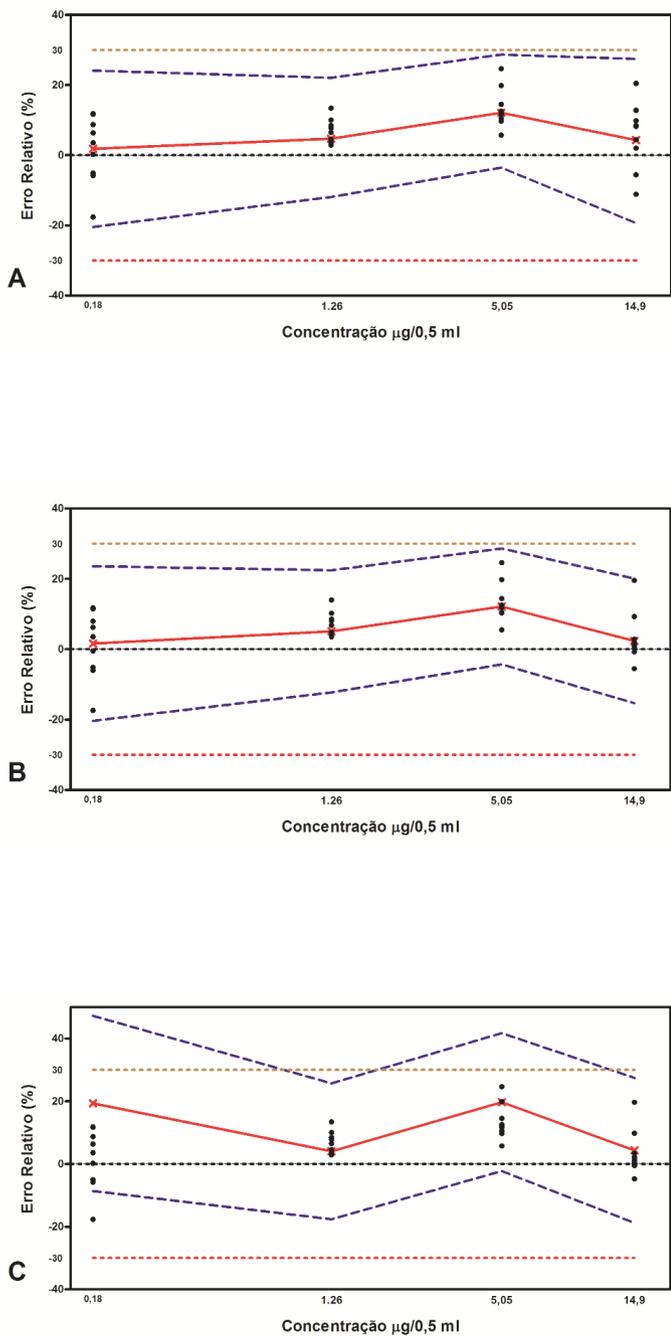
A Figura 1 - A, B e C apresenta os perfis de exatidão construídos. Em A, foram inseridos os resultados obtidos com 4PL, em B os resultados de 5PL e em C utilizando PAR. Os perfis de exatidão comprovaram que os modelos de ajuste de 4PL e 5PL descreveram a relação concentração-resposta com exatidão em todo intervalo de concentrações estudado.

### Índices de Exatidão

Para avaliar objetivamente os perfis de exatidão foram calculados os índices globais de conveniência e combinados no índice de exatidão para cada modelo de cálculo utilizado. Os resultados foram: índice de precisão (4PL=0,26; 5PL=0,43 e PAR=0,07); índice de intervalo (4PL=1,00; 5PL=1,00 e PAR=0,14); índice de veracidade (4PL=1,00; 5PL=0,89 e PAR=0,59) e a combinação dos três, o índice de exatidão (4PL=0,635; 5PL=0,723 e PAR=0,179).

O índice de exatidão mais elevado apresentado pelo modelo 5PL (0,723) indicou ser este o modelo de cálculos que permitiu obter resultados mais exatos. Baseado nestes resultados, o 5PL foi o modelo de cálculos escolhido.

A escolha do modelo de cálculos utilizando os perfis de exatidão, que permitem quantificar o desempenho destes modelos, comprova a importância da validação, uma vez que na análise de rotina as concentrações do analito nas amostras são desconhecidas e não podem ser comparadas a um valor verdadeiro. A escolha de um modelo inadequado, como se mostrou o PAR, pode levar o laboratório a emitir resultados inexatos.



**Figura 1.** Perfis de Exatidão obtidos para a Determinação do Teor Residual de Ovalbumina usando a curva 4PL (A), 5PL (B) e PAR (C) no intervalo de doses de 0,18 a 14,9 µg/0,5 mL<sup>-1</sup>. A linha contínua apresenta o Erro Relativo %, as linhas pontilhadas os limites de aceitação ± 30 % e as linhas tracejadas são os Limites Inferior e Superior relativos de 95 % de expectativa de tolerância β. Os pontos são os erros relativos % por replicatas das amostras de validação. O ensaio é capaz de quantificar com Exatidão apenas quando os intervalos de tolerância estão incluídos nos limites de aceitação (± 30 %)

O  $I_E$  obtido no pré-estudo de validação do EDTO<sup>9</sup> utilizando a 4PL foi 0,70, próximo aos obtidos pelos modelos 4PL e 5PL. Gaudin e Laurentie<sup>14</sup> relataram  $I_E$  de 0,64 ao empregar estes índices na validação de um kit de ELISA para detecção de Nicarbazina residual em ovos.

**Parâmetros de validação determinados com o modelo 5PL**

Uma vez escolhido o modelo 5PL como o que produziu os resultados mais exatos, foram calculados os demais parâmetros de validação recomendados em EMA<sup>16</sup>. O resumo dos resultados é apresentado na Tabela 3. Na determinação da veracidade o ER % variou de 1,61 % a 12,15 %; o CV % para avaliação da precisão intermediária variou de 6,91 % a 9,31 % e o Erro Total de 9,83 % a 19,07 %. Boemer et al<sup>35</sup> aplicaram pela primeira vez os perfis de exatidão baseados em intervalos de tolerância na medição do Erro Total em um ELISA para quantificação dos níveis de Hormônio Estimulante da Tireoide (TSH) em amostras de sangue seco de recém-nascidos, fixando os limites de aceitação em ± 30, como no presente estudo. Myler et al<sup>36</sup> reportaram a validação em uso de um ELISA sanduíche para quantificação de uma proteína de fusão em pacientes de transplantes renais e hepáticos, relataram veracidade e precisão conformes, obtendo: ER% entre -4 e 4 %, CV % ≤ 13 % e Erro Total entre 6-15 %. Cullen et al<sup>37</sup>, na validação de um ELISA, reportaram precisão inter-ensaios com CV % ≤ 12,1 % e ER % ≤ 10,9 %, o Erro Total do ensaio foi ≤ 23 %. A repetibilidade do ensaio na concentração de padrão de validação “alta” foi CV % ≤ 5,5 %. De Bock et al<sup>38</sup> descreveram a validação de um ELISA para detecção de citocromo 3A4 em microsomas hepáticos humanos, onde quantidades entre 2 e 300 pmol.mg<sup>-1</sup> de proteína microsomal puderam ser quantificados usando o modelo 5PL com fator de ponderação 1/x. Os CV % de repetibilidade e entre-ensaios ficaram entre 9,54 e 13,98 %, e entre 10,51 e 14,55 %, respectivamente. O ER % variou entre -5,96 e 6,68 %, e o Erro Total entre 11,93 e 21,23 %. Laurentie e Gaudin<sup>39</sup> relataram ER % = 2,0 % e CV % de precisão intermediária = 13,8 s%, na validação de um ELISA para detecção de Sulfametazina em leite, quando o modelo 5PL foi utilizado.

Os resultados relatados por todos estes autores são concordantes com os obtidos no presente estudo para veracidade, precisão e Erro Total, utilizando o modelo 5PL.

### Seletividade

A análise de variância dos 20 resultados obtidos nos quatro ensaios para avaliação

da seletividade ( $p = 0,071$ ) demonstrou a homogeneidade dos resultados. Todos os valores de ER% estavam no intervalo  $\pm 20\%$  e a análise de variância das inclinações das curvas obtidas para os padrões de calibração, validação e padrão diluído em amostras ( $p = 0,7345$ ) demonstrou a equivalência das inclinações. Portanto o método apresenta seletividade conforme para a ovoalbumina.

**Tabela 3.** Resumo dos resultados obtidos com o modelo 5PL na validação em uso do ensaio para determinação do teor residual de ovoalbumina em vacinas e critérios de aceitação adotados

Parâmetro	Resultados/conclusão	Critério de Aceitação
Seletividade	Amplitude do ER% (-17,95 a 11,06 %) Conclusão = Conforme	O ER% deve ser $\pm 20\%$ ( $\pm 25\%$ no LIQ) da concentração nominal fortificada tanto em diluente quanto em amostra <sup>27</sup>
Veracidade	Amplitude do ER% = 1,61 a 12,15 % Conclusão = Conforme	ER%* $\pm 20\%$ ( $\pm 25\%$ no LIQ e LSQ) <sup>16</sup>
Repetibilidade	Amplitude CV% = 5,76 a 7,46 Conclusão = Conforme	CV% $\leq 20\%$ ( $\leq 25\%$ no LIQ e LSQ) <sup>16</sup>
Precisão Entre ensaios	Amplitude CV% = 0,00 a 6,49 Conclusão = Conforme	CV% $\leq 20\%$ ( $\leq 25\%$ no LIQ e LSQ) <sup>16</sup>
Precisão Intermediária	Amplitude CV% = 5,76 a 7,46 Conclusão = Conforme	CV% $\leq 20\%$ ( $\leq 25\%$ no LIQ e LSQ) <sup>16</sup>
Exatidão (Erro Total)	0,18 = [-20,47; 24,13] 1,26 = [-12,62; 22,06] 5,0 = [-4,48; 28,68] 14,9 = [-18,81; 27,45] Erro Total máximo = 19,07. Conclusão = Conforme em todo intervalo estudado	$\leq 30\%$ ( $\leq 40\%$ no LIQ e LSQ) <sup>16</sup> Os limites de tolerância de expectativa $\beta$ relativos devem estar incluídos nos limites de aceitação ( $\pm 30\%$ ) <sup>25</sup>
Curva de Calibração	R > 0,98 nas 10 curvas de calibração realizadas. Conclusão = Conforme	Equação mais simples que descreve a função <sup>17</sup>
Linearidade	As médias das concentrações calculadas foram iguais às concentrações introduzidas $\pm 20\%$ . Os intervalos de tolerância $\beta$ estão incluídos nos limites de aceitação ( $\pm 30\%$ ), em todo o intervalo de quantificação. Conclusão: O Método apresenta resultados com relação linear com a concentração introduzida.	As concentrações calculadas devem apresentar os valores das concentrações introduzidas $\pm 20\%$ <sup>16</sup> e limites de tolerância de expectativa $\beta$ absolutos devem estar incluídos nos limites de aceitação ( $\pm 30\%$ ) <sup>25</sup>
Intervalo de Quantificação	0,18 a 14,9 $\mu\text{g}/0,5\text{ mL}$	Intervalo que apresentou resultados com Exatidão conforme <sup>16</sup>
Limite Inferior de Quantificação	0,18 $\mu\text{g}/0,5\text{ mL}$	Menor concentração no Intervalo que apresentou resultados com Exatidão conforme <sup>16</sup>

### Curva de Calibração (Função de Resposta)

A função de resposta foi avaliada pela curva de calibração, determinada para o padrão de calibração, considerando as concentrações introduzidas em função das respostas obtidas (absorbância medida em DOs). A avaliação das 10 diferentes curvas de calibração por cada replicata nos cinco ensaios realizados quando foi ajustada a regressão linear simples do logaritmo das concentrações (diluições) em função do logaritmo das respostas obtidas (absorbâncias), tendo todas as curvas sido satisfatórias, o que pode ser percebido pelo valor de R maior que 0,98. Todas as curvas foram capazes de descrever adequadamente a relação concentração-resposta, como recomendado em USA<sup>17,18</sup>. A similaridade entre as inclinações obtidas nas 10 curvas foi comprovada pelo teste F ( $p = 0,7374$ ), o que indica não haver diferença estatística significativa entre os valores.

### Linearidade

Diferenciar claramente a curva de calibração (função de resposta) de linearidade permite aplicar o conceito de linearidade não apenas aos valores relativos, mas também aos valores absolutos do método, como para titulações onde os resultados não são obtidos por cálculo em retorno dos resultados a partir de uma curva de calibração<sup>22</sup>.

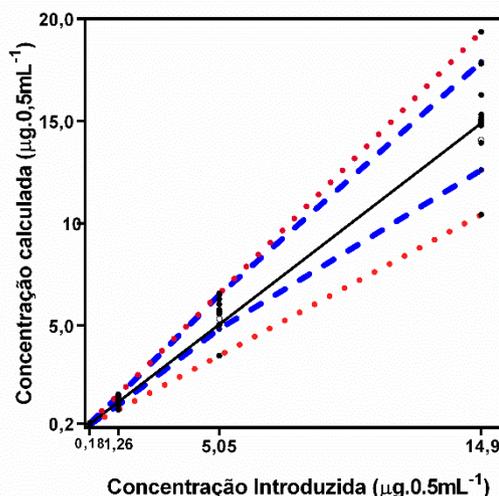
A linearidade de um método analítico é sua capacidade, dentro de um intervalo definido, de obter resultados diretamente proporcionais às concentrações de analito na amostra. As concentrações calculadas devem apresentar os valores das concentrações introduzidas  $\pm 20\%$ <sup>16</sup>.

As médias e os intervalos de aceitação  $\pm 20\%$  por concentração foram: 0,18 = 0,183 (0,144 a 0,216); 1,26 = 1,324 (1,01 a 1,51); 5,05 = 5,66 (4,04 a 6,06) e 14,9 = 15,25 (11,2 a 17,88). O coeficiente de correlação entre as concentrações introduzidas e concentrações calculadas foi 0,999 ( $p = 0,0006$ ), equação:  $Y = 1,022X + 0,1431$ . O teste de desvio de linearidade ( $p = 1,0$ ) indicou relação linear perfeita entre as concentrações introduzidas e as concentrações calculadas.

Também visando avaliar a linearidade,

o intervalo de tolerância de expectativa- $\beta$  absoluto foi aplicado para construir a Figura 2 que apresenta os perfis de linearidade obtidos no estudo pelo modelo de ajuste 5PL que compreende as concentrações de 0,18 a 14,9  $\mu\text{g} \cdot 0,5 \text{ mL}^{-1}$ . Neste caso, os limites de tolerância de expectativa  $\beta$  absolutos devem estar incluídos nos limites de aceitação ( $\pm 30\%$ )<sup>25</sup>.

Na avaliação da linearidade, como recomendado pelo EMA<sup>16</sup> todas as concentrações calculadas apresentaram valores das concentrações fortificadas  $\pm 20\%$ , confirmando a relação linear do ensaio. Também foi elaborado o perfil de linearidade aplicando o conceito do Erro Total que utilizou os valores absolutos obtidos nos ensaios, inseridos em gráfico com os limites de aceitação absolutos para o Erro Total de  $\pm 30\%$  calculados para cada concentração. Os IT $\beta$  absolutos foram conectados, de modo semelhante ao empregado



**Figura 2.** Perfis de Linearidade obtidos para a Determinação do Teor Residual de Ovalbumina usando a curva; 5PL como modelo de cálculos no intervalo de doses de 0,18 a 14,9  $\mu\text{g} \cdot 0,5 \text{ mL}^{-1}$

A linha contínua representa a linha de identidade ( $x=y$ ), as linhas pontilhadas os limites de aceitação absolutos adotados  $\pm 30\%$  e as linhas tracejadas são os Limites Inferior e Superior de 95% de expectativa de tolerância  $\beta$  em valores absolutos conectados. Os pontos são os resultados individuais obtidos para as replicatas das amostras de validação. Os intervalos de tolerância estão incluídos nos limites de aceitação ( $\pm 30\%$ ), em todo o intervalo de doses, portanto o ensaio é capaz de quantificar com linearidade satisfatória neste intervalo

na avaliação da Exatidão (que utiliza os valores relativos). A linearidade foi considerada conforme no modelo 5PL.

O limite inferior de quantificação foi  $0,18 \mu\text{g}.0,5 \text{ mL}^{-1}$ , a menor concentração incluída no estudo onde foi possível quantificar a ovoalbumina com exatidão. Este resultado é comparável ao obtido no pré-estudo de validação, uma vez que naquele estudo os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e o LIQ foi a concentração  $1,25 \mu\text{g}.0,5 \text{ mL}^{-1}$  a menor concentração do intervalo de estudo capaz de ser quantificada com exatidão e na concentração abaixo  $0,25 \mu\text{g}.0,5 \text{ mL}^{-1}$ , no intervalo de controle não foi mais possível fazê-lo. Corrigindo a expressão para  $\mu\text{g}.0,5 \text{ mL}^{-1}$ , temos as concentrações  $0,625 \mu\text{g}.0,5 \text{ mL}^{-1}$  e  $0,125 \mu\text{g}.0,5 \text{ mL}^{-1}$  respectivamente. A concentração  $0,18 \mu\text{g}.0,5 \text{ mL}^{-1}$  está entre as duas concentrações e no presente estudo, em relação às demais concentrações estudadas, apresentou perda da precisão, como esperado no LIQ, embora a tendência tenha sido equivalente.

### Cálculo da Incerteza

Foram calculadas as incertezas padrão combinada ( $u_c$ ) e incerteza expandida (U) a partir dos valores determinados para a precisão intermediária e para a tendência para os resultados obtidos com o modelo 5PL para cada diferente nível de concentração do Intervalo estudado. As incertezas determinadas foram:  $0,18 \mu\text{g}.0,5 \text{ mL}^{-1}$  ( $u_c = 4,93 \%$ ;  $U = 9,86 \%$ );  $1,26 \mu\text{g}.0,5 \text{ mL}^{-1}$  ( $u_c = 6,26 \%$ ;  $U = 12,52 \%$ );  $5,05 \mu\text{g}.0,5 \text{ mL}^{-1}$  ( $u_c = 12,63 \%$ ;  $U = 25,27 \%$ ) e  $14,9 \mu\text{g}.0,5 \text{ mL}^{-1}$  ( $u_c = 4,42 \%$ ;  $U = 8,83 \%$ ).

Os métodos clássicos de validação e de controle da qualidade avaliam a magnitude dos componentes veracidade e precisão separadamente, mas esta abordagem é pouco eficiente, pois valores muito pequenos de um dos componentes não compensam a falha do outro componente<sup>33</sup>.

O uso de intervalos de confiança e/ou Erro Total em validação de métodos tem sido discutido ou proposto na literatura<sup>10-13,25,33</sup>. O uso do Erro Total é uma abordagem estatística e cientificamente fundamentada que incorpora tanto os erros sistemáticos (veracidade) quanto aleatórios (precisão).

Uma vantagem desta abordagem é refletir mais diretamente o comportamento de ensaios individuais, o que resultará em menor rejeição de corridas em uso, do que procedimentos que comparam pontos de estimativa da tendência e precisão observadas<sup>22</sup>. O reconhecimento do valor do Erro Total em validações foi consolidado com as publicações de guias internacionais que incorporam esta abordagem em validações de métodos bioanalíticos como a AAPS<sup>15</sup>, SFSTP<sup>10-13,25</sup>, EMA<sup>16</sup> e FDA<sup>18</sup>.

### CONCLUSÃO

O estudo confirma a aplicabilidade do conceito do Erro Total e dos Perfis de Exatidão para validação de métodos, apresentando vantagens sobre abordagens baseadas na estimação de pontos para avaliar a Veracidade e Precisão, principalmente na validação de ensaios bioanalíticos do tipo imunoenzimáticos. A abordagem do intervalo de confiança prove um controle maior dos riscos associados em aceitar um procedimento inadequado e rejeitar um método satisfatório.

A validação em uso do ELISA para detecção do teor de ovoalbumina permite concluir que o ensaio apresenta – seletividade, veracidade, repetibilidade, precisão entre-ensaios, precisão intermediária, exatidão, curva de calibração e linearidade conformes no intervalo de  $0,18$  a  $14,9 \mu\text{g}.0,5 \text{ mL}^{-1}$ , e é um método confiável para avaliar o teor de ovoalbumina.

### AGRADECIMENTOS

À Direção e à Coordenação de Pós-Graduação do INCQS/FIOCRUZ pelo apoio na realização deste trabalho que foi produzido como dissertação de conclusão do Curso de Mestrado em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária; aos colegas do Departamento de Imunologia que contribuíram na realização deste trabalho; à Biomanguinhos/FIOCRUZ pelo fornecimento dos insumos para realização dos ensaios.

## REFERÊNCIAS

1. Monath TP. Yellow fever: an update. *Lancet Infect Dis*. 2001;1:11-20.
2. WHO, Yellow fever; Fact sheet N°100. Updated March 2014.
3. Monath TP. The absence of yellow fever in Asia—cause for concern? *Virus Inf Exch Newsl South East Asia West Pac*. 1989;6:106-7.
4. Brasil. Farmacopeia Brasileira, volume 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010.
5. ABNT NBR ISO/IEC. 17025:2005: Requisitos gerais para competência Técnica de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro; 2005.
6. Feinberg M, Laurentie M. A global approach to method validation and measurement uncertainty. *Accred Qual Assur*. 2006;11:3-9. [DOI:10.1007/s00769-005-0081-9].
7. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use, Topic Q2 (R1): Validation of analytical procedures: text and methodology, Geneva, 2005.
8. Gibelin N, Dupont D, Imbert S, Rozet E. Use of Total Error concept in the validation of viral activity in cell cultures. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2009;877:2407-11. [DOI: 10.1016/j.jchromb.2009.01.010].
9. Possas JLS, Santos JE, Nascimento Mc, Santos PA, Anjos DWC, Moura WC. Uso do conceito do erro total, dos perfis de exatidão e do índice de exatidão no pré-estudo de validação de ensaio imunoenzimático. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2012;71(4):691-705.
10. Hubert PH, Nguyen-huu, JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures A SFSTP proposal—part I. *J Pharm Biomed Anal*. 2004;36:579-86.
11. Hubert Ph, Nguyen-Huu JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures A SFSTP proposal—part II. *J Pharm Biomed Anal*. 2007;45:70-78.
12. Hubert Ph, Nguyen-Huu JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures A SFSTP proposal—part III. *J Pharm Biomed Anal*. 2007;45:82-96.
13. Hubert Ph, Nguyen-Huu JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal Part IV. Examples of application. *J Pharm Biomed Anal*. 2008;48:760-71. [DOI: 10.1016/j.jpba.2008.07.018].
14. Gaudin V, Laurentie M. Application of total error approach to assess the performance of a biological method (ELISA) to detect nicarbazin residues in eggs. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2009;877:2358-62. [DOI: 10.1016/j.jchromb.2009.03.021].
15. De Silva B, Smith W, Weiner R, Kelley M, Smolec J, Lee B et al. Recommendations for the Bioanalytical Method Validation of Ligand-binding Assays to Support Pharmacokinetic Assessments of Macromolecules. *Pharm Res*. 2003;20(11):1885-1900.
16. European Medicine Agency - EMA. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). EMA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev.1 Corr. Guideline on bioanalytical method validation. 2011.
17. USA, US Department of Health and Human Services. US Food and Drug Administration - FDA. Center for Biologics Evaluation and Research - CBER. Guidance for industry: bioanalytical method validation. Rockville; draft; 2001.
18. USA, U.S. Department of Health and Human Services; Food and Drug Administration - FDA/CDER. Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation - draft; 2013.

19. International Organization for Standardization. ISO 3534-2, Statistics — Vocabulary and symbols - Part 2: Applied statistics. 2nd ed. International Organization for Standardization (ISO), Geneva, 2006.
20. Cox KL, Devanarayan, V, Kriauciunas A, Manetta J, Montrose C, Sittampalam S. Immunoassay Methods. *In*: Sittampalam GS, Coussens NP, Nelson H, et al., editors. Assay Guidance Manual. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2014. Disponível em [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92434/>].
21. Hoffman D, Kringle R. Two-sided tolerance intervals for balanced and unbalanced random effects models. *J Biopharm Stat*; 2005(5):283–93.
22. Rozet E, Ceccato A, Hubert C, Ziemons E, Oprean R, Rudaz S et al. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. *J Chromatogr A*. 2007;1158(1-2):111–125.
23. INMETRO (Rio de Janeiro, Brasil). Vocabulário Internacional de Metrologia, Conceitos Fundamentais e Gerais e Termos Associados (VIM 2008). 1ª Ed. Brasileira do VIM, Tradução autorizada - JCGM 200:2008. 2008.
24. Feinberg M. Validation of analytical methods based on accuracy profiles. *J Chromatogr A*. 2007;1158:174–83.
25. Rozet E, Wascotte V, Lecouturier N, Pr at V, Dew  W, Boulanger B et al. Improvement of the decision efficiency of the accuracy profile by means of a desirability function for analytical methods validation Application to a diacetyl-monoxime colorimetric assay used for the determination of urea in transdermal iontophoretic extracts. *Anal Chim Acta*. 2007;591:239–47.
26. International Organization for Standardization. ISO 5725, Application of the Statistics-Accuracy (Trueness and Precision) of the Results and Methods of Measurement — Part 1: General principles and definitions. International Organization for Standardization (ISO), Geneva, 1994.
27. United States Pharmacopoeia – USP. <1033> Biological Assay Validation. 2010.
28. EDQM – Council of Europe. CombiStats v5.0, [www.combistats.eu](http://www.combistats.eu).
29. Derringer GC, Suich R. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. *J Qual Tech*. 1980;12(4): 214-219.
30. Derringer GC. A balancing act: optimizing a product’s properties. *Qual Progr*, 1994;51-58.
31. Nordtest project. 1589-02. Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories. Version 3.1. May 2012. Disponível em: [[www.nordtest.info](http://www.nordtest.info)].
32. Santos JE, Nascimento MC, Dos Santos PA, Nogueira ACA, Moura WC. Aplicação do conceito do erro total na validação do ensaio de potência da vacina oral contra a poliomielite. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2011;70(4):613-21.
33. Hoffman D, Kringle R. A Total Error Approach for the Validation of Quantitative Analytical Methods. *Pharm Res*. 2007;24(6):1157-63.
34. Boulanger B, Dew  W, Gilbert A, Govaerts B, Maumy M. Risk management for analytical methods based on the total error concept: Conciliating the objectives of the pre-study and in-study validation phases. *Chem Intell Lab Sys*. 2007;86:198-207. [DOI:10.1016/j.chemolab.2006.06.008].
35. Boemer F, Bours V, Schoos R, Hubert P, Rozet E. Analytical validation based on total error measurement and cut-off interpretation of a neonatal screening TSH-immunoassay. *J Chromatogr B*. 2009;877(23):2412-7. [DOI:10.1016/j.jchromb.2008.11.004].
36. Myler HA, Phillips KR, Dong H, Tabler E, Shaikh M, Coats V et al. Validation and life-cycle management of a quantitative ligand-binding assay for the measurement of Nulojix(®), a CTLA-4-Fc fusion protein, in renal and liver transplant patients. *Bioanalysis*. 2012;4(10):1215-26. [DOI: 10.4155/bio.12.79].

37. Cullen VC, Fredenburg RA, Evans C, Conliffe PR, Solomon ME. Development and advanced validation of an optimized method for the quantitation of A $\beta$ 42 in human cerebrospinal fluid. *AAPS J*. 2012;14(3):510-8. [DOI: 10.1208/s12248-012-9360-7].
38. De Bock LI, Colin P, Boussery K, Van Bocxlaer J. Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of cytochrome 3A4 in human liver microsomes. *Talanta*. 2012;15(99):357-62. [DOI: 10.1016/j.talanta.2012.05.064].
39. Layrentie M, Gaudin V. Use of the total error approach to evaluate the performance of a semi-quantitative immunological method (BIAcore method) for detecting sulfamethazine in bovine milk. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2009;877:2375-9. [DOI: 10.1016/j.jchromb.2008.12.069].
40. Possas JLS: Aplicação do Conceito do Erro Total, dos Perfis de Exatidão e dos Índices de Exatidão na validação em uso de um imunoensaio para detecção de ovoalbumina em vacinas contra febre amarela [dissertação de mestrado profissional]. Rio de Janeiro (RJ): Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz; 2014.

# Avaliação da concordância entre as linhagens de camundongos Swiss Webster e B6D2F1 no teste de potência da Eritropoietina Humana Recombinante (rhEPO): a experiência do Laboratório Nacional de Controle

## Evaluation of the agreement between Swiss Webster and B6D2F1 mice lineages in the potency test of Recombinant Human Erythropoietin (rhEPO): the Brazilian National Control Laboratory experience

RIALA6/1668

Michele Cardoso do NASCIMENTO\*, Clarice Lima do Canto ABREU, Rodrigo Netto COSTA, Wlamir Corrêa de MOURA, Isabella Fernandes DELGADO

\*Endereço para correspondência: Laboratório de Vacinas Virais e Cultura de Células, Setor de Vacinas Virais, Departamento de Imunologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Avenida Brasil, 4365, CEP: 21040-900, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Tel: 21 3865-5262. E-mail: michele.nascimento@incqs.fiocruz.br

Recebido: 15.09.2015 - Aceito para publicação: 27.11.2015

### RESUMO

A eritropoietina humana recombinante (rhEPO) é um hormônio glicoproteico. Diante da gama de produtos contendo rhEPO disponíveis no mercado, da abrangência da indicação terapêutica e das características dos usuários de rhEPO, o ensaio de atividade biológica é de grande importância para o processo de liberação de lotes deste produto. O teste de potência é uma avaliação laboratorial para averiguar a eficácia do produto final, recomendada pela Farmacopeia Europeia (Ph. Eur.). Este trabalho teve como objetivo avaliar a concordância entre os valores de potência biológica obtidos quando a linhagem de camundongos preconizada pela Ph. Eur. (B6D2F1) foi utilizada em comparação com a Swiss Webster (SW). Vinte e dois lotes foram testados usando-se estas duas linhagens, e 44 ensaios válidos foram obtidos com resultados satisfatórios. Em nenhuma das análises houve necessidade de efetuar repetição de ensaios, bem como a combinação de resultados. A variação entre linhagens e a veracidade foram avaliadas, obtendo-se os seguintes resultados: Coeficiente de Variação (CV) < 10 %; Erro Relativo % (ER %) < 10 %, respectivamente. As linhagens testadas geraram resultados homogêneos sem diferença estatisticamente significativa entre elas. A linhagem SW mostrou características adequadas para ser empregada como alternativa à linhagem B6D2F1 na avaliação da potência biológica de rhEPO.

**Palavras-chave.** eritropoietina humana recombinante, biológicos, vigilância sanitária, concordância, Swiss Webster, B6D2F1.

### ABSTRACT

The recombinant human erythropoietin (rhEPO) is a glycoprotein hormone. In face of the broad range of rhEPO-containing products in the market, the scope of their therapeutic indication and the characteristics of the rhEPO users, the biological activity testing is of high relevance for their batches releasing process. The potency testing is a laboratory evaluation for assessing the effectiveness of the final product, recommended by the European Pharmacopoeia (Ph. Eur.). This paper aimed at evaluating the agreement between the biological activity results obtained when the strain of mice-B6D2F1, recommended by Ph. Eur., was used in comparison to the Swiss Webster (SW). Twenty-two batches were assayed using these two mice strains, and a total of 44 valid assays were obtained with satisfactory results. In none of these analyses, neither repeating assays nor results combination were needed. The inter-strains variation and the accuracy were evaluated, and the following results were detected: Coefficient of Variation (VC) < 10 % and Relative Error % (RE) < 10 %, respectively. The tested lineage provided homogeneous results, and no statistically significant difference between them was found. The SW strain might be used as an alternative in place of B6D2F1 for performing the biological potency evaluation of rhEPO.

**Keywords.** recombinant human erythropoietin, biologicals, sanitary surveillance, agreement, Swiss Webster, B6D2F1.

## INTRODUÇÃO

A eritropoietina (EPO) é um hormônio glicoproteico essencial à vida. É produzido no indivíduo adulto principalmente pelas células do córtex renal e tem como principal função a regulação da eritropoiese<sup>1-5</sup>.

Em 1977, a EPO foi extraída e purificada da urina de pacientes anêmicos. Com o advento da tecnologia do DNA recombinante (rDNA), baseado na sequência de aminoácidos dos dados da purificação, o gene da EPO humana foi então clonado para obter a Eritropoietina Humana Recombinante (rhEPO), um avanço tecnológico que revolucionou o tratamento da anemia<sup>6,7</sup>.

Antes do desenvolvimento da rhEPO, a transfusão de sangue era o mais comum tratamento para pacientes com anemia, contudo, desde o seu advento, a rhEPO vem sendo amplamente utilizada na prática clínica, para redução da necessidade de transfusão sanguínea em processos cirúrgicos<sup>8</sup> e no tratamento de anemias de várias etiologias<sup>9,10</sup>.

Um fator de grande relevância, quando do uso da rhEPO, diz respeito à sobrevida dos pacientes e à melhora da qualidade de vida, ocorrendo um decréscimo na sensação de fadiga. O uso da rhEPO permite normalizar o apetite de pacientes anêmicos e acelerar o seu retorno às atividades de rotina<sup>11,12</sup>.

A patente das primeiras formulações de eritropoietina disponíveis comercialmente começou a expirar em 2007, o que levou ao surgimento de eritropoietinas similares no mercado mundial, chamadas de biossimilares. Este fato causa preocupação aos órgãos regulatórios, sobretudo quanto à eficácia e segurança de tais produtos, uma vez que os mesmos não são idênticos aos originais<sup>13,14</sup>.

Diante da gama de produtos disponíveis no mercado, da abrangência da indicação terapêutica e das características dos pacientes usuários de rhEPO, é de grande importância o efetivo controle da qualidade deste produto previamente ao seu ingresso no mercado. Dentre os testes preconizados pela Farmacopeia Europeia (*Ph. Eur.*)<sup>15</sup> para controle da qualidade deste produto, está o ensaio de potência ou

atividade biológica, que é uma avaliação laboratorial de suma importância, uma vez que seu resultado está relacionado à eficácia do produto final.

Atualmente, esta avaliação pode ser realizada por dois métodos distintos. Um método utiliza camundongos policitêmicos (método A) e outro utiliza camundongos normocitêmicos (método B)<sup>15</sup>. O método B tem sido o método de escolha, uma vez que o método A - em camundongos policitêmicos - causa maior sofrimento e estresse aos animais que devem ser mantidos por longos períodos em câmaras hipobáricas e expostos a radioisótopos<sup>16</sup>.

Como resultado dessa escolha, diferentes linhagens de camundongos normocitêmicos têm sido testadas para a avaliação da potência de rhEPO, tais como CF1, BALB/c, *Swiss Webster* (SW), NIH, C57BL6, e B6D2F1<sup>15, 17-21</sup>.

A linhagem B6D2F1 é um híbrido de primeira geração do cruzamento de duas linhagens *inbred*, (fêmea de C57BL/6 com o macho de DBA/2)<sup>22</sup> tem menor porte, menor número de filhotes por ninhada e menor fertilidade, quando comparada aos animais *outbred*. Camundongos híbridos de primeira geração (F1) têm como vantagens a uniformidade genética e fenotípica, a maior resistência a doenças e maior longevidade<sup>22-24</sup>.

Animais *outbred* são também chamados animais heterogênicos. Este estado de alta heterozigose (99 %) deve ser conhecido e mantido. São animais de constituição genética variada, por serem obtidos por cruzamentos aleatórios, evitando que os animais em acasalamento sejam parentes próximos. Com isso, busca-se manter um baixíssimo grau de consanguinidade, cerca de 1 %<sup>23-25</sup>.

Vale ressaltar que a linhagem SW, *outbred*, é de fácil aquisição junto ao Centro de Criação de Animais de Laboratório da FIOCRUZ (CECAL/FIOCRUZ), sua criação é mais simples, é consagrada pelo uso e vem sendo utilizada há décadas em diferentes estudos, demonstrando sua aplicabilidade em pesquisas e testes de segurança de produtos.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo comparar os resultados de

potência de rhEPO obtidos pelo Laboratório Nacional de Controle (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS/Fiocruz) com as linhagens B6D2F1 e SW de forma a avaliar a concordância entre essas linhagens.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras e reagentes utilizados

Foram utilizadas 22 amostras de rhEPO recebidas no INCQS para análise, modalidade orientação, no período de 2010-2012, com apresentação de 4.000 UI/mL.

O Padrão de Referência de Trabalho utilizado foi o lote MRT(B) rhEPO/0208, contendo 3773UI/mL, produzido pelo Centro de Imunologia Molecular de Cuba, envasado no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Bio-Manguinhos e estabelecido por meio de estudo interlaboratorial frente ao Padrão Internacional, lote 2 da *Ph. Eur.*

Os reagentes azul de metileno; citrato de sódio; cloreto de sódio e fosfato de sódio dibásico foram adquiridos da Merck®; a albumina sérica bovina, da Sigma®; a heparina da Eurofarma®; a Cellmlise III - Solução hemolisante a base de amônio quaternário, da CELM® e a solução oftálmica anestésica local a base de Oxybuprocaina da Latinofarma®. Todos os reagentes foram de alta pureza e estavam disponíveis comercialmente.

### Animais de laboratório

Foram utilizados em cada teste, 36 camundongos normocitêmicos de cada uma das linhagens SW e B6D2F1, fêmeas com peso variando entre 15 e 17 g provenientes do CECAL/Fiocruz (Centro de Criação de Animais de Laboratório).

Após o recebimento, os animais foram pesados e avaliados quanto ao sexo e estado de saúde geral. Os animais permaneceram em aclimação por um período de 24 horas, no mínimo, antes de cada ensaio. Foi oferecido aos animais, água e ração *ad libitum*. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro alternados, com 12 horas cada, temperatura variando de  $21 \pm 2$  °C e  $55 \pm 10$  % de umidade do ar.

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FIOCRUZ, com licença de número LW-14/11.

### Avaliação da potência biológica

Foram realizados 22 ensaios para a avaliação da potência biológica de rhEPO utilizando cada uma das linhagens SW e B6D2F1, conforme metodologia descrita na *Ph. Eur.*<sup>15</sup> - método B e POP 65.3430.042<sup>26</sup>. Este método tem como base a medida do estímulo da produção de reticulócitos após a injeção de rhEPO, sem qualquer exposição prévia.

O ensaio foi realizado com desenho de blocos ao acaso, onde os animais são distribuídos de forma aleatória. O tratamento dos animais foi por via subcutânea com as doses de 30, 90 e 270 UI/0,2 mL. Foram inoculados animais com a amostra teste e animais com padrão de referência, sendo seis animais representantes de cada dose, totalizando 36 animais em cada teste.

Após um período de 72 ou 96 horas, para a SW e B6D2F1, respectivamente, foi realizada a coleta de sangue por via plexo orbital com o auxílio de pipetas Pasteur heparinizadas, sob anestesia local, com Oxybuprocaina. O sangue coletado foi transferido para tubos tipo “safe lock” e mantido sob refrigeração (banho de gelo, com temperatura entre 4 a 8 °C) até o momento do seu processamento, que foi feito logo após a coleta. Tal processamento, consta da indução da hemólise seletiva e coloração do material genético dos reticulócitos com corante vital azul de metileno. Posteriormente, tais células foram contadas em hemocítmetro (câmara de Neubauer).

O mesmo procedimento foi aplicado em ambas as linhagens, B6D2F1 e SW, para cada amostra testada.

### Cálculos e análise estatística

O método de linhas paralelas, ensaio 3+3 doses, com delineamento de blocos ao acaso foi utilizado para avaliar a validade do ensaio e para o cálculo da estimativa de potência. Para tal, utilizou-se o programa computacional CombiStats<sup>®27</sup> desenvolvido segundo o capítulo 5.3 da *Ph. Eur.*<sup>28</sup>, o qual foi alimentado com os

dados da contagem dos reticulócitos.

O ensaio foi considerado válido quando atendeu aos critérios de aceite, que são regressão linear, paralelismo e linearidade, onde:

- **regressão linear:** deve ser significativa, ou seja, a probabilidade calculada deve ser menor que 0,05;
- **linearidade:** não deve haver desvios significativos, ou seja, a probabilidade calculada deve ser maior ou igual a 0,05;
- **paralelismo:** não deve haver desvios significativos, ou seja, a probabilidade calculada deve ser maior ou igual a 0,05;

A amostra foi considerada conforme quando o ensaio foi válido e a estimativa da potência estava entre 80 % e 125 % e os limites fiduciais entre 64 % e 156 % da potência declarada.

Foi realizada uma análise estatística para avaliar a variabilidade e o grau de concordância entre as linhagens estudadas. Para tal foram aplicados os seguintes testes: (a) Análise de variância; (b) Teste qui-quadrado; (c) Gráfico de Bland-Altman e (d) Regra 4-6-30 % com Erro Relativo e Coeficiente de Variação.

#### (a) Análise de variância

Os resultados foram comparados utilizando a análise de variância (ANOVA) para determinar se houve variabilidade significativamente maior das variâncias entre grupos ou dentro dos grupos sobre a variação total do método.

Quando F calculado foi menor que o F crítico, considerou-se que os grupos não diferiram significativamente.

#### (b) Teste qui-quadrado

A concordância entre os resultados das diferentes linhagens foi avaliada, utilizando o programa CombiStats<sup>®27</sup>, por meio do teste qui-quadrado para determinar a homogeneidade entre os dados utilizando os intervalos de confiança da potência como fator de ponderação, com  $\alpha = 0,05$ . Quando o valor calculado no teste qui-quadrado foi maior do que o valor tabulado, as potências foram consideradas heterogêneas, o que foi demonstrado pela obtenção de  $p < 0,05$ . Isto significa que a variação entre as estimativas individuais foi

maior do que havia sido previsto a partir das estimativas dos limites de confiança, isto é, que existe uma variabilidade significativa entre os ensaios<sup>28</sup>.

#### (c) Gráfico de Bland-Altman

Os gráficos de Bland-Altman foram confeccionados utilizando o programa GraphPad Prism<sup>®</sup>. Este método calcula a média, a diferença entre cada par de dados, o viés/tendência (*bias*) e os Limites de Concordância (LC).

É esperado que as diferenças plotadas contra as médias estejam dentro do LC calculado.

Segundo Bland e Altman<sup>29</sup>, medir as diferenças entre dois métodos para cada amostra e testá-las contra as médias é a melhor maneira de avaliar a relação entre os métodos. A dispersão das diferenças ao longo da linha zero é uma indicação da concordância entre os dois métodos<sup>29</sup>.

#### (d) Regra 4-6-30 % com Erro Relativo e Coeficiente de Variação

Os critérios de aceitação para a validação de ensaios do *Food and Drug Administration* – FDA<sup>30</sup> preconizam que pelo menos 66,7 % (4 em 6 resultados) das amostras de controle da qualidade estejam entre 15 % do seu valor nominal. Porém, em certas circunstâncias, critérios de aceitação mais amplos podem ser justificáveis. Este critério ficou conhecido como a regra 4-6-15<sup>31</sup>.

Bioensaios normalmente usados para estimar a potência de drogas podem ser distinguidos de testes químicos por serem realizados em substratos biológicos (e.g. animais, células vivas ou complexos funcionais de receptores alvo), e desta forma, devido a múltiplos fatores operacionais e biológicos advindos da base biológica, eles tipicamente exibem uma maior variabilidade do que os testes químicos<sup>32</sup>. Assim, foi avaliada a proporção de Erro Relativo (ER) de resultados de potência obtidos nas duas linhagens utilizadas no estudo, que se apresentou dentro do intervalo esperado para Tendência de  $\pm 30$  %, visando determinar se o ensaio obedece ao critério de aceitação 4-6-n %, como descrito pelo FDA<sup>30</sup>, adotando o ER máximo aceito de 30 % (4-6-30). Desta

forma, o método utilizando a linhagem SW é considerado satisfatório se pelo menos 4 (66,7 %) em 6 ensaios apresentarem resultados dentro da faixa de  $\pm 30$  %.

Para calcular as tendências (do termo inglês *bias*, diferença entre a expectativa de resultado de um teste ou medição e um valor verdadeiro<sup>33</sup>) entre os resultados obtidos pelas duas linhagens, os valores de potência em porcentagem obtidos com a linhagem B6D2F1, foram considerados como o valor verdadeiro e a diferença entre os valores percentuais destes resultados com os da linhagem SW, para cada par de resultados, foram considerados como o ER, sendo também calculados os coeficientes de variação (CV %) para cada par de resultados.

A Veracidade (do termo inglês *trueeness*, grau de concordância entre a expectativa de um resultado de teste ou um resultado de medição e um valor verdadeiro<sup>33</sup>) expressa como Erro Relativo percentual (ER %) foi calculada utilizando a equação 1. Neste caso, a potência nominal foi considerada como 100 %.

Equação 1

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

Onde:

ER% = Erro Relativo percentual

$\mu$  = média dos resultados obtidos

$\mu_T$  = Potência nominal

## RESULTADOS

A Tabela 1 apresenta os resultados de potência para cada amostra em cada linhagem. Os valores de potência na linhagem SW variaram entre 80 e 113 %. Os limites entre 70 e 129 % e a média entre as 22 amostras testadas foi 92,77 %, com uma veracidade (expressa pelo ER %) de -7,23 %. Os valores de potência na linhagem B6D2F1 variaram de 80 a 102 %. E os limites entre 70 e 116 %. A média dos valores de potência para as 22 amostras testadas foi de 92,95 %, com uma veracidade (expressa pelo ER %) de -7,05 %.

**Tabela 1.** Valores de potência e limites de confiança obtidos para 22 amostras de rhEPO testadas utilizando as linhagens de camundongos SW e B6D2F1

Amostra	Linhagem							
	SW			B6D2F1			SW x B6D2F1	
	Pot (%)	LI (%)	LS (%)	Pot (%)	LI (%)	LS (%)	CV%	ER
1	92	72	116	98	84	115	4,87	-6
2	98	85	112	93	76	113	3,53	5
3	88	76	102	93	80	107	3,72	-5
4	83	73	95	98	86	112	11,83	-15
5	80	70	91	99	85	116	15,28	-19
6	113	99	129	80	64	99	24,37	33
7	96	76	121	94	83	106	1,83	2
8	94	80	109	93	78	110	0,61	1
9	90	78	103	93	80	109	2,55	-3
10	98	90	106	97	87	108	0,73	1
11	94	73	121	86	76	103	4,36	8
12	102	91	114	98	82	118	2,81	4
13	110	97	126	95	81	112	10,48	15
14	86	74	101	88	75	103	1,38	-2
15	92	81	104	97	89	106	3,90	-5
16	81	71	93	95	82	109	10,59	-14
17	98	85	113	102	92	114	21,13	-4
18	85	71	102	96	81	112	7,94	-11
19	87	74	101	82	70	95	4,13	5
20	93	82	106	86	73	102	5,25	7
21	88	77	101	90	81	100	1,39	-2
22	93	78	110	92	83	103	0,36	1
$\mu$	92,77			92,95				
ER%	-7,23			-7,05				

Pot: Potência; LI: Limite Inferior; LS: Limite Superior;  $\mu$ : média dos resultados obtidos; ER: Erro Relativo; ER%: Erro Relativo%; CV%: Coeficiente de Variação; SW: Swiss Webster

O teste ANOVA foi realizado com os resultados de potência das linhagens SW e B6D2F1. Os resultados da ANOVA para um nível de significância  $\alpha = 0,05$  foram: a média de quadrados (MQ) entre grupos (variância entre grupos) foi de 42,0087 e a MQ dentro dos grupos (variância dentro dos grupos) foi de 57,3182. O valor  $p$  igual a 0,7599, maior que 0,05 e o F calculado, 0,7329, menor que o F crítico de 2,0587.

Com a finalidade de avaliar o grau de concordância entre os resultados, a homogeneidade foi determinada. Os resultados obtidos por amostra nas duas linhagens foram submetidos ao teste qui-quadrado utilizando o programa CombiStats<sup>27</sup>. Os resultados da comparação dos ensaios podem ser vistos na Tabela 2. Foi adotado um nível de significância de 5 % ( $\alpha = 0,05$ ), onde 20 dos 22 pares de resultados (90,90 %) foram considerados homogêneos ( $p > 0,05$ ). Apenas as amostras 5 e 6 foram consideradas heterogêneas ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 2.** Valores de  $p$  obtidos no teste qui-quadrado entre pares de resultados de potência obtidos nas linhagens de camundongos SW x B6D2F1 em 22 amostras testadas

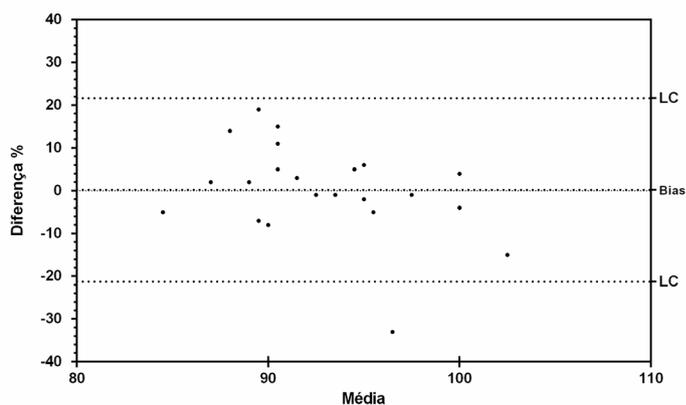
Amostra	valor $p$	Amostra	valor $p$
1	0,618	12	0,704
2	0,668	13	0,142
3	0,597	14	0,860
4	0,069	15	0,454
5	0,027	16	0,114
6	0,006	17	0,646
7	0,840	18	0,335
8	0,936	19	0,577
9	0,721	20	0,466
10	0,879	21	0,812
11	0,666	22	0,959

SW: Swiss Webster

Para avaliar a concordância entre as linhagens de camundongos SW e B6D2F1 foi aplicado o método de Bland-Altman<sup>29</sup>, o qual foi realizado utilizando o programa de computador GraphPad Prism®, analisando os valores de potência das 22 amostras testadas nas duas

linhagens. A Figura 1 apresenta as diferenças e as médias entre as duas linhagens, de cada amostra testada, com a tendência ( $bias = 0,1818$ ) e os limites de concordância (LC: -21,29 a 21,66). Apenas um valor ficou fora do LC.

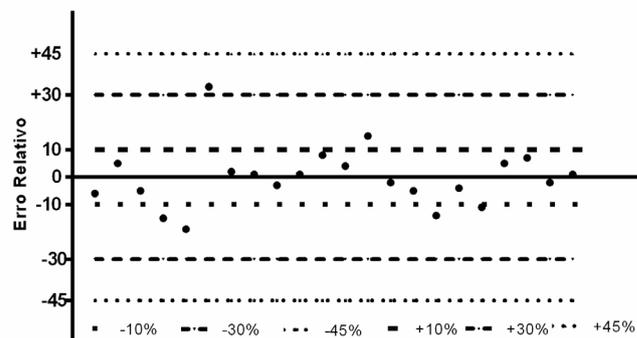
No eixo x estão representadas as médias ( $[B6D2F1+SW]/2$ ) e no eixo Y as diferenças (B6D2F1-SW). Foi calculado o Erro Relativo (ER) entre os valores percentuais de potência para a mesma amostra testada nas duas linhagens.



LC: Limite de Concordância; bias: Tendência

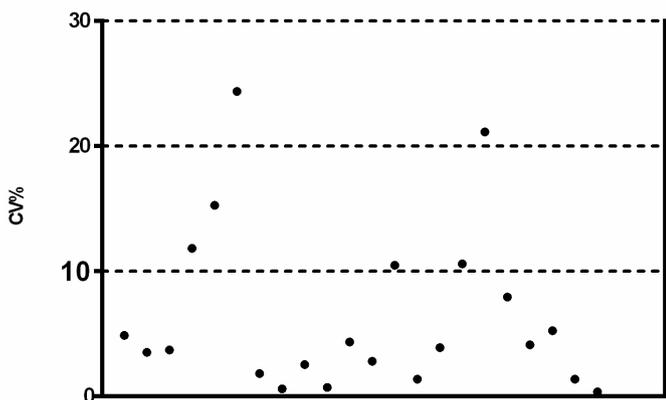
**Figura 1.** Bland-Altman para as linhagens de camundongos SW x B6D2F1

Observando a Figura 2 e a Tabela 1, podemos ver que a maior parte dos valores de ER (16/22) encontra-se dentro de  $\pm 10\%$ , apenas um ER ficou acima de  $\pm 30\%$  (ER = 33; amostra 6).



**Figura 2.** Erro Relativo entre as linhagens de camundongos SW e B6D2F1 (n=22)

O CV% entre as linhagens SW e B6D2F1 foi calculado a cada ensaio e 16 dos 22 valores ficaram abaixo de 10 % (tabela 1). A figura 3 apresenta a distribuição desses valores. Podemos observar que todos os valores de CV% ficaram abaixo de 30 %.



CV%: Coeficiente de Variação %

**Figura 3.** Coeficiente de Variação % entre as linhagens de camundongos SW e B6D2F1 (n=22)

## DISCUSSÃO

Desde a sua descoberta, purificação, clonagem e produção pela tecnologia do DNA recombinante, dando origem a rhEPO, a EPO vem sendo amplamente estudada. Na seleção de ensaios a serem realizados durante o processo de controle da qualidade da rhEPO, deve se levar em consideração a complexidade deste medicamento biológico, com padrão de glicosilação heterogêneo, onde o conteúdo de ácido siálico pode influenciar significativamente em seu metabolismo. Deste modo e dada tal complexidade, não há ainda modelos *in vitro* para a avaliação da atividade biológica da rhEPO, e internacionalmente, preconiza-se a realização de testes *in vivo* para determinação de sua potência<sup>15,17</sup>.

Todos os ensaios realizados - tanto na linhagem SW quanto na B6D2F1 - cumpriram com os critérios de validade (regressão, linearidade e paralelismo) e apresentaram resultados dentro dos limites estabelecidos pela *Ph. Eur.*<sup>15</sup>, isto é, a potência entre 80 % e 125 % e limites entre 64 % e 156 % da potência rotulada. Em todos os

grupos de dados avaliados, não existe evidência estatística que comprove que a distribuição não seja normal pelo teste de KS,  $p > 0,05$ .

Cabe ainda ressaltar, que segundo recomendação da *Ph. Eur.* é possível a combinação de resultados válidos obtidos em ensaios independentes de potência biológica para a liberação de um lote de rhEPO e que no presente estudo, não houve a necessidade de combinação de ensaios para obtenção de resultados satisfatórios em nenhuma das duas linhagens testadas. Esses dados diferem de estudos anteriores, onde foi necessária a combinação de dois ou até três ensaios independentes para obtenção de resultados satisfatórios para uma mesma amostra, tanto na linhagem SW<sup>21,34,35</sup> como em outras linhagens<sup>17-20</sup>. Este fato se deve, provavelmente, à padronização alcançada em nosso Instituto em termos de controle de fatores sistemáticos que podem interferir no resultado final de um ensaio, tais como faixa de peso corpóreo e idade dos animais; temperatura e umidade ambiental do biotério; precisão no preparo das amostras e na leitura de reticulócitos; uso de instrumentos calibrados etc. que consequentemente geraram resultados com variabilidade adequada ao tipo do ensaio.

A variabilidade de ensaios *in vivo* é bem conhecida e muito maior que aquela esperada para outros tipos de ensaios, como e.g. ensaios químicos. Segundo a OMS<sup>36</sup> ensaios biológicos, sejam eles *in vitro* ou *in vivo*, podem apresentar variabilidade acima de 50 %. Neste contexto, Fitzgerald et al<sup>37</sup> recomendam a utilização do padrão de referência, incluído em cada ensaio, para avaliar e auxiliar no controle desta variabilidade.

O ANOVA realizado entre os resultados de potência das linhagens SW e B6D2F1 demonstrou, para um nível de significância  $\alpha = 0,05$ , que os dados são homogêneos e que não houve evidência estatística que comprovasse que os resultados obtidos com ambas as linhagens não sejam concordantes (valor  $p > 0,05$ ).

Observando a média de quadrados (MQ) entre grupos (variância entre grupos) e a MQ dentro dos grupos (variância dentro dos grupos) vimos que a variação entre grupos não contribui

mais que a variação dentro dos grupos. Isto também demonstra a homogeneidade entre os grupos avaliados.

A concordância também pode ser demonstrada por meio da avaliação da homogeneidade entre as linhagens pelo teste do qui-quadrado (Tabela 2). Um total de 90,90 % dos pares de resultados foram considerados homogêneos, uma proporção significativa de ensaios concordantes.

Segundo Bland e Altman<sup>29</sup>, medir as diferenças entre dois métodos para cada amostra e testá-las contra as médias é a melhor maneira de avaliar a relação entre os métodos. Aplicando essa regra aos nossos dados (Figura 1), ficou demonstrada considerável concordância entre as linhagens avaliadas. Tendo em vista a tendência de 0,1818, ou seja, as diferenças não se afastaram de zero de forma significativa, além de ser possível observar a dispersão aleatória das diferenças em torno da média, uma vez que os resultados se mantiveram dentro dos limites de concordância (-21,29 a 21,66), com exceção de apenas um valor que ficou fora. A dispersão das diferenças ao longo da linha zero é uma indicação da concordância entre dois métodos<sup>29</sup>.

A concordância entre as linhagens SW e B6D2F1 pode ainda ser demonstrada pela avaliação dos Erros Relativos entre as linhagens (Figura 2). Apenas um ER, dos 22, ficou fora do intervalo  $\pm 30\%$  (-33 %), sendo que a maioria ficou dentro de  $\pm 10\%$ .

A regra 4-6-30<sup>32</sup> para veracidade foi atendida, ou seja, 1 resultado em 22 (4,54 %) se apresentou fora do limite de aceitação de  $\pm 30\%$ , logo 95,45 % dos resultados se mantiveram dentro do limite de aceitação de  $\pm 30\%$ . A regra preconiza que 4 em 6 amostras (66,67 %) devem estar dentro os limites de aceitação de 30 %.

O CV% máximo esperado entre as linhagens era de 30 %, no entanto todos os valores de CV (Tabela 1 e Figura 3) ficaram abaixo de 30 % e a maioria dentro de 10 %, demonstrando uma baixa variabilidade (imprecisão) entre as linhagens.

Outro ponto importante é em relação ao custo de obtenção dessas duas linhagens. Uma fêmea de seis semanas de idade da linhagem SW custa cerca de US 5,20, o custo da linhagem

B6D2F1 é de cerca de US 25,40<sup>25</sup>. Se calcularmos o custo de um ensaio com 36 animais da linhagem SW, o valor por ensaio ficaria em torno de US 187,20. Já o custo do ensaio para a linhagem B6D2F1 ficaria em torno de US 914,40.

## CONCLUSÃO

O ensaio de potência utilizando a linhagem SW demonstrou estar padronizado e apresentou alta concordância com os resultados utilizando a linhagem B6D2F1.

Para os parâmetros avaliados, tais como precisão intra- e inter-ensaios e veracidade, com ambas as linhagens testadas, os valores obtidos foram conformes e satisfatórios para os 22 lotes analisados.

Cabe ressaltar que camundongos das linhagens SW e B6D2F1 geraram resultados estatisticamente semelhantes e homogêneos, portanto, podem ser consideradas linhagens com resposta concordantes na avaliação da potência biológica de rhEPO. Por fim, pode-se concluir que esta linhagem pode ser empregada na avaliação da potência biológica de rhEPO para fins regulatórios.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho é parte da dissertação de mestrado de Michele Cardoso do Nascimento apresentada no Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária do INCQS/Fiocruz. Isabella Fernandes Delgado é bolsista de produtividade do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (DT-II/CNPq).

## REFERÊNCIAS

1. Jacobson LO, Goldwasser L, Fried W, Plzak L. Role of the kidney in erythropoiesis. *Nature*. 1957; 170: 633-4. [DOI:10.1038/179633a0].
2. Fried W. The liver as a source of extrarenal erythropoietin production. *Blood*. 1972;40: 671-7.

3. Zanjani ED, Ascensão JL, Mcglave PB, Banisadre M, Ash RC. Studies on the liver to kidney switch of erythropoietin production. *J Clin Invest*.1981;67:1183-8. [DOI: 10.1172/JCI110133].
4. Koury ST, Bondurant MC, Semenza GL, Koury MJ. The use of *in situ* hybridization to study erythropoietin gene expression in murine kidney and liver. *Microsc Res Tech*. 1993;25(1):29-39. [DOI: 10.1002/jemt.1070250106].
5. Fisher JW, Koury S, Ducey T, Mendel S. Erythropoietin production by interstitial cells of hypoxic monkey kidneys. *Br J Haematol*. 1996;95(1):27-32. [DOI: 10.1046/j.1365-2141.1996.d01-1864.x].
6. Miyake T, Kung CK, Goldwasser E. Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem*. 1977;252: 5558-64.
7. Lin F, Suggs S, Lin C, Browne JK, Smalling R, Egrie JC, et al. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985;82(22):7580-4. [DOI: 10.1073/pnas.82.22.7580].
8. Faris PM, Ritter MA, Abels RI. The effects of recombinant human erythropoietin on perioperative transfusion requirements in patients having major orthopedic operation. The American Erythropoietin Study Group. *J Bone Joint Surg Am*.1996;78(1):62-72.
9. Rizzo JD, Seidenfeld J, Piper M, Aronson N, Lichtin A, Littlewood TJ. Erythropoietin: a paradigm for the development of practice guidelines. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2001;10-30. [DOI: 10.1182/asheducation-2001].
10. Saag MS, Bowers P, Leitz GJ, Levine AM. Once-weekly epoetin alfa improves quality of life and increases hemoglobin in anemic HIV+ patients. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2004;20(10):1037-45. [DOI:10.1089/aid.2004.20.1037].
11. Aapro MS, Dale DC, Blasi M, Sarokhan B, Ahmed F, Woodman RC. Epoetin alfa increases hemoglobin levels and improves quality of life in anemic geriatric cancer patients receiving chemotherapy. *Support Care Cancer*. 2006;14(12):1184-94. [DOI: 10.1007/s00520-006-0076-z].
12. Guan X, Chen L. Role of erythropoietin in cancer-related anaemia: a double-edged sword? *J Int Med Res*. 2008;36(1):1-8. [DOI: 10.1177/147323000803600101].
13. World health Organization - WHO. WHO Drug Information. Geneva, Switzerland. 2010;24(1):40p.
14. Brinks V, Hawe A, Basmeleh AHH, Joachin-Rodriguez L, Somsen GW, Jiskoot W, et al. Quality Original and Biosimilar Epoetin Products. *Pharm. Res*. 2011;28(2):386-93. [DOI: 10.1007/s11095-010-0288-2].
15. Council of Europe. Erythropoietin concentrated solution, Monograph 1316. Strasbourg, France. Pharmeuropa. 2011.[DOI: 180.168.103.34:7947/zl/EP7/1316E].
16. European Centre for the Validation of Alternative Methods - ECVAM. Statement on the batch potency testing of erythropoietin concentrated solution. *Altern Lab Anim*. 2002;30:487-9.
17. Albertengo ME, Valcarce GA, Oliva LM, Baiges DL, Alonso BS, Chiale CA. Eritropoietina recombinante humana: método de valoración *in vivo* con ratones normocitémicos. *Sangre (Barc)*.1999;44:357-63.
18. Ramos AS, Schmidt CA, Andrade SS, Fronza M, Rafferty B, Dalmora SL. Biological evaluation of recombinant human erythropoietin in pharmaceutical products. *Braz J Med Biol Res*. 2003;36(11):1561-9. [DOI: 10.1590/S0100-879X2003001100014].
19. Schmidt CA, Ramos AS, da Silva JEP, Fronza M, Dalmora SL. Avaliação da atividade e caracterização de Eritropoietina humana recombinante em produtos farmacêuticos. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2003;47:183-9. [DOI: 10.1590/S0004-27302003000200012].
20. Barth T, Oliveira PR, D'Avila FB, Dalmora SL. Validation of the normocythemice mice bioassay for the potency evaluation of recombinant human erythropoietin in pharmaceutical formulations. *J AOAC Int*. 2008;91(2):285-91. [DOI: 10.1590/S1516-8913201500228].
21. Silva IB, Mattos KA, Dick PC, Almeida AS, Silva RG, Hokama DA, Paumgarten FJR. Ensaio de potência da alfaepoetina: Comparação de camundongos *Swiss Webster*, NIH, C57BL6, BALB/c com o híbrido B6D2F1. *Vig Sanit Debate*. 2013;1:49-58.

22. Taconic. Animals models list. B6D2F1. 2011. [acesso 2011 ago 22] Disponível em: [http://www.taconic.com/wmspage.cfm?parm1=763].
23. Universidade Federal Fluminense. 2011. Classificação Genética dos Animais de Laboratório. [acesso 2011 ago 22]. Disponível em: [www.uff.br/animaislab/ap6.doc].
24. Mouse Genome Informatics – MGI. International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice. Guidelines for nomenclature of mouse and rat strains. Revised: September 2010. [acesso 2011 mai 25]. Disponível em: [www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/strains.shtml#definition]. [DOI: 10.1177/0300985810374837].
25. Taconic. Animals models list. 2013. [acesso 2013 mar 10]. Disponível em: [http://www.taconic.com/wmspage.cfm?parm1=856].
26. Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde - INCQS. POP 65.3430.042: ensaio para avaliação “in vivo” da potência biológica de eritropoietina humana recombinante. Rev.01. Rio de Janeiro. 2012. 17p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).
27. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare - EDQM. CombiStats, version 5.0, 2013.
28. Council of Europe. Statistical analysis. Strasbourg, France. Pharmeuropa. 2012.
29. Bland JM, Altman DG. Statistical method for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*. 1986;1:307-10. [DOI: 10.1590/S1678-77572011000500009].
30. Food and Drug Administration - FDA. Guidance for industry: bioanalytical method validation. Rockville, 2001.
31. Hoffman D, Kringle R. A total error approach for the validation of quantitative analytical methods. *Pharm Res*. 2007;24(6):1157-63.
32. United States Pharmacopoeia – USP. Mon. <1033>; Biological Assay Validation, in: USP 35 NF30, 1<sup>st</sup> Sup. Rockville, 2012.
33. International Organization for Standardization - ISO. ISO N° 3534-2. Statistics - Vocabulary and Symbols. Applied Statistics. Part 2. Geneva, Switzerland, 2006.
34. Lopes MC. Avaliação da potência biológica da eritropoietina humana recombinante em produtos farmacêuticos: estudo comparativo entre as linhagens de camundongos B6D2F1 e *Swiss Webster* [dissertação de mestrado]. Rio de Janeiro (RJ): Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz; 2004. [DOI: 10.1590/S0004-27302003000200012].
35. Costa RN, Abreu CLC, Nascimento MC, Nogueira ACMA, Delgado IF. Evaluation of the applicability of *swiss webster* lineage on the biological potency test of recombinant human erythropoietin. *Int J Biosaf Biosec*. 2010;1:49-59.
36. World Health Organization – WHO. Validation. *In: WHO, A WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements*. Geneva, Switzerland, 1997.
37. Fitzgerald EA, Gallagher M, Hunter WS, Seligmann EB Jr. Use of the antibody assay in immunized mice for the determination of rabies vaccine potency. *Dev Biol Stand*. 1978;40:183-6.

# Determinação de fluoreto em baixas concentrações: validação de método com eletrodo íon seletivo para análise da água utilizada na preparação de soluções de diálise

## Determination of fluoride at low concentrations: validation of method using ion selective electrode to analyze the water used in the preparation of dialysis solutions

RIALA6/1669

Sérgio DOVIDAUSKAS<sup>1\*</sup>, Isaura Akemi OKADA<sup>1</sup>, Marina Miyuki OKADA<sup>1</sup>, Rita de Cássia BRIGANTI<sup>1</sup>, Camila Cardoso de OLIVEIRA<sup>2</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas, Centro de Laboratório Regional de Ribeirão Preto, Instituto Adolfo Lutz. Rua Minas nº 877, Ribeirão Preto, SP, Brasil, CEP: 14085-410. Tel: 16 3625-5046. E-mail: sergio2794@terra.com.br

<sup>2</sup>Núcleo de Análise e Tratamento de Dados, Centro de Materiais de Referência, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP

Recebido: 16.11.2014 - Aceito para publicação: 28.08.2015

### RESUMO

Este trabalho descreve o desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinar a concentração de fluoreto em água empregada para a preparação de soluções de diálise, por meio de potenciometria com eletrodo íon seletivo. Os parâmetros de validação investigados foram: seletividade, homoscedasticidade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, veracidade de medição e precisão. As condições otimizadas de análise foram: tampão HOAc/-OAc/NaCl/CDTA (pH = 5,0 ± 0,1), na proporção 10:1 (amostra/tampão); concentrações das soluções-padrão da curva analítica: 0,05 a 0,80 mg/L. O método avaliado exibiu parâmetros de validação adequados com limites de detecção e de quantificação, respectivamente, de 0,020 e 0,050 mg/L. Ademais, foi também desenvolvida e validada uma planilha eletrônica para efetuar o monitoramento da qualidade da curva analítica do método que calcula o limite de decisão para 0,20 mg/L.

**Palavras-chave.** fluoreto, água, diálise, potenciometria, eletrodo íon seletivo, validação de método.

### ABSTRACT

This paper describes the development and validation of an analytical methodology for determining the concentration of fluoride in water used for the preparation of dialysis solutions, by means of potentiometry with ion selective electrode. The investigated validation parameters were: selectivity, homoscedasticity, linearity, limit of detection, limit of quantification, reliability of measurement and precision. The optimized conditions of analysis were: HOAc/-OAc/NaCl/CDTA buffer (pH = 5.0 ± 0.1), in ratio of 10:1 (sample/buffer); concentrations of the standard solutions in the analytical curve: 0.05-0.80 mg/L. The evaluated method exhibited suitable validation parameters with detection and quantification limits equal to 0.020 and 0.050 mg/L, respectively. Also, an electronic spreadsheet was developed and validated for monitoring the quality of analytical curve of the methodology that calculates the decision limit to 0.20 mg/L.

**Keywords.** fluoride, water, dialysis, potentiometry, ion selective electrode, method validation.

## INTRODUÇÃO

Em termos de Saúde Pública, é comum inicialmente associar o flúor (ou fluoreto, seu respectivo ânion) à sua ação benéfica no controle da progressão da cárie dentária, principalmente através do seu uso sistêmico em águas destinadas ao consumo humano (fluoretação) e do seu uso tópico em dentifrícios<sup>1</sup>. Em um segundo momento, passa-se a considerar a ocorrência da fluorose dentária e, em casos mais graves, da fluorose óssea, ambos em virtude da ingestão excessiva de fluoreto. Esta ingestão excessiva pode ocorrer pela exposição ao ar (como em certas províncias da China, nas quais o cozimento e a cura de alimentos são feitas através da queima de carvão rico em fluoretos), pelo consumo de alguns alimentos (como as folhas de chá comprimidas em blocos, o popular “bricktea” na Ásia), ou mesmo pela água (como no Quênia, onde a concentração de fluoreto em alguns lagos pode ser extremamente alta, chegando a atingir 2800 mg/L). Até o presente, não há nenhuma evidência consistente correlacionando o consumo de água fluoretada com morbidade ou mortalidade devido à ocorrência de câncer<sup>2</sup>.

Desta forma, além de se encontrar na literatura estudos lidando com a presença de fluoreto em águas<sup>3,4</sup>, também encontram-se trabalhos envolvendo a presença de fluoreto em alimentos<sup>5,6</sup> e fluoreto como contaminante no meio-ambiente, oriundo das indústrias de fertilizantes, cerâmicas, vidrarias e adesivos, além da indústria metalúrgica (aço, cobre e níquel)<sup>7</sup>. No papel de contaminante, é preciso considerar que, além dos impactos sobre a água e os alimentos, o fluoreto pode atuar dramaticamente no ecossistema, interferindo no ciclo de nutrientes ambientais através de reações com carbono orgânico, alumínio e ferro, por exemplo<sup>8</sup>. Com relação à fluorose, Fewtrell et al<sup>9</sup> procuraram inclusive estimar a Carga Global de Doença (a *Global Burden of Disease*, da Organização Mundial da Saúde) em virtude do fluoreto naturalmente presente em águas destinadas ao consumo humano em várias regiões do planeta.

Assim, torna-se evidente que a eficácia da

ação benéfica do flúor com relação à saúde bucal fica condicionada a uma quantidade ótima de ingestão: acima desta quantidade existe o risco de fluorose, abaixo ocorreria perda da eficácia na redução da cárie dentária – no Estado de São Paulo, por exemplo, 0,7 mg/L é considerada a concentração ideal em águas destinadas ao consumo humano, sendo consideradas dentro do padrão de potabilidade as que apresentarem concentração na faixa 0,6 a 0,8 mg/L<sup>10</sup>. Em termos ambientais, no entanto, o fluoreto é avaliado somente com relação aos seus efeitos toxicológicos.

A este quadro geral da relação entre fluoreto e Saúde Pública, pode-se ainda adicionar um outro aspecto que, embora específico, também é muito importante: a sua indesejável presença em águas destinadas ao preparo de soluções de diálise. No Brasil, por exemplo, a legislação em vigor estabelece um valor máximo permitido (VMP) igual a 0,2 mg/L para águas de Serviços de Diálise<sup>11</sup>. Este VMP relativamente baixo é justificado pela exposição acentuada a que estão sujeitos os pacientes com insuficiência renal crônica, quando são submetidos à hemodiálise (HD) – nesta situação, o volume de água em contato com o paciente pode variar entre 375 e 700 litros por semana<sup>12</sup>. Uma comparação entre dois casos de intoxicação descritos na literatura, um relacionado ao consumo comum de água (como bebida) e outro relacionado ao uso em HD, ressalta a importância do baixo VMP para Serviços de Diálise: (i) em 1980, uma intoxicação severa por fluoreto ocorreu numa feira agrícola realizada em uma escola no Estado de Vermont (EUA), provocada pela ingestão de água com teor de fluoreto em torno de 1000 mg/L – este elevado teor, provocado pela operação inadequada de um equipamento rudimentar de fluoretação, afetou 22 pessoas, causando náuseas e, em casos mais graves, vômitos<sup>13</sup>; (ii) em 1993 (Illinois, EUA), um teor de aproximadamente 20 mg/L na água para a preparação da solução de diálise induziu em vários pacientes sintomas como prurido, náusea, dores de cabeça, dores no peito e nas costas, ocorrendo ainda 3 mortes por ataque cardíaco – neste caso, a contaminação da

água foi devido à falhas na manutenção do sistema de purificação<sup>14</sup>. Outro caso notório em HD é o ocorrido em 1980 em Maryland (EUA): um excesso de flúor na água causou sérias complicações em 8 pacientes, resultando em um óbito<sup>12</sup>. Obviamente que a preocupação com a qualidade da água para diálise não se restringe somente ao controle da presença de fluoreto, mas também a uma variedade de contaminantes químicos e bacteriológicos que podem ser transferidos aos pacientes seja durante as sessões de HD<sup>12-15</sup>, seja no transcurso da diálise peritoneal – o “Programa de Monitoramento da Água Tratada para Hemodiálise do Estado de São Paulo” reflete esta preocupação<sup>16,17</sup>.

Do exposto até aqui, pode-se inicialmente prever duas abordagens na determinação da concentração de fluoreto em amostras de águas: uma voltada para concentrações mais altas, como aquelas esperadas em águas de abastecimento público no Estado de São Paulo, e outra voltada para concentrações mais baixas, como aquelas esperadas em águas para preparação de soluções de diálise.

Entre os métodos disponíveis para a determinação de fluoreto em concentrações mais altas, o método colorimétrico (denominado SPADNS devido ao uso do ácido 4,5-di-hidróxi-3-parasulfofenilazo-2,7-naftaleno-di-sulfônico), e o método potenciométrico com eletrodo íon seletivo (método ISE) são os mais utilizados<sup>18,19</sup>. Algumas características deste segundo método, quando comparadas ao primeiro, tornaram a sua aplicação bastante geral, seja em amostras de águas, de alimentos ou em estudos ambientais: (i) a simples adição de uma solução-tampão adequada (o tampão TISAB, acrônimo de *Total Ionic Strength Adjustment Buffer*) a uma alíquota da amostra, torna o método ISE livre da maioria dos interferentes, ponto crítico no método SPADNS; (ii) amostras coloridas ou turvas devem ser destiladas antes de serem analisadas por SPADNS – esta operação é desnecessária no método ISE; (iii) O método SPADNS, para ser aplicado, exige a ausência de cloro residual livre (CRL) na amostra de água, o que não é necessário no método ISE. Este fato é muito importante se considerarmos que a água para consumo humano

deve conter, no mínimo, 0,2 mg/L de CRL em toda extensão do sistema de distribuição (reservatório e rede), de acordo com a Portaria 2914 do Ministério da Saúde<sup>20</sup>; em adição, se a água tratada utilizada na preparação de solução para diálise originar-se de fonte alternativa, a concentração de CRL deverá ser maior que 0,5 mg/L, conforme especifica a Resolução RDC 11, de 13/03/2014<sup>11</sup>. Para eliminar a interferência do CRL, o método SPADNS utiliza o tóxico arsenito de sódio.

A princípio, esta comparação poderia sugerir que a escolha natural entre os dois métodos para analisar água a ser usada em diálise deveria ser pelo método ISE. Porém, há que se considerar a capacidade de cada método em determinar fluoreto em baixas concentrações. Por exemplo: o *Standards Methods for Examination of Water and Wastewater* informa que uma curva linear de calibração no método SPADNS pode ser construída no intervalo entre 0 (zero) e 1,4 mg/L, enquanto curvas lineares de calibração no método ISE podem ser construídas somente a partir de 0,1 mg/L<sup>19</sup>. Este comportamento não linear (ou “não nernstiano”) do eletrodo íon seletivo para fluoreto a baixas concentrações já tinha sido constatado em 1966, quando Frant e Ross publicaram o primeiro artigo descrevendo a sua construção, funcionamento e aplicação<sup>21</sup>. Esta perda de linearidade tem sido atribuída à contaminação dos reagentes das soluções-tampão utilizadas e à variação na solubilidade (baixa) do cristal de LaF<sub>3</sub> dopado com Eu<sup>3+</sup> (a membrana sólida que constitui o sensor do eletrodo íon seletivo): o citrato, por exemplo, poderia complexar com a membrana cristalina, aumentando a solubilidade do LaF<sub>3</sub>; o acetato, por sua vez, não somente complexaria como também poderia participar de uma reação de troca iônica não reversível com a membrana, o que resultaria na associação definitiva acetato-membrana, caracterizando um envenenamento gradual e progressivo do eletrodo, comprometendo sua veracidade de medição e precisão<sup>22,23</sup>.

No intuito de se melhorar as características da membrana e a performance do método ISE para determinação de fluoreto, o que inclui

estender a faixa de linearidade da curva de calibração a concentrações mais baixas, muitos estudos podem ser encontrados na literatura, dentre os quais pode-se citar algumas abordagens: (i) em 1971, Baumann<sup>24</sup> mostrou que a presença de agentes complexantes de F<sup>-</sup> (como Zr<sup>4+</sup>, Th<sup>4+</sup> e La<sup>3+</sup>) poderia estender a resposta nernstiana até 10<sup>-9</sup> mol/L (aproximadamente 0,02 µg/L); contudo, esta capacidade do eletrodo em reconhecer fluoreto em baixíssimas concentrações não foi utilizada na determinação de fluoreto em amostras; (ii) a importância da solução-tampão na determinação de fluoreto é reconhecida desde a década de 1970: em 1977, Kauranen<sup>25</sup> estudou a influência da composição em 17 tampões e, em 1981, Nicholson e Duff<sup>22</sup> fizeram estudo semelhante, envolvendo outros 11 tampões; posteriormente, foram investigadas composições soluções-tampão específicas para a análise de fluoreto em baixas concentrações<sup>23,26</sup>, incluindo a análise em águas para diálise<sup>27</sup>; (iii) em 2011, pesquisadores da área de Odontologia, preocupados com a padronização de métodos para a análise de fluoreto em amostras biológicas e não-biológicas, publicaram um artigo sugerindo protocolos padronizados para minimizar as diferenças observadas em um estudo interlaboratorial<sup>28</sup>, recomendando que acima de 0,0105 µmol/g (aproximadamente 0,2 mg/g de amostra) a regressão linear da curva de calibração fosse utilizada, enquanto que abaixo deste valor a correção de branco ou a regressão polinomial seriam os procedimentos mais adequados.

Neste contexto, este artigo descreve o desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica para a determinação da concentração de fluoreto em água usada para a preparação de soluções de diálise, através do estudo do comportamento eletroquímico deste ânion em soluções aquosas (baixas concentrações), por potenciometria com eletrodo íon seletivo utilizando calibração externa de modo a produzir a melhor precisão no valor do VMP (0,2 mg/L). Em adição, é brevemente descrita uma planilha eletrônica construída em software *Excel 2010*<sup>®</sup> para o controle da qualidade da curva analítica do método.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Materiais e reagentes

A água usada nas preparações foi previamente destilada e desionizada. Todos os reagentes utilizados eram de grau analítico (marcas Merck<sup>®</sup>, Synth<sup>®</sup> e Vetec<sup>®</sup>). Solução-padrão de fluoreto foi preparada em água destilada e desionizada a partir de NaF anidro, marca Merck<sup>®</sup> com pureza 99 % (mínimo), previamente seco em estufa a 105 °C por 2 horas. Para o estudo da interferência de íons hidroxila, três soluções tampão de acetato (TISAB II) de pHs diferentes foram preparadas segundo o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*<sup>19</sup>, com o pH final sendo ajustado para os valores 4,50, 5,00 e 5,50, e três soluções tampão de citrato (TISAB III) de pHs diferentes foram preparadas segundo normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz<sup>18</sup>, com o pH final sendo ajustado para os valores 5,00, 5,50 e 6,00. Para o estudo da interferência dos íons Al<sup>3+</sup> e Fe<sup>3+</sup>, foram utilizadas soluções padrão 1002 ± 5 mg/L (Inorganic Ventures) de cada um dos íons e, para efeito de comparação, uma solução tampão semelhante ao TISAB II foi preparada, mas sem a presença do ácido 1,2-ciclohexileno-dinitrilo-tetracético (CDTA), sendo designada como TISAB II SEM CDTA. Na avaliação da veracidade da medição e da precisão, foram usados dois materiais de referência certificados (MRC) da Environment Canada: (i) ONTARIO-99, lote 1109, amostra de água de lago, valor declarado igual a 0,63 mg/L com limite para medida individual (2σ) igual a 0,09 mg/L; e (ii) MISSISSIPPI-03, lote 1010, amostra de água de rio, valor declarado igual a 0,15 mg/L e 2σ igual a 0,04 mg/L.

### Procedimentos

Nas medidas de potencial utilizou-se um eletrodo íon-seletivo, marca Digimed<sup>®</sup> modelo DMI-FL2, acoplado a um potenciômetro marca Orion modelo 370. Em uma análise típica: a 50 mL da solução-teste (padrão ou amostra) são adicionados 5 mL de solução tampão (proporção 10:1); o eletrodo íon seletivo é inserido na solução mantida sob agitação, seguindo-se

a medida do potencial após a sua estabilização. A análise estatística dos dados foi realizada nos softwares *Excel 2010*<sup>®</sup> e *OriginPro 9.0*<sup>®</sup>.

### Validação do método

A validação foi conduzida seguindo documento orientativo da Coordenação Geral de Acreditação do Instituto Nacional Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO)<sup>29</sup>, normas ISO<sup>30-32</sup> e recomendações da *International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)*<sup>33</sup>. Os parâmetros de validação investigados foram: seletividade, homoscedasticidade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), veracidade de medição e precisão.

### Planilha eletrônica para controle da qualidade da curva analítica

A planilha foi construída em software *Microsoft Excel 2010*<sup>®</sup>, conforme descrito anteriormente<sup>34,35</sup>, com equações baseadas nas normas ISO 11095<sup>31</sup>, ISO 11843-2<sup>32</sup> e ISO 8466-1<sup>30</sup>, e em recomendações IUPAC<sup>36</sup>. Os cálculos efetuados pela planilha foram validados através da comparação dos resultados gerados com aqueles resultantes do processamento manual dos dados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Seletividade: efeito da solução tampão e do pH

Em concentrações mais altas de fluoreto, o desempenho do eletrodo íon seletivo geralmente não depende do pH na faixa entre 4 e 9, mas em concentrações mais baixas Moritz e Müller<sup>37</sup> mostraram que o LD pode ser fortemente influenciado quando o pH é variado de 4 a 8. Assim, tendo como objetivo a determinação da faixa linear para a construção da curva analítica, experimentos foram realizados de modo a avaliar o impacto de variações de pH nos potenciais do eletrodo em soluções de diferentes concentrações de fluoreto. Para tanto, usaram-se duas soluções tampão comumente utilizadas na análise de águas.

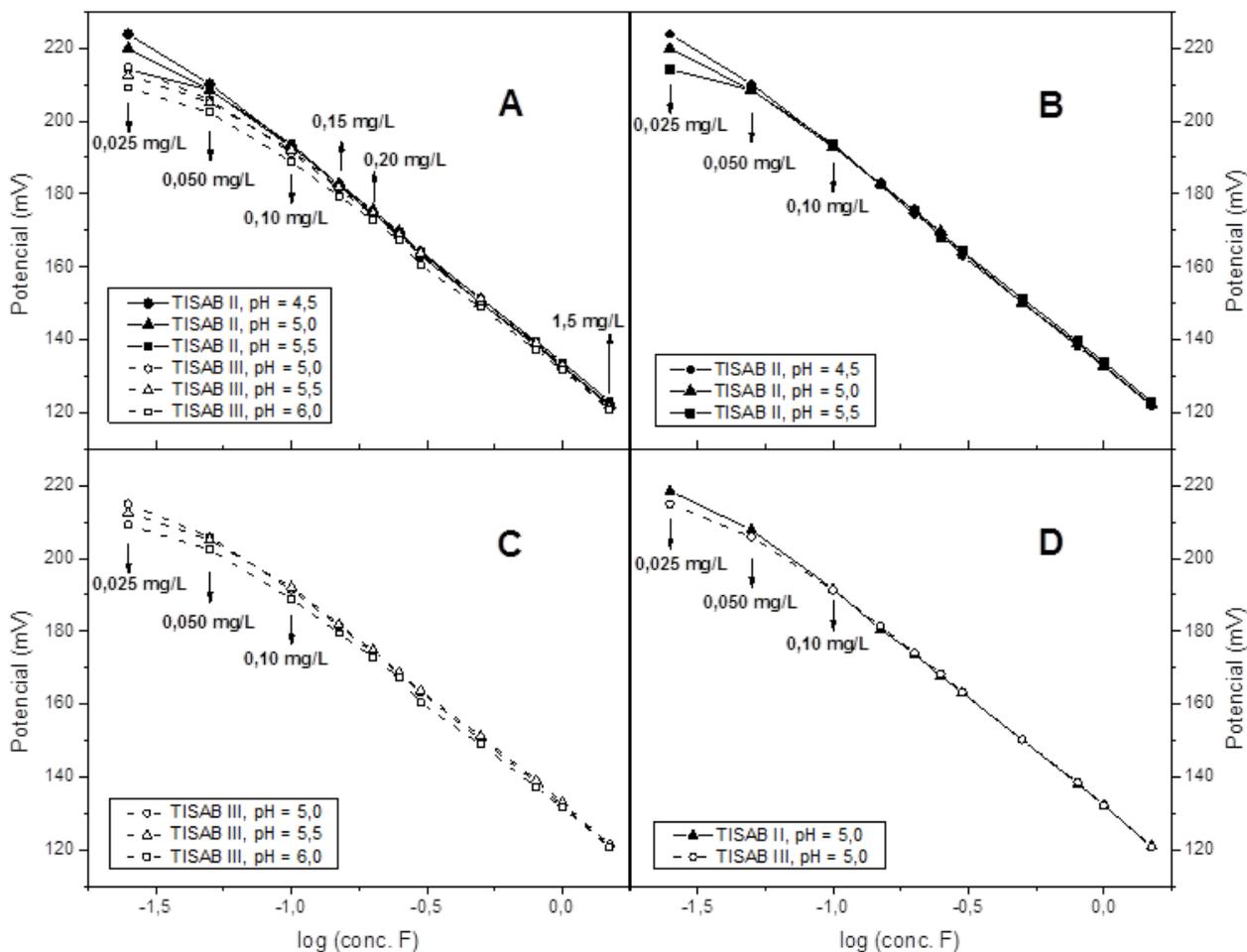
A Figura 1A exibe medidas de potencial obtidas em soluções aquosas de fluoreto no intervalo de concentrações entre 0,05 e 1,5 mg/L, usando-se duas soluções tampão (TISAB II e

TISAB III), cada solução tampão ajustada a três pHs diferentes (cada ponto no gráfico representa a média de ensaios realizados em triplicata). Dois fatos podem ser observados nesta figura: (i) os potenciais obtidos com o uso do tampão TISAB III são sistematicamente menores que os observados para o TISAB II na região de menores concentrações e (ii) o TISAB II mantém o comportamento nernstiano a concentrações menores quando comparado ao TISAB III. Este segundo fato é mais evidente quando se comparam as Figuras 1B e 1C: enquanto a Figura 1B sugere que, no caso do TISAB II, o comportamento nernstiano possa ser estendido até 0,050 mg/L independentemente do pH, a Figura 1C indica que, para o TISAB III, existe uma dependência maior em função do pH: o comportamento nernstiano pode ser assumido acima de 0,10 mg/L em pH = 5,0, e acima de 0,20 mg/L em pH = 6,0. A Figura 1D compara os potenciais obtidos com o uso das duas soluções tampão no mesmo pH (5,0) – neste caso, observa-se que a composição do tampão também influencia a faixa de trabalho: a Figura sugere que esta faixa pode se iniciar em 0,05 mg/L no caso do TISAB II, e em 0,10 mg/L no caso do TISAB III.

Assim, as Figuras 1A-D sugerem que a melhor condição para tamponamento das soluções de fluoreto seria o uso de TISAB II em pH = 4,5. Contudo, deve ser considerado que à medida que o pH é abaixado, o valor se aproxima do pKa do ácido fluorídrico (igual a 3,2), aumentando a fração de fluoreto na forma não dissociada. Desta forma, para a continuidade do trabalho optou-se pelo uso de TISAB II em pH = 5,0 ± 0,1 na proporção 10:1 (amostra: tampão). Este tampão é comumente usado na faixa de pH entre 5,0 e 5,5 na proporção 1:1<sup>19</sup>.

### Seletividade: efeito de íons interferentes (Fe<sup>3+</sup> e Al<sup>3+</sup>)

Além da influência dos íons OH<sup>-</sup> sobre o potencial do eletrodo íon seletivo de fluoreto (mantida sob controle através do tamponamento da solução em pH adequado), os principais interferentes na determinação de fluoreto em amostras de águas são os íons Fe<sup>3+</sup> e Al<sup>3+</sup>. No caso de concentrações mais elevadas, como



**Figura 1.** Influência da solução tampão e do pH nos potenciais do eletrodo íon seletivo de fluoreto em soluções contendo diferentes concentrações de fluoreto

aquelas esperadas nas águas de abastecimento público do Estado de São Paulo, essas interferências já são bem estabelecidas: 200 mg/L de  $Fe^{3+}$  causam um erro negativo de 0,1 mg/L na concentração de fluoreto igual 1 mg/L, e 3,0 mg/L de  $Al^{3+}$  causam um erro de mesma magnitude e direção, com o uso do TISAB II na proporção 1:1<sup>19</sup>. Tendo em vista que o VMP para águas de Serviços de Diálise é igual a 0,2 mg/L, e que a proporção do TISAB II foi alterada assim como a faixa de pH foi restringida em relação ao comumente usado, estudou-se a influência dos dois íons (separadamente) sobre o potencial desenvolvido no eletrodo em uma solução tamponada com TISAB II em pH = 5,0 (proporção 10:1) contendo 0,20 mg/L, de modo a estimar

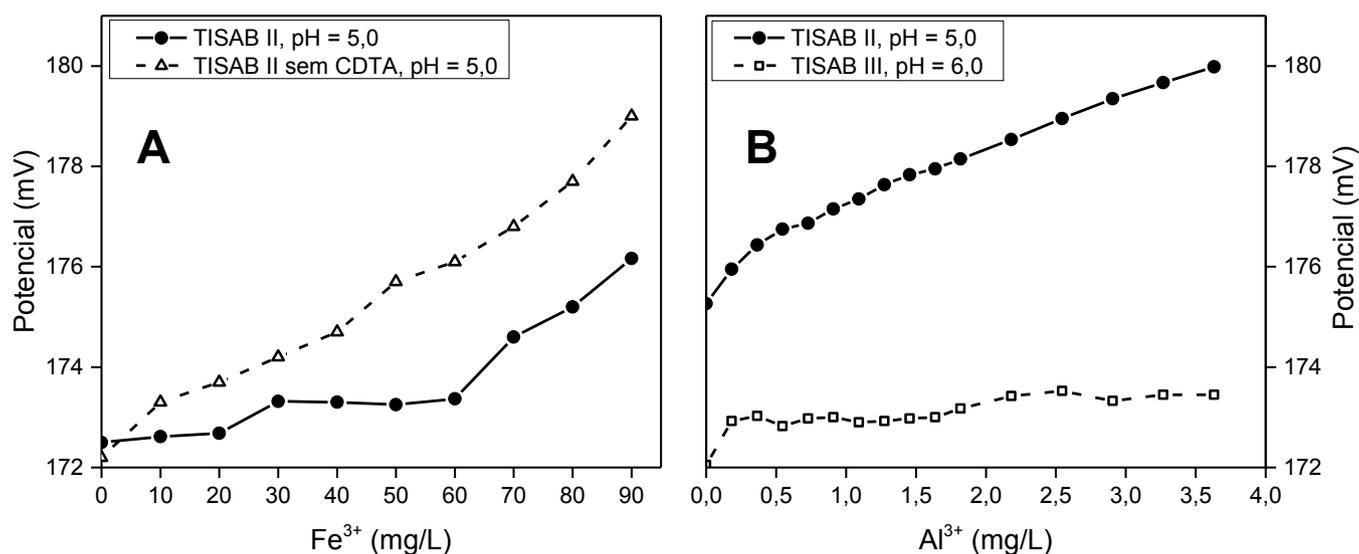
o impacto sobre uma possível tomada de decisão entre conforme e não conforme.

A Figura 2A apresenta a variação dos potenciais do eletrodo em função do aumento da concentração de  $Fe^{3+}$  em duas soluções contendo 0,20 mg/L. Cada uma dessas soluções foi tamponada com duas soluções diferentes (TISAB II e TISAB II SEM CDTA), ambas no mesmo pH ( $5,0 \pm 0,1$ ) e na mesma proporção (10:1). Pode ser observado que na ausência de CDTA, o potencial aumenta continuamente o seu valor, enquanto que em sua presença o potencial tem um discreto aumento até aproximadamente 60 mg/L de  $Fe^{3+}$ ; a partir desta concentração, o potencial aumenta a uma taxa similar à obtida com o TISAB II SEM CDTA. De fato, as

concentrações de fluoreto, estimadas através de curvas analíticas construídas no decorrer dos ensaios, diminuíram de  $0,203 \pm 0,014$  mg/L (0 mg/L de  $\text{Fe}^{3+}$ ) para  $0,176 \pm 0,012$  (90 mg/L de  $\text{Fe}^{3+}$ ), com um valor igual a  $0,195 \pm 0,014$  mg/L na presença de 60 mg/L de  $\text{Fe}^{3+}$ . Nas condições em que os ensaios foram realizados, a quantidade calculada de CDTA disponível permitiria a complexação de 56 mg/L de  $\text{Fe}^{3+}$ , o que é consistente com a mudança de taxa de aumento de potencial observada em torno de 60 mg/L. O teste *t* Student ( $\alpha = 0,05$ ) mostrou que as médias das concentrações na ausência de  $\text{Fe}^{3+}$  e na presença de 60 mg/L não apresentavam diferença significativa ( $P = 0,062$ ). Desta forma, conclui-se que o sistema TISAB II em  $\text{pH} = 5,0 \pm 0,1$  (proporção 10:1) é capaz de limitar interferência significativa de até 60 mg/L de  $\text{Fe}^{3+}$ ; a partir desta concentração, pode ser previsto um erro negativo de magnitude continuamente crescente em função do aumento da concentração de  $\text{Fe}^{3+}$ . Registre-se aqui que a Resolução RDC 11 de 13/03/2014<sup>11</sup> não especifica VMP para este íon.

No caso do  $\text{Al}^{3+}$ , a solução TISAB II ( $\text{pH} = 5,0 \pm 0,1$ , proporção 10:1) não é capaz de limitar a sua interferência, como pode ser observado pela curva crescente de potencial

em função do aumento da concentração de  $\text{Al}^{3+}$  (Figura 2B, linha contínua). Para comparação, os ensaios foram repetidos com o uso da solução TISAB III ( $\text{pH} = 6,0$ , proporção 10:1) e os resultados mostraram uma alta tolerância à presença de  $\text{Al}^{3+}$  sem mudança significativa de potencial (Figura 2B, linha tracejada). A partir de curvas analíticas construídas no decorrer dos ensaios, estimou-se que a presença de 1,6 mg/L de  $\text{Al}^{3+}$  causa um erro de -10% na concentração 0,20 mg/L de  $\text{F}^-$ . Este valor (1,6 mg/L) é 160 vezes maior que o VMP estabelecido pela Resolução RDC 11<sup>11</sup>. Da mesma forma, foram estimadas as concentrações de  $\text{F}^-$  antes e após a primeira adição (ausência de  $\text{Al}^{3+}$  e presença de 0,18 mg/L de  $\text{Al}^{3+}$ , respectivamente) – neste caso, o teste *t* Student entre as médias ( $\alpha = 0,05$ ), não indicou diferença significativa ( $P = 0,058$ ). Desta forma, embora o TISAB II ( $\text{pH} = 5,0 \pm 0,1$  proporção 10:1) não tenha se revelado capaz de limitar a interferência do  $\text{Al}^{3+}$ , resolveu-se continuar o desenvolvimento do método com este tampão em vista de seu potencial em produzir curvas de calibração lineares a concentrações mais baixas – a interferência da presença de até 0,18 mg/L de  $\text{Al}^{3+}$  foi considerada não significativa.

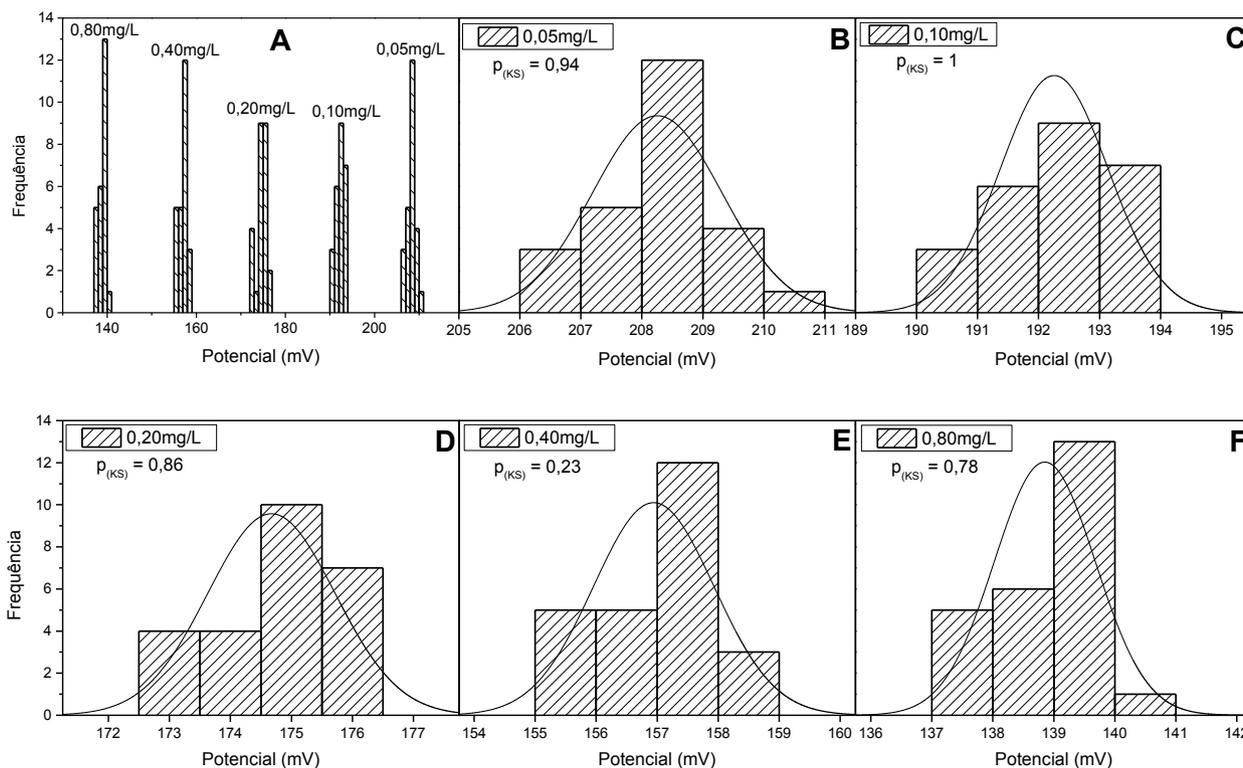


**Figura 2.** Influência da presença de  $\text{Fe}^{3+}$  (A) e  $\text{Al}^{3+}$  (B) no potencial do eletrodo íon seletivo de fluoreto em uma solução contendo 0,20 mg<sup>F</sup>-/L. Cada ponto nos gráficos representa a média de potenciais obtidos de ensaios realizados em triplicata

### Homoscedasticidade dos sinais analíticos das soluções padrão da curva analítica

Considerando que a curva analítica adequada para a determinação de fluoreto em águas para diálise deve promover a melhor precisão na concentração correspondente ao VMP, e que os potenciais são grafados em função do logaritmo da concentração, planejou-se inicialmente uma curva analítica cuja posição central em termos logarítmicos correspondesse a 0,20 mg/L. Assim, as concentrações escolhidas foram 0,05, 0,10, 0,20, 0,40, e 0,80 mg/L. A Figura 3A exibe os histogramas dos potenciais obtidos para 25 soluções de cada uma dessas concentrações, enquanto as Figuras 3B-F apresentam cada um desses histogramas em particular. Nesses histogramas podemos observar que os valores  $p$  calculados pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov são maiores que um nível de significância igual a 0,05 – isso

implica que, nesse nível de significância, os sinais analíticos das 5 soluções padrão podem ser consideradas com distribuição normal. Para testar a homoscedasticidade, realizou-se o teste de homogeneidade das variâncias segundo a ISO 8466-1<sup>30</sup> (nível de significância = 0,01), que consiste em se fazer um teste F entre as variâncias da solução de menor concentração com a de maior concentração (no nosso caso, 0,05 e 0,80 mg/L, respectivamente). O valor de F calculado (denominado de “valor PG” na norma ISO) resultou em 1,65, um valor menor que o de F tabelado (igual a 2,66). Desta forma, considerou-se que as variâncias eram homogêneas, ou seja, que uma regressão linear por mínimos quadrados ordinários (ISO 11095<sup>31</sup> e ISO 8466-1<sup>30</sup>) ou uma regressão polinomial de segunda ordem (ISO 8466-2<sup>38</sup>) poderiam ser empregadas no ajuste de uma função matemática aos dados.



**Figura 3.** Histogramas de 25 sinais analíticos das soluções padrão de fluoreto de concentrações 0,05 a 0,80 mg/L (A). As Figuras B-F são os histogramas individuais do conjunto exibido na Figura A, com respectivas curvas normais ( $p_{(KS)}$  é a probabilidade calculada pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov)

### Linearidade

Para testar a linearidade dos dados da curva analítica, seguiu-se o procedimento indicado na ISO 8466-1<sup>30</sup>. O teste estatístico para linearidade consiste no cálculo do valor da estatística PG pela equação 1:

$$PG = \frac{DS^2}{s_{y2}^2} \quad (1)$$

onde

- $s_{y2}^2$  = variância da função de calibração não-linear
- $DS^2$  = diferença de variâncias, calculada pela equação 2

$$DS^2 = (N - 2)s_{y1}^2 - (N - 3)s_{y2}^2 \quad (2)$$

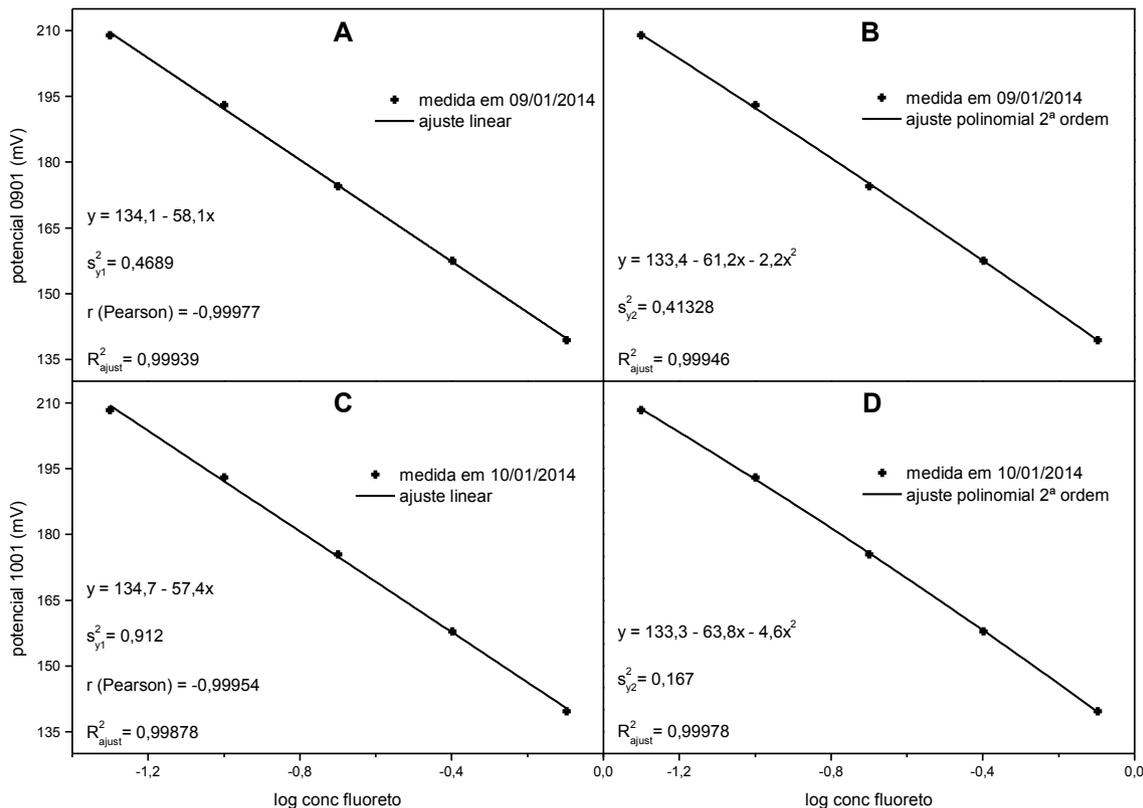
onde

- $N$  = número de soluções-padrão
- $s_{y1}^2$  = variância da função de calibração

linear

O valor calculado de PG é então comparado com o valor de F tabelado, conduzindo a duas decisões possíveis: a) se  $PG \leq F$ : a função de calibração não-linear não promove um ajuste significativamente melhor – a função de calibração é considerada linear; b) se  $PG > F$ : os dados devem ser avaliados usando uma função de calibração não-linear.

As dados obtidos em um experimento de medidas (em duplicata) de potencial de soluções padrão 0,05, 0,10, 0,20, 0,40, e 0,80 mg/L procedeu-se a um ajuste linear e a um ajuste não-linear (polinômio de 2ª ordem). As Figuras 4A e 4B apresentam esses dois ajustes. O valor de PG calculado (1,40) é muito menor que o valor de F tabelado ( $F = 18,51$ ) para um nível de significância  $\alpha = 0,05$ . De fato, este resultado era esperado uma vez que a simples inspeção visual do gráfico potencial *versus* log (concentração) sugeriu a regressão linear como aplicável aos dados, enquanto os coeficientes de correlação ( $r$ , Pearson)



**Figura 4.** Curvas analíticas construídas por meio de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ordinários (A e C) e de regressão polinomial de 2ª ordem (B e D). Os pares de curvas A-B e C-D foram construídas a partir dos dados obtidos em dois experimentos diferentes

e de determinação ajustado ( $R^2_{ajust}$ ) obtidos prenunciaram o resultado do teste da estatística PG, assim como os valores relativamente próximos das variâncias  $s^2_{y1}$  e  $s^2_{y2}$ . Contudo, observou-se que uma pequena variação nos dados experimentais pode ocasionar uma grande variação na estatística PG. Tal fato é ilustrado nas Figuras 4C e 4D, em que os mesmos ajustes (linear e polinomial de 2ª ordem) foram aplicados a dados obtidos posteriormente. Neste caso, tanto a inspeção visual como os valores de  $r$  e  $R^2_{ajust}$  apresentam características similares aos exibidos nas Figuras 4A e 4B, mas as variâncias  $s^2_{y1}$  e  $s^2_{y2}$  apresentam valores bastante diferentes entre si (0,912 e 0,167, respectivamente) o que conduziu a uma  $PG = 14,4$ , um valor ainda menor que o valor crítico de  $F(18,51)$ . Assim, apesar dessa diferença entre as estatísticas PG nos dois experimentos, ambos produziram dados aos quais a regressão linear por mínimos quadrados ordinários pôde ser aplicada para o ajuste matemático da função de calibração. Ressalte-se que em todas as curvas analíticas construídas posteriormente o valor de  $R^2_{ajust}$  para o ajuste de uma função linear foi maior que 0,999.

### Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Como discutido anteriormente, a curva analítica foi considerada linear acima de 0,05 mg/L. Portanto, considerou-se essa concentração como o LQ do método.

No caso do LD, não se pôde calculá-lo como o faz a ISO 11843-2<sup>32</sup>, ou seja, a partir de dados da curva analítica, uma vez que a função matemática ajustada não está definida para valores menores que 0,05 mg/L. Por outro lado, também não se pôde calculá-lo a partir de medidas de soluções isentas de fluoreto (brancos), como sugerido pelo documento orientativo DOQ-CGCRE-008 (INMETRO)<sup>29</sup>, uma vez que o potencial do eletrodo íon seletivo não se estabiliza nessa condição (fluoreto ausente)<sup>37</sup>. A alternativa que se seguiu para o cálculo do LD é baseada em recomendações da IUPAC<sup>39</sup>: o LD corresponde ao ponto de intersecção entre a extrapolação do segmento linear da curva analítica na direção de concentrações mais

baixas e a extrapolação dos pontos de mais baixa concentração do segmento não-linear na direção de concentrações mais altas. Seguindo este procedimento gráfico, o LD foi estimado em 0,020 mg/L.

### Veracidade de medição e precisão

A veracidade de medição e a precisão (condições de repetitividade) foram avaliadas com o uso de dois MRCs:

- para o MRC1, com teor de fluoreto declarado igual a  $0,15 \pm 0,04$  mg/L (limite de  $\pm 2\sigma$ ), a concentração determinada em triplicata com o uso da curva analítica linear na faixa 0,05 – 0,80 mg/L resultou em  $0,16 \pm 0,01$  mg/L (intervalo de 95 % de confiança,  $n = 3$ ), indicando uma recuperação de + 106,7 % e coeficiente de variação igual a 3,1 %. Observe-se que a faixa de valores compreendendo a média das concentrações determinadas, acompanhada do respectivo intervalo de confiança 95 %, está inserida na faixa de valores compreendendo o valor declarado do MRC1 acompanhado do seu limite  $2\sigma$ .
- para o MRC2, com teor de fluoreto declarado igual a  $0,63 \pm 0,09$  mg/L (limite de  $\pm 2\sigma$ ), a concentração determinada em triplicata com o uso da curva analítica linear na faixa 0,05 – 0,80 mg/L resultou em  $0,66 \pm 0,02$  mg/L (intervalo de 95 % de confiança,  $n = 3$ ), indicando uma recuperação de +104,8 % com coeficiente de variação igual a 1,2 %. Observe-se que a faixa de valores compreendendo a média das concentrações determinadas, acompanhada do respectivo intervalo de confiança 95 %, está inserida na faixa de valores compreendendo o valor declarado do MRC2 acompanhado do seu limite  $2\sigma$ .

Tanto a veracidade de medição como a precisão foram consideradas satisfatórias.

### Desenvolvimento de planilha eletrônica para o controle da qualidade da curva analítica

Uma vez definida as características básicas da curva de calibração que conduzem ao LD e LQ indicados, bem como à veracidade de medição e à precisão das concentrações

determinadas através do método, desenvolveu-se uma planilha eletrônica capaz de controlar a qualidade da curva analítica ao longo do tempo, ou seja, uma planilha capaz de verificar se aquelas características permanecem válidas após a validação. Esse tipo de planilha já foi descrita em trabalhos anteriores<sup>34, 35</sup>, e aqui descrevemos a principal mudança com relação às planilhas anteriores: o cálculo do limite de decisão (CC $\alpha$ ) para o VMP do fluoreto em águas utilizadas na preparação de soluções de diálise.

A Figura 5 exibe uma visão geral da planilha desenvolvida para o método descrito nesse trabalho. No destaque desta Figura, pode ser observado o cálculo do CC $\alpha$  para 0,20 mg/L baseado nas equações 3 e 4<sup>35</sup>. Os valores de CC $\alpha$  obtidos nas curvas analíticas construídas ( $R^2_{ajust} > 0,999$ ) situaram-se no intervalo entre 0,208 e 0,216 mg/L.

$$y_{c(0,20mg/L)} = \hat{y}_{(0,20mg/L)} - t_{1-\alpha(v)} \cdot \hat{\sigma} \sqrt{\frac{1}{K} + \frac{1}{I \cdot J} + \frac{\bar{x}^2}{J \sum_{i=1}^J (x_i - \bar{x})^2}} \quad (3)$$

$$CC\alpha'_{(0,20mg/L)} = 10 \frac{y_{c(0,20mg/L)} - \hat{a}}{b} \quad (4)$$

Em adição, pode ser observado na Figura 5 que o gráfico de resíduos sugere uma função polinomial de 2ª ordem para o ajuste mais adequado aos dados. Contudo, no caso do eletrodo íon seletivo de fluoreto, deve ser considerada também a sua perda de eficiência em produzir curvas analíticas lineares a concentrações mais baixas em função do tempo de utilização, como já discutido por Okada et al<sup>40</sup>: os autores sugerem a estatística PG como a mais indicada para o monitoramento dessa perda de eficiência – no momento em que  $PG > F_{tabelado}$ , o eletrodo deverá ser substituído.

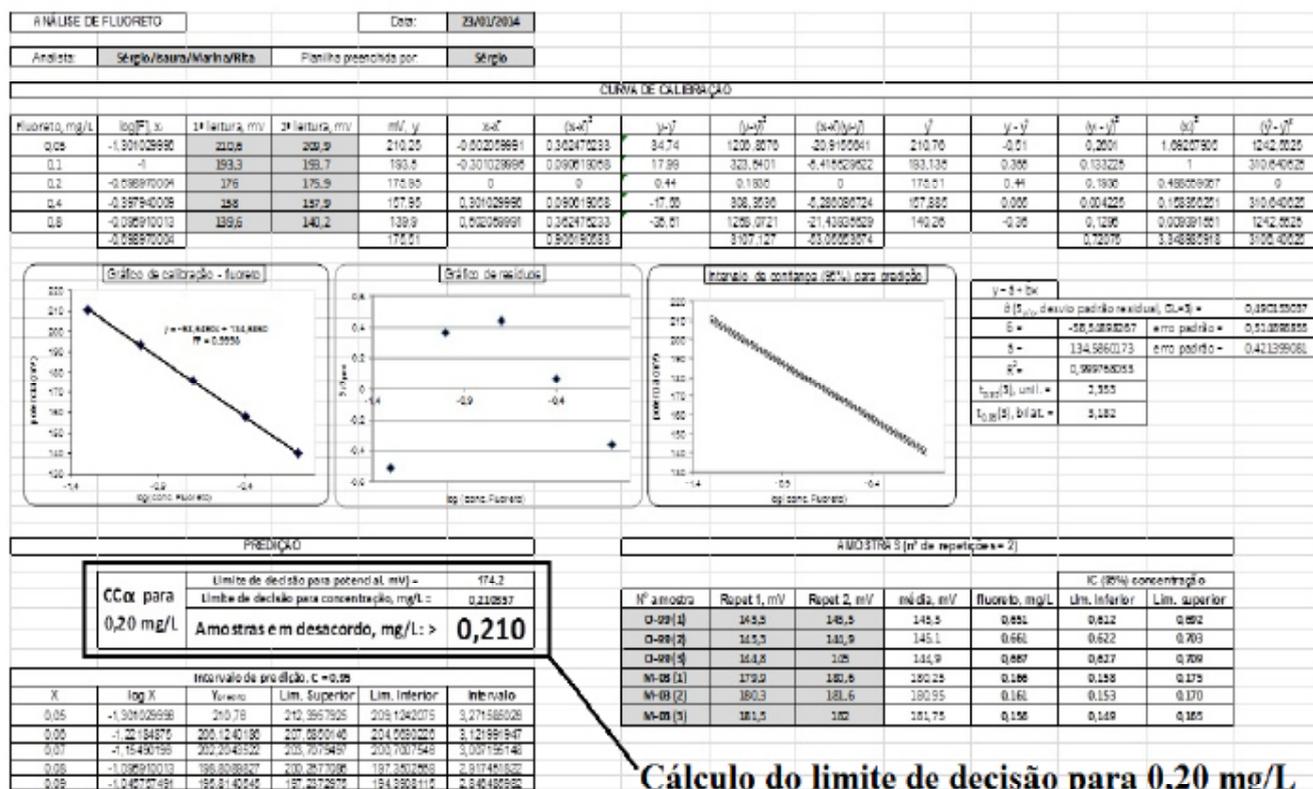


Figura 5. Visualização da planilha desenvolvida para o controle da qualidade da curva analítica da análise de fluoreto em água para diálise. No destaque, as células destinadas ao cálculo do limite de decisão para o VMP (0,20 mg/L)

## CONCLUSÃO

O método aqui descrito exibiu parâmetros de validação adequados à determinação da concentração de fluoreto em águas para a preparação de soluções de diálise na presença de até 60 mg/L de  $\text{Fe}^{3+}$  e de até 0,18 mg/L de  $\text{Al}^{3+}$ . Desse estudo, pode-se destacar que o uso de uma solução tampão comum (TISAB II) promoveu a obtenção de uma curva analítica linear em torno do VMP através do controle rigoroso do pH e da mudança da proporção amostra: tampão geralmente utilizada (de 1:1 para 10:1). Essas mudanças permitiram o uso da calibração externa com a precisão sendo otimizada na região do VMP, evitando assim a extrapolação, intrinsecamente menos precisa, do método de adição de padrão, como sugerido por Freitas et al<sup>27</sup>.

## AGRADECIMENTOS

Aos Pesquisadores Científicos do Instituto Adolfo Lutz Central, Paulo Tiglea (pelo fornecimento dos padrões de  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Al}^{3+}$ ) e Maria Anita Scorsafava (pelo fornecimento dos Materiais de Referência Certificados).

## REFERÊNCIAS

1. Cury JA. Uso do flúor e controle da cárie como doença. *In*: Baratieri L, editor. *Odontologia Restauradora - Fundamentos e Possibilidades*. São Paulo: Editora Santos; 2001. p. 33-68.
2. Fawell J, Bailey K, Chilton J, Dahi E, Fewtrell L, Magara Y. *Fluoride in Drinking-water*. 1st ed. Organization WWH, editor. London: IWA Publishing; 2006. 134 p.
3. Grec RHC, Moura PG, Pessan JP, Ramires I, Costa B, Buzalaf MAR. Concentração de flúor em águas engarrafadas comercializadas no município de São Paulo. *Rev Saúde Pública*. 2008;42(1):154-7. [DOI: 10.1590/S0034-89102008000100022].
4. Frazão P, Peres MA, Cury JA. Qualidade da água para consumo humano e concentração de fluoreto. *Rev Saúde Pública*. 2011;45(5):964-73. [DOI: 10.1590/S0034-89102011005000046].
5. Singer L, Ophaug RH. Determination of fluoride in foods. *J Agric Food Chem*. 1986;34:510-3. [DOI: 10.1021/jf00069a035].
6. Casarin RCV, Fernandes DRM, Lima-Arsati YBO, Cury JA. Concentração de fluoreto em arroz, feijão e alimentos infantis industrializados. *Rev Saúde Pública*. 2007;41(4):549-56. [DOI: 10.1590/S0034-89102006005000034].
7. World Health Organization - WHO. Preventing disease through healthy environments - Inadequate or excess fluoride: a major public health concern. 2010. [acesso 2014 Nov]. Disponível em: [http://www.who.int/ipcs/features/fluoride.pdf?ua=1].
8. DeMarco R, Clarke G, Pejčić B. Ion-selective electrode potentiometry in environmental analysis. *Electroanalysis*. 2007;19(19-20):1987-2001. [DOI:10.1002/elan.200703916].
9. Fewtrell L, Smith S, Kay D, Bartram J. An attempt to estimate the global burden of disease due to fluoride in drinking water. *J Water Health*. 2006;4(4):533-42.
10. Brasil. Secretaria de Estado da Saúde do Estado de São Paulo. Resolução SS-250, de 15 de agosto de 1995. Define teores de concentração do íon fluoreto nas águas para consumo humano, fornecidas por sistemas públicos de abastecimento. *Diário Oficial do Estado de São Paulo, SP*, 16 ago. 1995. Seção 1 p. 11.
11. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 11, de 13 de março de 2014. Dispõe sobre os requisitos de Boas Práticas de Funcionamento para os Serviços de Diálise e dá outras providências. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 14 mar. 2014. Seção 1. p. 40-2.

12. Silva AMM, Martins CTB, Ferraboli R, Jorgetti V, Romão Jr JE. Revisão/Atualização em Diálise: Água para Hemodiálise. *J Bras Nefrol*. 1996;18(2):180-8.[DOI: 10.2166/wh.2006.045].
13. Vogt RL, Witherell L, LaRue D, Klaucke DN. Acute fluoride poisoning associated with an on-site fluoridator in a Vermont Elementary School. *Am J Public Health*. 1982;72(10):1168-9.
14. Arnow PM, Bland LA, Garcia-Houchins S, Fridkin S, Fellner SK. An outbreak of fatal fluoride intoxication in a long-term hemodialysis unit. *Ann Intern Med*. 1994;121(5):339-44. [DOI:10.7326/0003-4819-121-5-199409010-00005].
15. Montanari LB, Sartori FG, Cardoso MJO, Varo SD, Pires RH, Leite CQF, et al. Microbiological contamination of a hemodialysis center water distribution system. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2009;51(1):37-43. [DOI: 10.1590/S0036-46652009000100007].
16. Marcatto MISJ, Grau MAF, Müller NCds. Projeto de reativação e implantação do Programa de Monitoramento da Água Tratada para Hemodiálise do Estado de São Paulo, SP, agosto de 2009. *Bepa*. 2010;7:6-12.
17. Buzzo ML, Bugno A, Almodovar AAB, Kira CS, Carvalho MFH, Souza A, et al. A importância de programas de monitoramento da qualidade da água para diálise na segurança dos pacientes. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2010;69(1):1-6.
18. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - Brasil). Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4ª ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2005. 1018 p.
19. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation - APHA, AWWA, WEF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19th ed. AD E, LS C, AE G, editors. Washington DC; 1995.
20. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 2914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 14 dez. 2011. p.39-46.
21. Frant MS, Ross JW. Electrode for sensing fluoride ion activity in solution. *Science*. 1966;154:1553-5. [DOI: 10.1126/science.154.3756.1553].
22. Nicholson K, Duff EJ. Fluoride determination in water: an optimum buffer system for use with the fluoride-selective electrode. *Anal Letters*. 1981;14(A12):887-912. [DOI: 10.1080/00032718108055488].
23. Fouskaki M, Sotiropoulou S, Koci M, Chaniotakis NA. Morpholinoethanesulfonic acid-based buffer system for improved detection limit and stability of the fluoride ion selective electrode. *Anal Chim Acta*. 2003;478:77-84. [DOI: 10.1016/S0003-2670(02)01481-2].
24. Baumann EW. Sensitivity of the fluoride-selective electrode below the micromolar range. *Anal Chim Acta*. 1971;54:189-97.[DOI: 10.1016/S0003-2670(01)82119-X].
25. Kauranen P. The use of buffers in the determination of fluoride by an ion-selective electrode at low concentrations and in the presence of aluminum. *Anal Letters*. 1977;10(6):451-65. [DOI: 10.1080/00032717708079390].
26. Hara H, Huang C-c. Buffer composition suitable for determining very low fluoride concentrations using a fluoride ion-selective electrode and its application to the continuous analysis of rain water. *Anal Chim Acta*. 1997;338:141-147. [DOI: 10.1016/S0003-2670(96)00432-1].
27. Freitas VPS, Brigido BM, Alge ME, Silva CL, Zenebon O, Antunes JLF. Fluoreto em água: estudo de metodologia analítica e níveis encontrados na região de Campinas. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 1996;56(2):29-36.

28. Martínez-Mier EA, Cury JA, Heilman JR, Katz BP, Levy SM, Li Y, et al. Development of gold standard ion-selective electrode-based methods for fluoride analysis. *Caries Res*. 2011;45:3-12. [DOI: 10.1159/000321657].
29. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - INMETRO. DOC-CGCRE-008: Orientação sobre validação de métodos analíticos - Revisão 04 - JUL/2011: Disponível em [http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8\_04.pdf]. 19 p.
30. International Organization for Standardization -ISO. ISO 8466-1:1990 Water quality - Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics. Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function.
31. International Organization for Standardization - ISO. ISO 11095:1996 Linear calibration using reference materials.
32. International Organization for Standardization - ISO. ISO 11843-2:1997 Capability of detection. Part 1: Terms and definitions. Part 2: Methodology in the linear calibration case.
33. Thompson M, Ellison SLR, Wood R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl Chem*. 2002;74(5):835-55. [DOI: http://dx.doi.org/10.1351/pac200274050835].
34. Dovidauskas S, Okada IA, Sakuma AM, Duran MC, Oliveira CC. Emprego de planilhas eletrônicas, baseado nas normas ISO e recomendações IUPAC, em curvas analíticas da análise de água. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2013;72(1):13-24.
35. Dovidauskas S, Okada IA, Okada MM, Briganti RC, Oliveira CC. Estimando limite de decisão ( $CC\alpha$ ) e capacidade de detecção ( $CC\beta$ ) a partir de curvas analíticas em análises de águas para substâncias com teores permitidos: uma planilha eletrônica para a interpretação de resultados em Laboratórios de Saúde Pública. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2014;73(2):9-18. [DOI: 10.18241/0073-9855201473160].
36. Danzer K, Currie LA. Guidelines for calibration in analytical chemistry. Part 1. Fundamentals and single component calibration. *Pure Appl Chem*. 1998;70(4):993-1014. [DOI: http://dx.doi.org/10.1351/pac199870040993].
37. Moritz W, Müller L. Mechanistic study of fluoride ion sensors. *Analyst*. 1991;116:589-93. [DOI: 10.1039/AN9911600589].
38. International Organization for Standardization - ISO. ISO 8466-2:2001 Water quality - Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics. Part 2: Calibration strategy for non-linear second-order calibration functions.
39. Buck RP, Lindner E. Recommendations for nomenclature of ion-selective electrodes. *Pure Appl Chem*. 1994;66(12):2527-36. [DOI:10.1351/pac199466122527].
40. Okada IA, Okada MM, Briganti RdC, Dovidauskas S. Monitoramento do desempenho do eletrodo íon seletivo de fluoreto através de métodos estatísticos. *Bol Inst Adolfo Lutz*. 2014;24(1):23-5.

# Validação de um método prático para determinação de níveis de amoxicilina em águas naturais por CLAE-UV e sua aplicação na qualidade ambiental

## Validation of a practical method for determination of amoxicillin contents in natural waters by means of HPLC-UV and its application in the environmental quality

RIALA6/1670

Caio Matheus da Rocha Couqueiro Monteiro de OLIVEIRA\*, Kaíque Mesquita CARDOSO, Milena Mendes de SOUZA, José Soares dos SANTOS, Maria Lúcia Pires dos SANTOS

\*Endereço para correspondência: Laboratório de Química Analítica e Ambiental, Departamento de Ciências Naturais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Estrada do Bem Querer, km 4, Vitória da Conquista, BA, Brasil. CEP: 45031-900. E-mail: caiocouqueiro@yahoo.com.br

Recebido: 02.04.2015 - Aceito para publicação: 06.10.2015

### RESUMO

A amoxicilina é penicilina sintética de uso em ambiente hospitalar, residencial e veterinário. O uso indiscriminado deste medicamento pode acarretar prejuízos sociais e ambientais. O presente trabalho determinou os níveis de amoxicilina em dois rios localizados no sudoeste do estado da Bahia, rios Água Fria e Verruga. Uma metodologia analítica foi desenvolvida, otimizada e validada para efetuar a determinação de resíduos de amoxicilina, empregando-se a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector UV-visível (CLAE-UV). A avaliação do mérito do método foi baseada nos parâmetros cromatográficos de validação: linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e seletividade. Devido à inexistência de valores máximos de amoxicilina aceitáveis para a água de consumo, os resultados obtidos podem constituir um indicativo dos níveis de contaminação dos recursos hídricos por este medicamento. As maiores concentrações, superiores a 11 mg.L<sup>-1</sup> deste antibiótico, foram detectadas nas zonas onde recebem aportes dos deflúvios urbanos. Os parâmetros de validação demonstraram que o método apresentou capacidade de detecção de baixos valores dos limites de quantificação (2,7 mg.L<sup>-1</sup>) e de detecção (0,7 mg.L<sup>-1</sup>), boa precisão (DPR 7 %) e exatidão (96,75 %), constituindo-se em uma importante ferramenta na avaliação de teores de amoxicilina.

**Palavras-chave.** antibiótico, cromatografia, recurso hídrico.

### ABSTRACT

Amoxicillin is a synthetic penicillin used in the hospital, residential and veterinary surroundings. The indiscriminate use of such medication may cause social and environmental damages. This study aims at determining the amoxicillin contents in water of two rivers located in State of Bahia, the Água Fria and Verruga rivers. An analytical method was developed, optimized and validated for determining the amoxicillin residue, by using the high performance liquid chromatography coupled with UV-Visible detector (HPLC-UV). The study was performed according to the chromatographic parameters validation. Considering that the maximum acceptable values of amoxicillin for drinking water were nonexistent, the found results might be considered as an indicator of contamination by this substance. The occurrence of this antibiotic in the two rivers analyzed in this study indicated a heavy contamination in the urban areas where the increased surface water runoffs occur; and their concentrations were higher than 11 mg.L<sup>-1</sup>. The validation parameters indicated that the method showed the capacity for detecting low values of quantification limits (2.7 mg.L<sup>-1</sup>) and of detection (0.7 mg.L<sup>-1</sup>), good precision (DSR 7 %) and accuracy (96.75 %), thus it turned to be an important tool for assessing amoxicillin contents.

**Keywords.** antibiotic, chromatography, water resource.

## INTRODUÇÃO

Medicamento é todo produto farmacêutico que tem por finalidade ações profiláticas, curativas, paliativas ou para fins de diagnósticos<sup>1</sup>. São inúmeras as classes de medicamentos existentes devido ao elevado grau de patologias, seja na população urbana ou rural. Independentemente do que se destina a ação do fármaco, uma vez administrado seguirá uma série de etapas, chamada farmacocinética. Sua ação é dividida em absorção, distribuição, metabolização e excreção. É na excreção, etapa final da farmacocinética, que o medicamento será expelido do organismo em quase sua totalidade<sup>2</sup>.

Como as necessidades fisiológicas da maioria da humanidade são realizadas em vasos sanitários domésticos, os dejetos podem seguir caminhos diferentes. Podem ser lançados tanto em rede de esgoto, atingindo as estações de tratamento e fossas sépticas, ou ainda ser despejados diretamente em recurso hídrico, entrando assim em contato com o meio ambiente.

Como muitos fármacos são produtos advindos das indústrias, uma vez lançados no meio ambiente persistem por muito tempo, devido à ausência de micro-organismo para sua degradação<sup>3</sup>. Os locais para detectar a presença de fármacos no ambiente aquático são inúmeros, pois uma vez lançado no ambiente, a ação da chuva pode solubilizar o medicamento em mananciais de superfície ou drená-lo para o lençol freático<sup>4</sup>.

Existem diversas classes de antibióticos, entre as quais a penicilina e seus derivados, como a amoxicilina, por exemplo, que é largamente utilizada tanto em ambiente hospitalar quanto doméstico. Trata-se de um medicamento listado na RENAME (Relação Nacional dos Medicamentos Essenciais), que estabelece quais medicamentos que devem ser utilizados no Sistema Único de Saúde (SUS), por municípios, estados e pela união<sup>5</sup>. De acordo com sua farmacocinética, a amoxicilina é excretada quase em sua totalidade na forma não metabolizada por via renal<sup>2</sup>.

Muitos trabalhos na área da análise de medicamentos utilizam a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a cromatografia gasosa com espectrometria de massas (CG-EM), seguida por etapas de pré-concentração, principalmente por serem consideradas técnicas sensíveis, seletivas,

confiáveis e práticas. A cromatografia é um método de separação que permite de forma ampla a identificação e determinação de componentes químicos de misturas complexas. Entre as técnicas analíticas de separação, a cromatografia líquida de alta eficiência é uma das mais utilizadas, devido à sensibilidade, adaptação e adequação para determinação e separação de espécies não-voláteis ou tecnicamente frágeis, com ampla aplicabilidade às substâncias de interesses para muitos campos da ciência<sup>6</sup>.

Assim, o presente estudo teve como objetivo, otimizar e validar um método analítico qualitativo e quantitativo para investigação da possível presença de amoxicilina nos rios Água Fria e Verruga na região de Vitória da Conquista/BA por CLAE-UV, bem como realizar um estudo da contaminação do ambiente aquático pelo analito.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta e armazenamento das amostras

Foram coletadas 8 amostras de água de rios da cidade, sendo quatro pontos no rio Verruga e quatro pontos no rio Água Fria, em novembro de 2012, período caracterizado como estação seca na região.

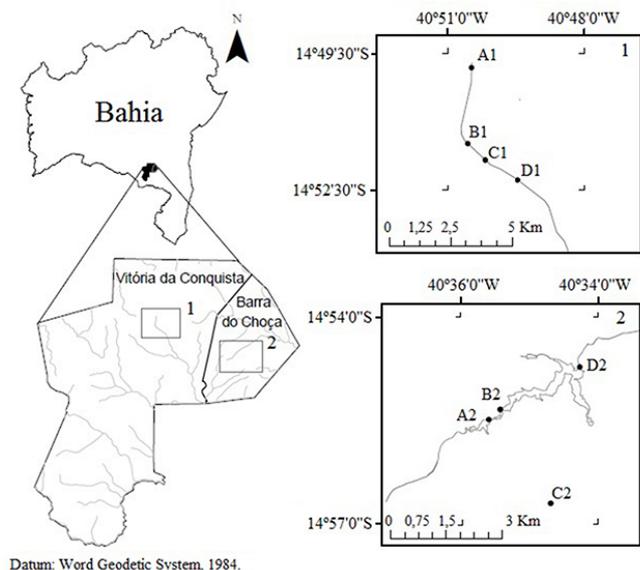
As coletas de água foram realizadas de acordo com as recomendações da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), por meio do guia de coleta e preservação de amostras de água<sup>7</sup>, em triplicata, utilizando frascos estéreis de polietileno com capacidade de 1.000 mL, tendo sido mantidas todas as amostras armazenadas a 4 °C até o momento da análise.

Todas as vidrarias e frascos de polietileno utilizados foram previamente imersos em solução de HNO<sub>3</sub> 10 % (v/v) por 24 h e enxaguados com água deionizada ultrapura.

### Local de estudo

Os pontos de coleta no rio Verruga foram determinados para avaliar os níveis de contaminação por amoxicilina ao longo de seu trajeto pelo município de Vitória da Conquista. O ponto A1 correspondeu ao Poço Escuro, uma reserva florestal e nascente do rio; os pontos

B1 e C1 estavam localizados na zona urbana e o ponto D1 foi referente à estação de tratamento de esgoto (Figura 1).



**Figura 1.** Pontos de coleta nas áreas em estudo: 1 (rio Verruga) e 2 (sistema Água Fria)

Os pontos de coleta referente ao rio Água Fria foram escolhidos para que englobassem os dois reservatórios de água da cidade de Vitória da Conquista (Água Fria I e Água Fria II), de forma que demonstrassem os níveis do fármaco anterior à contribuição citadina. O ponto A2 correspondeu ao reservatório Água Fria I e o B2, ao término do reservatório Água Fria II; o ponto C2 correspondeu ao açude da zona rural e D2, ao reservatório Água Fria II.

A barragem de Água Fria I foi criada em 1970 e ampliada pela primeira vez na década de 80 com a construção da barragem de Água Fria II, na confluência dos rios Monos e Água Fria, responsáveis pelo abastecimento da região de Vitória da Conquista. Por estar localizado em uma área rural, o sistema Água Fria pode sofrer contaminação por agrotóxicos devido à lavoura de café e contaminação por medicamentos de uso veterinário, devido à atividade pecuária<sup>8</sup>.

O rio Verruga nasce em uma área de reserva florestal situada na área urbana de Vitória da Conquista, no sudoeste do estado da Bahia.

O clima é característico das zonas de transição, apresentando médias de temperatura e chuva em torno de 23 °C e 900 mm, respectivamente. A área correspondente do município é de 3743 km<sup>2</sup>, com uma população estimada em 260 mil habitantes. Nas últimas décadas, o município apresentou um aumento populacional o que demanda um planejamento urbano adequado no sentido de evitar uma série de impactos ambientais<sup>9</sup>.

Após a nascente, o trajeto superior do rio Verruga flui para uma área metropolitana. Mesmo com os problemas decorrentes da expansão urbana, a cabeceira do córrego encontra-se protegida por uma floresta de vegetação densa. Contudo, após o percurso canalizado, o córrego começa a receber em vários pontos ao longo do seu leito, despejos de esgoto sanitário e águas pluviais drenados por um sistema de coleta combinado através de galerias e emissários<sup>10</sup>.

## Reagentes e Soluções

Para determinação da amoxicilina por CLAE-UV, utilizou-se padrão de amoxicilina (Vetranal<sup>®</sup>, 99,3 % de pureza), adquirido da empresa Sigma-Aldrich<sup>®</sup> (São Paulo, SP, Brasil). A fase móvel utilizada foi composta de fosfato de potássio monobásico, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Vetec<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil, 99 % de pureza), acetonitrila, CH<sub>3</sub>CN (Merck<sup>®</sup> KGaA, Darmstadt, Alemanha, grau de pureza 99,9 %) e hidróxido de potássio, KOH (Nuclear<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil, 85 % de pureza).

Todas as soluções foram preparadas utilizando água ultrapura, obtida pelo sistema de purificação Millipore<sup>®</sup> (São Paulo, Brasil).

## Preparo das amostras

As amostras coletadas foram filtradas, a vácuo, em membrana de borossilicato 0,47 µm. Após a filtração, 200 mL de cada amostra foram introduzidos em evaporador rotativo (Quimis<sup>®</sup>, Q344M2), a temperatura de 79 °C, para se obter um volume de 10 mL, ou seja, uma pré-concentração de 20 vezes. Posteriormente à pré-concentração, as amostras foram filtradas por filtros de microsseringa e armazenadas em geladeira, entre 2 e 8 °C.

### Preparo das soluções analíticas

Alíquota de 0,1 g do padrão de amoxicilina foi dissolvida em 100 mL de mistura de solventes  $H_2O:CH_3CN$  (1:1 v/v), para obter solução estoque com  $1.000\text{ mg.L}^{-1}$ . Esta solução foi armazenada em frasco de polietileno embalado com papel alumínio para evitar contato com a luz. Posteriormente, foi preparada uma solução intermediária da amoxicilina de concentração  $100\text{ mg.L}^{-1}$  e sob as mesmas condições, o preparo das soluções de trabalho nas concentrações de 5, 10, 20, 40 e  $80\text{ mg.L}^{-1}$ .

### Parâmetros Cromatográficos

O sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizado foi composto de uma bomba série 200, válvula de amostragem, loop de  $20\ \mu\text{L}$  e um detector de ultravioleta de comprimento de onda variável (série 200 UV/VIS, Perkin Elmer®, EUA).

A separação do analito foi realizada utilizando coluna RP-C18 ( $250\text{ mm} \times 4,6\text{ mm}$ ;  $5\ \mu\text{m}$  de tamanho de partícula, Thermo®, EUA). A amostra injetada foi submetida a uma eluição isocrática com água ultrapura, acetonitrila e solução aquosa de fosfato de potássio monobásico a  $136,1\text{ g.L}^{-1}$  na proporção 83:16:1 (v/v/v), fluxo de  $1,2\text{ mL.min}^{-1}$  e detecção a  $242\text{ nm}$ . A fase móvel foi submetida a uma agitação ultrassônica (lavadora ultrassônica, modelo USC-1800) por vinte minutos.

### Validação

A validação de métodos deve garantir, através de dados experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados<sup>11</sup>. Realizou-se a validação com base nos parâmetros de linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão (recuperação), limites de detecção e quantificação e seletividade, seguindo o protocolo proposto pela ANVISA e INMETRO<sup>11-15</sup>.

A linearidade corresponde à capacidade que o método possui em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação<sup>16,17</sup>. A curva de calibração foi

construída utilizando o método de padronização externa com cinco pontos, com concentrações variando de 5 a  $80\text{ mg.L}^{-1}$ . Para cada concentração (5, 10, 20, 40 e  $80\text{ mg.L}^{-1}$ ), foram preparadas três soluções no dia da análise, com injeções em triplicata de cada concentração.

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas<sup>12,16</sup>. Em validação de métodos, o número de determinações é geralmente pequeno e o que se calcula é a estimativa do desvio padrão absoluto (s). A repetibilidade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas do mesmo método, realizadas sob as mesmas condições de medição. A repetibilidade envolve várias medições da mesma amostra, em diferentes preparações<sup>18,19</sup>. Foram feitos ensaios com a matriz em branco fortificada em três concentrações distintas ( $10, 20$  e  $40\text{ mg.L}^{-1}$ ) ( $n=3$ ), sendo que, para cada concentração foram preparadas três soluções.

A precisão intermediária demonstra o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias ou analistas ou diferentes equipamentos ou a combinação destes fatores<sup>14</sup>. A precisão intermediária é estabelecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório e a mais aconselhável de ser adotada. Com amostras em concentrações semelhantes à repetibilidade, as injeções foram em triplicata e os valores foram expressos sob a forma de desvio padrão relativo (% DPR).

A exatidão é um parâmetro o qual faz um comparativo entre os valores obtidos em uma análise com valores ditos como verdadeiros, reais<sup>12,16</sup>. É válido ressaltar que os valores ditos como verdadeiros ou exatos são obtidos através de medições extremamente rigorosas e meticulosas o qual é indeterminado por natureza<sup>20</sup>. A recuperação deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para o composto de interesse<sup>21</sup>. A exatidão do método foi avaliada através do método da recuperação. Para tal, foi utilizado o evaporador rotativo como técnica de pré-concentração.

Os limites de detecção (LD) e quantificação

(LQ) determinam a menor quantidade que um determinado analito pode ser detectado e quantificado. O mesmo pode ser determinado de três formas: visual, sinal-ruído, parâmetros de curva analítica<sup>12,16</sup>. Para a determinação do limite de quantificação foram feitas diluições sucessivas do padrão até se obter uma relação sinal/ruído 10:1. Já o limite de detecção foi obtido quando a relação sinal/ruído se encontrou em 3:1.

A seletividade é o primeiro parâmetro no desenvolvimento de validação de um método instrumental de separação e deve ser revista continuamente durante a validação e posteriormente, durante o uso do método. Algumas amostras como fármacos podem sofrer degradação formando compostos que possam eluir junto com o analito em interesse<sup>13</sup>. A seletividade da metodologia foi obtida através da comparação dos cromatogramas da solução padrão de amoxicilina com as amostras fortificadas e amostras em branco.

As análises estatísticas dos dados foram desempenhadas pelo programa SPSS 16.0 (*Statistical Package for Social Sciences*) da *Microsoft*<sup>®</sup>. Para a avaliação da linearidade da curva analítica foram feitos teste de homocedasticidade e análise dos resíduos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Otimização das fases móveis

Inicialmente, a primeira fase móvel utilizada foi aquela proposta pela Farmacopéia Brasileira, 5ª edição<sup>22</sup>, que consistiu em uma solução aquosa de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $6,8 \text{ g.L}^{-1}$ ), ajustado o pH em  $5,0 \pm 0,1$  com hidróxido de potássio 45 %, adicionada posteriormente de acetonitrila na proporção  $\text{KH}_2\text{PO}_4:\text{CH}_3\text{CN}$  (96:4 v/v). Posteriormente, foi testada uma segunda fase móvel, composta por água ultrapura, solução aquosa de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $136,1 \text{ g.L}^{-1}$ ) e acetonitrila na proporção 91:1:8 (v/v/v).

Com a primeira fase móvel, os resultados de medições sucessivas não apresentavam concordâncias e nem sempre foram obtidos sinais de resposta; todavia, quando o analito foi detectado, o tempo de retenção equivalia a 6,2 min. Com a segunda fase móvel, observou-se

sinais de resposta em todos os ensaios; entretanto não possuíam repetibilidade, ou seja, as áreas dos picos de resposta para uma mesma concentração superavam um desvio padrão relativo de 20 %. Contudo, notou-se uma redução do tempo de retenção, diminuído a 4,2 minutos.

A fase móvel otimizada foi composta por água ultrapura, solução aquosa de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $136,1 \text{ g.L}^{-1}$ ) e acetonitrila na proporção  $\text{H}_2\text{O}:\text{KH}_2\text{PO}_4:\text{CH}_3\text{CN}$  (83:1:16 v/v/v). O tempo de retenção obtido foi de 2,4 min. Para se confirmar que as áreas dos picos não iriam sofrer alterações ao aumentar a concentração da acetonitrila, foi realizado teste da fase móvel com acetonitrila em 20 %, notou-se que as áreas correspondiam as mesmas ao utilizar 16 %, com pequenas variações no tempo de retenção, porém por uma questão de economia de solvente, optou-se pelo uso do eluente na concentração de 16 %.

### Linearidade

O coeficiente de correlação e a equação da reta podem ser observados na Figura 2a. Demonstra-se uma forte correlação, com aumento das áreas dos picos de resposta à medida que aumenta a concentração do analito<sup>13</sup>. Para verificar a não ocorrência de tendência, procedeu-se à análise de resíduos, sendo que o gráfico de dispersão dos resíduos em função dos valores preditos mostrou-se aleatório (Figura 2b).

Para garantir a avaliação da linearidade da curva foi feito um teste de homocedasticidade pelo teste de Cochran ( $k = 5$ ;  $n = 3$ ;  $\alpha = 0,05$ ), com o propósito de verificar a homogeneidade da variância<sup>14,23,24</sup>. O comportamento das variáveis foi homocedástico (Tabela 1).

### Precisão

#### *Repetibilidade (precisão intra-dia)*

Expressaram-se os resultados na forma de desvio padrão relativo (% DPR), sendo 7,25; 4,78 e 8,97 % para as concentrações de 10, 20 e 40  $\text{mg.L}^{-1}$ , respectivamente. Indica-se uma precisão aceitável para a validação quando inferior a 20 %<sup>25</sup>.

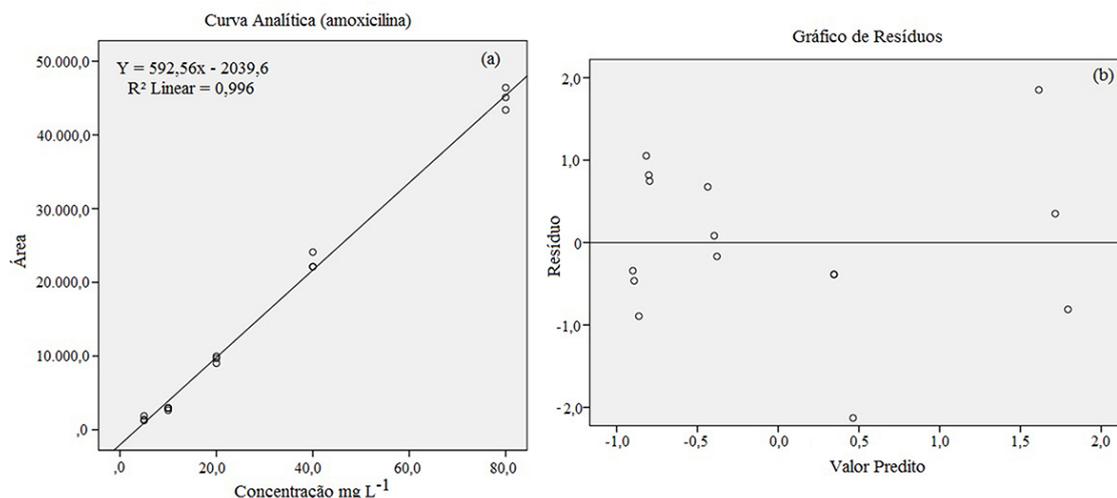


Figura 2. Modelo referente à curva analítica com 5 níveis em triplicata (a) e o gráfico de resíduos (b)

Tabela 1. Avaliação da linearidade (Teste de Cochran)

Concentração mg.L <sup>-1</sup>	Resposta		Cálculos	
	Replicata	Área	Média	Variância
5	1	1245,300	1500,123	107898,521
	2	1384,230		
	3	1870,840		
10	1	2638,800	2842,933	32970,916
	2	2903,550		
	3	2986,450		
20	1	9017,540	9560,623	241321,797
	2	9690,330		
	3	9974,000		
40	1	22124,050	22782,563	1300544,114
	2	22124,240		
	3	24099,400		
80	1	43387,650	44962,197	2293375,817
	2	45090,700		
	3	46408,240		
<b>Avaliação</b>				
Variância	Maior	2293375,817	<b>Resultado</b>	
	Somatório	3976111,166		
C de Cochran	Calculado	0,577	Homocedástico	
	Tabelado	0,684		

### Precisão intermediária (precisão inter-dias)

O teste para tal parâmetro foi realizado com uma semana de intervalo. A precisão intermediária para as concentrações de 10, 20 e 40 mg.L<sup>-1</sup> foi de 8,88; 5,13 e 7,76 %, respectivamente. Para ter validade o desvio padrão relativo não deve ultrapassar 20 %<sup>25</sup>.

### Exatidão (Recuperação)

A recuperação obtida apresentou-se na faixa aceitável para validação de métodos (91,74; 103,95 e 94,57 % para as concentrações de 10, 20 e 40 mg.L<sup>-1</sup> respectivamente), que para análise de resíduos compreende entre 70 e 120 %<sup>10</sup>. A boa recuperação dos analitos indica que não ocorreram degradações significativas da amoxicilina, na rotaevaporação das amostras

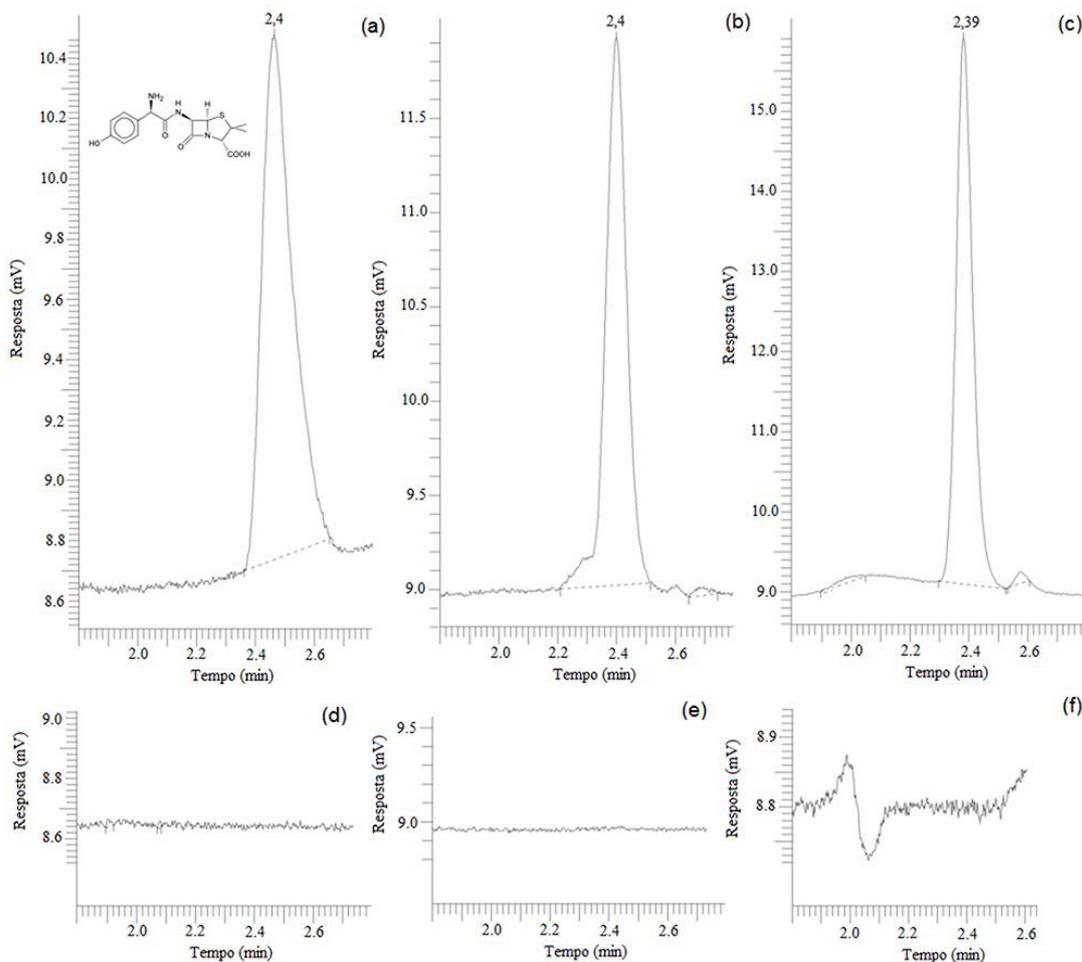
a temperatura de 79 °C durante o processo de extração.

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

Esses parâmetros demonstraram-se satisfatórios, uma vez que foi obtido valores baixos para ambos. Assim, LQ= 2,7 mg.L<sup>-1</sup> e LD= 0,7 mg.L<sup>-1</sup>.

### Seletividade

O método foi seletivo, visto que não existem compostos próximo ao tempo de retenção do analito (Figura 3). Para garantir que o sinal de resposta não sofreria sobreposição, realizaram ensaios com a corrida cromatográfica de 20 minutos, a qual não foi constatada interferentes.



**Figura 3.** Cromatogramas: (a) Solução-padrão de amoxicilina a 40 mg.L<sup>-1</sup>; (b) Amostra fortificada a 40 mg.L<sup>-1</sup>; (c) Amostra da estação de tratamento do rio Verruga pré-concentrada 20 vezes; (d) Água ultrapura e acetoneitrila 1:1 (v/v); (e) Água ultrapura; (f) Amostra do reservatório Água Fria I pré-concentrada 20 vezes

### Aplicação

Pode-se observar que as maiores concentrações de amoxicilina, na faixa de 11,24 mg.L<sup>-1</sup> a 16,55 mg.L<sup>-1</sup> se encontram nos pontos da zona urbana (Tabela 2), estes valores podem ser atribuídos devido principalmente a proximidade desse trecho a uma unidade hospitalar, como também por esta área ser um local de lançamento direto de esgoto bruto da cidade.

Por outro lado, nas águas coletadas no ponto A1, área de reserva ambiental e nascente do rio Verruga, foram encontrados teores de amoxicilina superiores aos detectados nas amostras oriundas do trecho do rio próximo a estação de tratamento de esgoto, ponto D1 (Tabela 2). Tal fato pode ser explicado em virtude de possíveis descartes ilegais de medicamentos na área localizada à montante do recurso hídrico. Ou então, devido à visitação frequente de pessoas no local para recreação. O descarte indevido de fármacos no lixo doméstico e/ou o lançamento na rede de esgoto, podem provocar a contaminação dos solos, bem como, das águas superficiais e subterrâneas. Tal comportamento pode se constituir em um importante fator gerador de impactos da saúde das populações e provocar danos ao meio ambiente<sup>26</sup>. Ao contrário do que se esperava, observou-se que o efluente da

estação de tratamento de esgoto (ETE), não impactou as águas do rio Verruga com relação aos níveis de amoxicilina. As amostras de água coletadas próximo ao local de despejo do efluente da ETE, ponto D1, apresentaram os níveis mais baixos de amoxicilina. Isso ocorreu provavelmente devido ao grande número de tributários localizados à montante ao ponto de coleta, os quais provocam uma elevada vazão das águas do rio, refletindo-se assim na diluição dos teores de amoxicilina.

No sistema Água Fria, por se tratar de um recurso hídrico localizado em zona rural, esperava-se níveis de amoxicilina inferiores. Contudo, o fato da amoxicilina ser um medicamento de uso humano e veterinário, atribui-se os níveis desse analito ao uso veterinário, devido ao manejo de animais na área.

A literatura especializada apresenta níveis de amoxicilina em estações de tratamento de água na Alemanha com concentrações de 28 a 82,7 µg.L<sup>-1</sup>, Itália na ordem de 120 µg.L<sup>-1</sup> e nos EUA em água de rio com concentração de 10 ng.L<sup>-1</sup> <sup>27-29</sup>. Desta forma, percebe-se que os níveis de fármacos no ambiente aquático de Vitória da Conquista, embora elevados nos pontos de aporte, tende a se esvaecer à medida que se distancia do local de fonte poluidora.

**Tabela 2.** Concentrações médias de amoxicilina (em mg.L<sup>-1</sup> ± desvio padrão) das amostras de água

Local de Estudo			
Rio Água Fria		Rio Verruga	
Pontos	Concentrações	Pontos	Concentrações
A2 (Reservatório I)	< LD	A1 (Nascente)	3,70 ± 0,15
B2 (Término do Reservatório II)	1,10 ± 0,08	B1 (Zona Urbana)	16,55 ± 2,10
C2 (Zona Rural)	< LD	C1 (Zona Urbana)	11,24 ± 1,40
D2 (Reservatório II)	< LD	D1 (Estação de Tratamento)	1,50 ± 0,30

## CONCLUSÃO

O método otimizado para avaliação de amoxicilina em água mostrou-se eficiente. Apresentou baixos valores dos limites de quantificação e detecção, precisão e exatidão satisfatórias, constituindo-se em uma importante ferramenta na avaliação de teores de amoxicilina nos recursos hídricos.

Os resultados mostraram que as concentrações mais elevadas de amoxicilina foram detectadas nas águas que sofrem influência das atividades urbanas. O trecho urbano do rio Verruga apresenta as maiores concentrações, que tendem a diminuir à medida que se distancia dos deflúvios da cidade.

## REFERÊNCIAS

1. Brasil. Decreto-lei nº 5991, de 17 de dezembro de 1973. Dispõe sobre o controle sanitário do comércio de drogas, medicamentos, insumos farmacêuticos e correlatos, e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 17 dez. 1973. [acesso 2013 Jun 22]. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\_03/leis/L5991.htm].
2. Harvey RA, Champe PC. Farmacologia ilustrada. 2ª ed. Porto Alegre (RS): Artmed; 1988.
3. Crestana GB, Silva JH. Fármacos residuais: panorama de um cenário negligenciado. *Rev Int Direito Cidadania*. 2011;9(2):55-65.
4. Bila DM, Dezotti M. Fármacos no meio ambiente. *Quim Nova*. 2003;26(4):523-30. [DOI: 10.1590/S0100-40422003000400015].
5. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais – RENAME. Elenco de medicamentos e insumos da RENAME 2014. [acesso 2013 Agosto 12]. Disponível em: [http://www.saude.sp.gov.br/resources/ses/perfil/gestor/assistencia-farmacutica/renome\_2014.pdf].
6. Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR. Fundamentos de química analítica. 8ªed. São Paulo (SP): Cengage Learning; 2011.
7. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo – CETESB. Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos. [acesso 2013 Mar 17]. Disponível em: [http://www.clean.com.br/downloads/Guia\_Nacional\_de\_Coleta\_e\_Preservacao\_de\_Amostras\_.pdf].
8. Alexandrino DM. Avaliação sazonal de metais (Ca, Mg, Na e K) e metais traços (Cu, Zn, Cd e Pb) sob influência de atividades agrícolas na bacia de drenagem do reservatório Água Fria, Barra do Choça – BA [dissertação de mestrado]. Vitória da Conquista (BA): Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia; 2008.
9. Santos JS, Oliveira E, Massaro S. Avaliação da salinização de açudes no semiárido brasileiro por ICP-AES. *Quim. Nova*. 2000;23(4):453-6. [DOI: 10.1590/S0100-404220000400004].
10. Santos MLP, Santos JS, Santos JR, Oliveira LB. Efeitos dos escoamentos urbanos e rurais na qualidade das águas do córrego verruga em Vitória da Conquista - Bahia, Brasil. *Quim Nova*. 2008;31(8):1997-2003. [DOI: 10.1590/S0100-40422008000800016].
11. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 02 de julho de 2003. [acesso 2013 Mar 28]. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE\_899\_2003\_De+termina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9to+dos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES].
12. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial - INMETRO. Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos - DOQ-CGCRE-008. [acesso 2013 Mar 28]. Disponível em: [http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8\_02.pdf].
13. Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSE, Melo LFC. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim Nova*. 2004;27(5):771-80. [DOI: 10.1590/S0100-40422004000500017].

14. Ribeiro FAL, Ferreira MMC, Morano SC, Silva LR, Schneider RP. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. *Quim Nova*. 2008;31(1):164-71. [DOI: 10.1590/S0100-40422008000100029].
15. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA. Manual de garantia da qualidade analítica. Secretaria de Defesa Agropecuária. [acesso 2013 Out 15]. Disponível em: [[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/Manual\\_Garantia\\_Analitica.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Manual_Garantia_Analitica.pdf)]
16. International Conference on Harmonisation – ICH. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). [acesso 2013 Jun 13]. Disponível em: [[http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf)]
17. Swartz ME, Krull IS. Validação de métodos cromatográficos. *Pharm Technol*. 1998;2(3):12-20.
18. Green JM. A practical guide to analytical method validation. *Anal Chem News Features*. 1996;68(9):305A-9A.
19. Shabir GA. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: understanding the differences and similarities between validation. *J Chromatogr A*. 2003;987(1-2):57-66. [DOI: 10.1016/S0021-9673(02)01536-4].
20. Salmon JE. Ion-Exchange in analytical chemistry: problems and prospects. *Pure Appl Chem*. 1971; 25(4):797-809.
21. Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas – GARP. Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos (apostila). São Paulo: GARP, 1999.
22. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Farmacopéia Brasileira, 5ª edição. [acesso 2013 jun 13]. Disponível em: [[http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd\\_farmacopeia/pdf/volume1%2020110216.pdf](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/volume1%2020110216.pdf)]
23. Cardoso MHWM, Gouvêa AV, Nóbrega AW, Abrantes SMP. Validação de método para determinação de resíduos de agrotóxicos em tomate: uma experiência laboratorial. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2010;30(Supl.1):63-72.
24. Pimentel MF, Neto BB. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. *Quim Nova*. 1996;19(3):268-77.
25. Berg RG, Murta ALM, Kugler W. O método das adições padrão aplicado à análise cromatográfica quantitativa de fenóis em águas residuais. *Quim Nova*. 1988;11(2):288-91.
26. Pinto GMF, Silva KR, Pereira RFAB, Sampaio SI. Estudo do descarte residencial de medicamentos vencidos na região de Paulínia (SP), Brasil. *Eng Sanit Ambient*. 2014;19(3): 219-24. [DOI: 10.1590/S1413-41522014019000000472].
27. Andreozzi R, Caprio V, Ciniglia C, de Champdoré M, Lo Giudice R, Marotta R, et al. Antibiotics in the Environment: Occurrence in Italian STPs, Fate, and Preliminary Assessment on Algal Toxicity of Amoxicillin. *Environ Sci Technol*. 2004;38(24):6832-38. [DOI: 10.1021/es049509a].
28. Cha JM, Yang S, Carlson KH. Trace determination of beta-lactam antibiotics in surface water and urban wastewater using liquid chromatography combined with electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2006;1115(1-2):46-57. [DOI: 10.1016/j.chroma.2006.02.086].
29. Christian T, Schneider RJ, Färber HA, Skutlarek D, Meyer MT, Goldbach HE. Determination of antibiotic residues in manure, soil, and surface waters. *Acta Hydrochim Hydrobiol*. 2003;31(1):36-44. [DOI: 10.1002/ahch.200390014].

# Avaliação da técnica PCR *multiplex* para detecção de fraude por adição de carne bubalina em carne moída bovina

## Evaluation of a multiplex PCR for detection of a fraud in the minced beef meat by adding buffalo meat

RIALA6/1671

Andrey Carlos do Sacramento de OLIVEIRA<sup>1</sup>, Bárbara Cristina Amorim FERREIRA<sup>1</sup>, Gabrielle Virgínia Ferreira CARDOSO<sup>1</sup>, Cleyzer Lopes SILVA<sup>1</sup>, Andréia Silva da SILVA<sup>1</sup>, Flávio da SILVA<sup>1</sup>, Rafael Monteiro de MELO<sup>1</sup>, Diogo José CARDILLI<sup>2</sup>, Fábio Pereira Leivas LEITE<sup>3</sup>, Talita Bandeira ROOS<sup>1</sup>, Carina Martins de MORAES<sup>1\*</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Laboratório de Higiene e Qualidade de Alimentos e Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Programa de Pós-graduação em Saúde Animal na Amazônia, Universidade Federal do Pará (UFPA), Campus Castanhal. Instituto de Medicina Veterinária da UFPA, Campus Castanhal. BR 316, Km 62, Bairro Saudade, Castanhal, PA. CEP: 68740-970. Tel: 91 3711-4723. E-mail: carinamoraes@ufpa.br

<sup>2</sup>Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Vigilância Agropecuária Internacional – VIGIAGRO, Aeroporto Val-de Cans, Belém, Pará

<sup>3</sup>Laboratório de Bacteriologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CD Tec, Faculdade de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

Recebido: 22.04.2015 - Aceito para publicação: 22.10.2015

### RESUMO

O presente trabalho avaliou a sensibilidade de uma modalidade de técnica de PCR *multiplex* para efetuar a detecção de fraude por adição intencional de carne moída bubalina em carne moída bovina. Neste contexto, as amostras de carnes moídas de bovinos com adição de 0,01 %, 0,1 %, 1,0 %, 5,0 %, 10,0 %, 25,0 %, 50,0 %, 75,0 %, 90,0 %, 95,0 %, 99,0 %, 99,9 %, 99,99 % de carne moída bubalina foram produzidas em triplicata com cinco réplicas. As carnes moídas exclusivamente de cada uma das espécies foram utilizadas como amostras controle. Cada uma das amostras produzidas foi analisada por meio de Reação em Cadeia da Polimerase *multiplex*. A fim de realizar a análise da sensibilidade do teste, percentagens conhecidas de amostras de DNA (0,01 %, 0,1 %, 1,0 %, 5,0 %, 10,0 %, 25,0 %, 50,0 %, 75,0 %, 90,0 %, 95,0 %, 99,0 %, 99,9 %, 99,99 %) das espécies *Bos taurus* e *Bubalus bubalis* foram diluídas e misturadas em um volume final de 10 µL; e estas foram também analisadas pela metodologia de PCR proposta. A técnica de PCR *multiplex* mostrou ser eficaz e de alta sensibilidade, capaz de detectar incrementos de 10,0 % (2,05 ng) de DNA bubalino e de 0,1 % (0,041 ng) de DNA bovino.

**Palavras-chave.** identificação de espécies, autenticidade de alimentos, adulteração.

### ABSTRACT

This study aimed at evaluating the sensitivity of a multiplex PCR technique for detecting fraud by the deliberate addition of buffalo meat into the minced bovine beef. The minced bovine beef containing 0.01 %, 0.1 %, 1.0 %, 5.0 %, 10.0 %, 25.0 %, 50.0 %, 75.0 %, 90.0 %, 95.0 %, 99 %, 99.9 %, 99.99 % of minced buffalo beef were produced in triplicate, with five replicates. The minced meats exclusively of each animal species were used as control samples. Every prepared sample was analyzed by means of multiplex polymerase chain reaction. For performing the assay sensitivity analysis, the known concentrations of DNA samples (0.01 %, 0.1 %, 1.0 %, 5.0 %, 10.0 %, 25.0 %, 50.0 %, 75.0 %, 90.0 %, 95.0 %, 99.0 %, 99.9 %, 99.99 %) from *Bos taurus* and *Bubalus bubalis* species were diluted and mixed into a final volume of 10 µL; and these DNA samples were also assayed by the proposed PCR methodology. The multiplex PCR showed to be is an effective and highly sensitive technique enough for detecting increments of 10 % (2.05 ng) of bubaline DNA and of 0.1 % (0.041 ng) of bovine DNA.

**Keywords.** species identification, food authenticity, adulteration.

## INTRODUÇÃO

De acordo com a Instrução Normativa (IN) nº 83 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), de 21 de novembro de 2003, entende-se por carne moída o produto cárneo obtido a partir da moagem de massas musculares de carcaças de bovinos, seguido de resfriamento ou congelamento. A referida IN acrescenta que esse regulamento aplica-se também ao produto obtido a partir da carne de búfalos, porém o critério de Designação (Denominação de Venda) do referido alimento determina que este deva ser designado de “Carne Moída”, seguido de expressões ou denominações que o caracterizem de acordo com sua temperatura e do nome da espécie da qual foi obtida<sup>1</sup>.

Com o objetivo de atingir públicos de todas as camadas sociais, a indústria de carne tem produzido alimentos com características diversificadas<sup>2</sup>. A carne moída é um alimento que se destaca entre os demais produtos cárneos especialmente por sua elevada aceitação pelo consumidor, ligada a sua praticidade e preços acessíveis<sup>3,4</sup>. No entanto, com a elevação dos custos dos cortes cárneos utilizados na produção de carne moída bovina, tem-se relatado que algumas indústrias, com o objetivo de tornar a produção menos onerosa, têm incorporado fraudulentamente tecidos inferiores ou matérias-primas cárneas de baixo valor comercial. Neste contexto, a carne bubalina vem sendo introduzida no mercado como carne bovina, visto que apesar de possuir um elevado valor nutricional, em alguns lugares pode vir a custar até 20 % menos que a carne bovina<sup>5</sup>, devido principalmente à baixa aceitação do consumidor ligada à ausência de informações que estimulem um nicho de mercado para o seu consumo, realidade que países como a Itália e Austrália já vivenciaram e superaram com a implementação de campanhas publicitárias a respeito da carne bubalina<sup>6</sup>. Portanto, em virtude de ser amplamente consumida, torna-se fundamental levantar as questões referentes a possíveis fraudes na comercialização de tais produtos<sup>2</sup>.

Segundo o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), entende-se por fraude a alteração ou modificação total ou parcial de um ou mais elementos normais do produto, quando as operações de manipulação e elaboração forem executadas com a intenção deliberada de estabelecer falsa impressão aos produtos fabricados, quando há supressão de um ou mais elementos e substituição por outros, ou ainda, quando há especificação total ou parcial na rotulagem de um determinado produto que não seja o contido na embalagem ou recipiente<sup>7</sup>. As ações fraudulentas privam o consumidor do direito de conhecer efetivamente o que está consumindo, podendo gerar problemas de saúde ligados ao desenvolvimento de processos alérgicos ou de intolerância, econômicos ou de cunho religioso<sup>8</sup>.

Alguns pesquisadores relatam que a prática de fraude em produtos miscigenados é mais frequente entre alimentos que apresentam características organolépticas semelhantes, destacando a carne bovina e bubalina nessa questão<sup>9</sup>. Segundo os dados recentes do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística<sup>10</sup>, o Brasil apresentava em 2012 um efetivo de rebanho bubalino de 1.261.922 cabeças, onde a região Norte representa o maior percentual de rebanho de bubalinos do país, sendo que o estado do Pará detém 36 % e o estado do Amapá 20,1 % de todo o plantel nacional. No entanto, a cadeia produtiva do búfalo não se encontra organizada no país, apresentando uma ausência de estratégias de coordenação. Apesar de percorrer diferentes níveis, esses não encontram-se integrados na referida cadeia produtiva, o que gera fragilidade no seguimento, aumentando a probabilidade de práticas fraudulentas<sup>5</sup>.

Faz-se necessário ressaltar o agravante dos abates clandestinos que distorcem os dados reais do consumo da carne bovina e bubalina e estes, por não serem supervisionados, ocorrem geralmente em locais não apropriados e em condições higiênicas precárias, chegando a ser responsáveis, em alguns estados do país, por 41 % da carne fornecida à população<sup>11</sup>. Por toda essa problemática, a avaliação de autenticidade das carnes

tornou-se um elemento relevante em procedimentos de controle de qualidade dos alimentos<sup>12</sup>.

Estudos descreveram diferentes métodos aplicados à análise de adulterações em produtos de origem animal em que diversas formas da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foram apontadas como viáveis para a detecção de fraude em produtos lácteos, tais como a PCR tradicional, PCR *multiplex* e a *Real Time* PCR<sup>9</sup>. Embora a referida técnica venha sendo descrita para utilização em amostras de leite e seus derivados, poucos estudos nacionais tem demonstrado sua eficiência para análise de produtos cárneos, como a carne moída.

Por esta razão, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a sensibilidade de uma Reação em Cadeia da Polimerase *multiplex* para detecção de fraude por adição de carne bubalina à carne moída bovina, através da produção de carne moída experimentalmente fraudada contendo diferentes percentagens de carne moída bubalina.

## MATERIAL E MÉTODOS

Carnes moídas bovinas fraudadas experimentalmente foram fabricadas em triplicata no Laboratório de Higiene e Qualidade de Alimentos da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Pará – Campus Castanhal, através do incremento de 0,01 %, 0,1 %, 1 %, 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 90 %, 95 %, 99 %, 99,9 %, 99,99 % de carne bubalina e carnes moídas exclusivamente de cada uma das espécies foram produzidas para serem usadas como grupo controle da variável em análise. As amostras foram preparadas para uma massa total de 10 g, sendo a sequência da moagem iniciada nas amostras com menor concentração de carne de búfalo. Após o preparo de todos os percentuais de fraude, cinco réplicas de cada grupo foram isoladas, perfazendo um total de 225 amostras.

O DNA das amostras foi extraído através do *kit Wizard Genomic DNA Purification* (Promega®) de acordo com as instruções do fabricante, com modificações na etapa de lise inicial, relacionadas com a adição de 20 mg

de Proteinase K e incubação *overnight* em banho-maria, a 65 °C. As amostras de DNA foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 1 %, corrida em tampão TBE a 0,5 % e em seguida o gel foi imerso em brometo de etídeo na concentração de 5 µg/mL, durante 30 minutos. A análise dos resultados da eletroforese foi realizada com o auxílio de um equipamento de foto documentação sobre luz ultravioleta associado ao *Software Total Lab*® TL 100v. 2006.

A fim de auxiliar a análise da sensibilidade do teste, concentrações conhecidas de DNA (0,01 %, 0,1 %, 1 %, 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 90 %, 95 %, 99 %, 99,9 %, 99,99 %) das espécies (bovino e bubalino) foram diluídas previamente em tampão Tris-EDTA (TE) e misturadas em um volume final de 10 µL para serem utilizadas posteriormente como amostras controle durante a realização da PCR *multiplex* proposta.

Para a quantificação do DNA, utilizou-se o espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 UV-Vis e com o objetivo de se verificar a pureza das amostras, medição da absorbância a 280 nm foi realizada, correspondendo ao pico de absorção de raios ultra-violetas (UVs) de proteínas, e a 230 nm, que corresponde ao pico de absorção de UVs de contaminantes orgânicos.

Para a realização das reações de PCR *multiplex* foram utilizados iniciadores que amplificam sequências específicas para a espécie bubalina (*Primer reverse* 5' TTCATAATAACTTTCGTGTTGTTGGGTGT 3'), para a espécie bovina (*Primer reverse* 5' AAATAGGGTTAGATGCACTGAATCCAT 3') e que amplificam sequências comuns as duas espécies (*Primer forward* 5' CTAGAGGAGCCTGTTCTATAATCGATA 3'), descritos previamente por López-Calleja et al<sup>13</sup>, que amplificam sequências de 220 pares de base (pb) para DNA bubalino e de 346 pb para bovinos. Os iniciadores foram preparados de acordo com a instrução do fabricante (Ludwing Biotec®), sendo diluídos em tampão TE pH 8,0, até a concentração de 100 pmol/µL.

A metodologia da PCR *multiplex* proposta foi realizada de acordo com o descrito anteriormente por Darwish et al<sup>14</sup> com modificações, sendo a solução para PCR calculada para um volume

final de 25  $\mu$ L para cada reação. Para tal, foram utilizados 50 mM de KCl e 10 mM Tris-HCl (tampão 1X), 10 mM dNTP *mix*, aproximadamente 8,2 ng de DNA molde, 1U Taq DNA Polimerase e 10 pmol de cada iniciador, sendo o volume completado com água ultra pura esterilizada. O termociclador foi programado para 30 ciclos, onde as temperaturas e os tempos utilizados para desnaturação, anelamento e extensão foram, respectivamente, 93 °C/30 s, 56 °C/30 s e 72 °C/30 s, acrescidos de desnaturação inicial a uma temperatura de 93 °C/3 min e extensão final a 72 °C/10 min.

Os *amplicons* obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,0 %, corrida em tampão TBE a 0,5 %, sendo em seguida imerso no brometo de etídeo na concentração de 5  $\mu$ g/mL, durante 30 minutos. A análise dos resultados foi realizada com o auxílio de um equipamento de foto documentação sobre luz ultravioleta associado ao *Software Total Lab*® TL 100v. 2006.

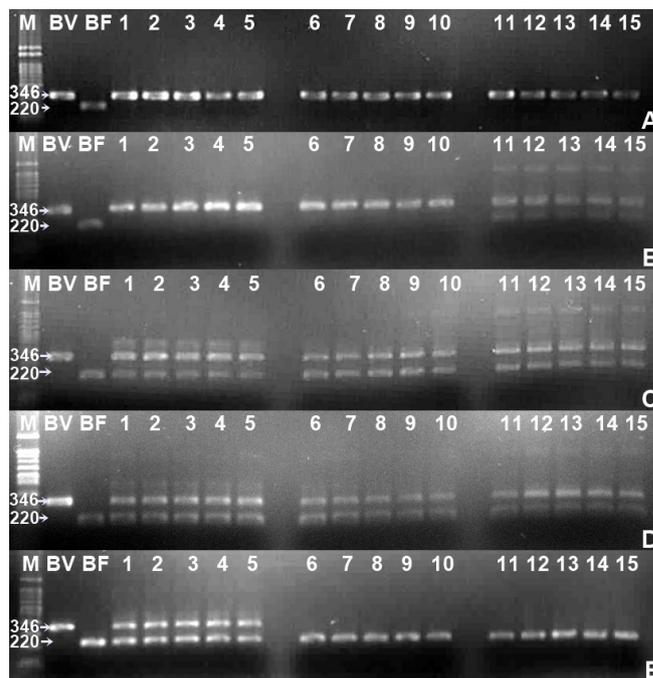
## RESULTADOS

Os resultados observados demonstraram que DNA foi obtido por meio da técnica proposta com qualidade e concentrações suficientes para a execução da PCR. A pureza e o rendimento do DNA total extraído foram verificados a partir da medição da absorbância a 230 nm, 260 nm e 280 nm, que indicaram valores com parâmetros de pureza e concentração média de DNA das amostras de 4,1 ng/ $\mu$ L.

A Figura 1 demonstra os resultados obtidos a partir da PCR *multiplex* realizada nos 15 grupos de carne moída experimentalmente fraudadas.

A Figura 2 demonstra os resultados obtidos a partir da PCR *multiplex* realizada nas diferentes diluições de DNA bovino e bubalino.

Os resultados demonstraram que a PCR *multiplex* proposta mostrou-se eficaz para a detecção simultânea de DNA de bovinos e bubalinos, com um limiar de 2,05 ng de DNA bubalino e 0,041 ng de DNA bovino, sendo capaz de identificar incrementos de 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 90 %, 95 %, 99 %, 99,9 %, 99,99 % e 100 % de carne bubalina em carnes moídas bovinas e



**Figura 1.** Gel de agarose 1,0 % demonstrando a presença de fragmentos de DNA bovino (346 pb) e bubalino (220 pb) obtidos através de PCR *multiplex* realizada a partir de amostras de carne moída experimentalmente fraudadas com diferentes percentagens de carne moída bubalina e suas replicatas.

Para todas as corridas, M - marcador molecular 1 kb; BV - controle bovino (346 pb) e BF - controle bubalino (220 pb); Em A: canaletas 1 a 5 - carne moída 100 % bovina; canaletas 6 a 10 - carne experimentalmente fraudada contendo 0,01 % de carne moída bubalina; canaletas 11 a 15 - carne experimentalmente fraudada contendo 0,1 % de carne moída bubalina;

Em B: canaletas 1 a 5 - carne experimentalmente fraudada contendo 1 % de carne moída bubalina; canaletas 6 a 10 - carne experimentalmente fraudada contendo 5 % de carne moída bubalina; canaletas 11 a 15 - carne experimentalmente fraudada contendo 10 % de carne moída bubalina;

Em C: canaletas 1 a 5 - carne experimentalmente fraudada contendo 25 % de carne moída bubalina; canaletas 6 a 10 - carne experimentalmente fraudada contendo 50 % de carne moída bubalina; canaletas 11 a 15 - carne experimentalmente fraudada contendo 75 % de carne moída bubalina;

Em D: canaletas 1 a 5 - carne experimentalmente fraudada contendo 90 % de carne moída bubalina; canaletas 6 a 10 - carne experimentalmente fraudada contendo 95 % de carne moída bubalina; canaletas 11 a 15 - carne experimentalmente fraudada contendo 99 % de carne moída bubalina;

Em E: canaletas 1 a 5 - carne experimentalmente fraudada contendo 99,9 % de carne moída bubalina; canaletas 6 a 10 - carne experimentalmente fraudada contendo 99,99 % de carne moída bubalina e canaletas 11 a 15 - carne moída 100 % bubalina.



**Figura 2.** Gel de agarose 1,0 % demonstrando a presença de fragmentos de DNA bovino (346 pb) e bubalino (220 pb) obtidos através de PCR *multiplex* realizada a partir das diferentes diluições de DNA bovino e bubalino, onde: M - marcador molecular 1 kb; BV - controle bovino (346 pb); BF - controle bubalino (220 pb); canaleta 1 - DNA 100 % bovino; canaleta 2 - diluição de DNA contendo 0,01 % de DNA bubalino; canaleta 3 - diluição de DNA contendo 0,1 % de DNA bubalino; canaleta 4 - diluição de DNA contendo 1 % de DNA bubalino; canaleta 5 - diluição de DNA contendo 5 % de DNA bubalino; canaleta 6 - diluição de DNA contendo 10 % de DNA bubalino; canaleta 7 - diluição de DNA contendo 25 % de DNA bubalino; canaleta 8 - diluição de DNA contendo 50 % de DNA bubalino; canaleta 9 - diluição de DNA contendo 75 % de DNA bubalino; canaleta 10 - diluição de DNA contendo 90 % de DNA bubalino; canaleta 11 - diluição de DNA contendo 95 % de DNA bubalino; canaleta 12 - diluição de DNA contendo 99 % de DNA bubalino; canaleta 13 - diluição de DNA contendo 99,9 % de DNA bubalino; canaleta 14 - diluição de DNA contendo 99,99 % de DNA bubalino e canaleta 15 - DNA 100 % bubalino.

incrementos de 0,1 %, 1 %, 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 90 %, 95 %, 99 %, 99,9 %, 99,99 % e 100 % de carne bovina em carnes moídas bubalinas.

## DISCUSSÃO

Diversos pesquisadores, de diversas partes do mundo, nos últimos anos vêm trabalhando em uma linha similar de pesquisa relacionada com fraude em alimentos, envolvendo carne de diversas espécies de animais, alguns detectando fraude por adição ou substituição de carnes de ruminantes<sup>15,16</sup>, de aves domésticas<sup>17,18</sup>, de suínos<sup>15,18</sup>, dentre outras<sup>19,20</sup>.

Vários estudos internacionais têm demonstrado a eficiência da utilização da técnica de PCR *multiplex* em identificar espécies diferentes em uma mesma reação, com metodologias e resultados similares aos obtidos na presente pesquisa. Alguns pesquisadores utilizaram iniciadores para detecção de fraude por adição e os resultados obtidos mostraram-se altamente específicos visto que, de 39 amostras analisadas (15 carnes cruas congeladas, 12 alimentos instantâneos congelados e 12 alimentos prontos para consumo comercializados por ambulantes) foi possível a detecção de fraude por adição de carne de frango (*Gallus gallus*) em carne de suíno (*Sus scrofa*) em

16,7 % dos alimentos instantâneos congelados e detecção de fraude por adição de carne de frango (*Gallus gallus*) e de ovino/caprino (*Ovis aries*) em carne de suíno (*Sus scrofa*) em 33,3 % das “comidas de rua” analisadas através da metodologia proposta por Kitpipit et al<sup>21</sup>.

O mesmo grupo incrementou a pesquisa citada acima com a identificação de mais três espécies além das propostas anteriormente, sendo estas carne de avestruz (*Struthio camelus*), equina (*Equus ferus caballus*) e bovina (*Bos indicus*), e a reação *multiplex* proposta foi capaz de identificar as seis espécies, sendo detectado em um total de 125 amostras de carne coletadas, 5 % de fraude por substituição de carne de avestruz (*Struthio camelus*) por carne de suíno (*Sus scrofa*) em carnes cruas congeladas e 64,7 % de fraude por substituição de carne de suíno (*Sus scrofa*) por carne de frango (*Gallus gallus*) em cortes frios analisados. O mesmo tipo de fraude envolvendo as duas espécies acima citadas foi detectada em carnes cruas congeladas (7,7 %) e em “comidas de rua” (33,3 %)<sup>22</sup>.

Da mesma forma, foi testada a técnica de PCR quanto à sua sensibilidade para detectar a carne bovina misturada com a carne bubalina, suína, caprina e de frango. Os resultados evidenciaram que a PCR foi capaz de identificar a espécie alvo a um nível inferior a 1 % de

incorporação<sup>9</sup>. Foi proposto também um método baseado em PCR *multiplex*, utilizando dois pares de iniciadores, em uma mesma reação, com o objetivo de amplificar dois fragmentos de DNA bovino de 121 e 290 pb. A pesquisa mostrou que a PCR *multiplex* é uma técnica rápida e segura, podendo ser considerada uma ferramenta útil no controle de carne e produtos cárneos de qualidade<sup>15</sup>.

No mesmo contexto, outro estudo utilizou uma PCR *multiplex* para avaliar a presença de carne fraudulenta em espécies de ruminantes (*Bos taurus*, *Capra hircus* e *Ovis aries*), aves domésticas (*Gallus gallus* e *Meleagris meleagris*) e de suíno (*Sus scrofa*) em carne moída, embutidos e cortes frescos. Foram coletadas 10 amostras de cada fonte, constatou-se que nenhuma das amostras apresentou resíduos de suíno, mas 40 % das amostras de embutidos e 30 % das amostras de corte fresco apresentaram DNA de aves, e não se constatou fraude nas carnes moídas analisadas<sup>15</sup>. Os resultados das pesquisas citadas acima juntamente com os apresentados no presente trabalho corroboram a informação de Veloso et al<sup>23</sup>, que afirmam que a utilização da PCR torna possível a identificação de uma espécie em diferentes produtos alimentares, detectando, assim uma possível adulteração.

No presente estudo iniciadores que amplificam sequências específicas da região alvo mitocondrial 12S do RNA ribossômico<sup>13</sup> foram utilizados e se mostraram altamente específicos e eficientes em detectar a fraude experimental realizada nas concentrações do presente trabalho, visto que a extração de DNA total das amostras das carnes moídas experimentalmente fraudadas, possibilitou a amplificação da sequência de DNA específica, referente às espécies de interesse.

Através da PCR *multiplex* realizada nas condições selecionadas no presente experimento foi possível se obter *amplicons* de 346 pb para carne moída bovina e 220 pb para carne moída bubalina (Figuras 1 e 2) e, através da fabricação de carnes moídas experimentalmente fraudadas com incremento de diferentes percentagens de carnes moídas bubalinas, observou-se que a PCR *multiplex* proposta foi capaz de detectar

a incorporação de carne moída bubalina em percentagens que variaram de 10 a 100 %, e a incorporação de carne bovina em percentagens que variaram de 0,1 a 100 %, semelhante ao relatado por López-Calleja et al<sup>13</sup> que desenharam os iniciadores e propuseram o uso de uma PCR tradicional para detecção de fraude em queijos.

Esses autores<sup>13</sup>, que desenharam um conjunto de iniciadores, dos quais três foram os utilizados no presente trabalho, analisaram misturas de queijo de leite de búfala e mozzarella de leite de búfala contendo diferentes percentagens de leite ou de queijo mozzarella bovina. Os resultados demonstraram um limiar de sensibilidade de 0,1 %. Os mesmos pesquisadores, em um outro experimento<sup>24</sup>, analisaram 5 séries independentes de misturas binárias de leite de vaca no leite de búfala, e os resultados da PCR *multiplex* nas misturas experimentais demonstraram capacidade de detecção de 0,1 a 100 % de leite de vaca no leite de búfala. Esse resultado foi reproduzido na presente pesquisa, onde o limite de detecção para a carne bovina foi de 0,1 % (Figura 2). No entanto, uma sensibilidade inferior foi apresentada na detecção de carne bubalina, sendo esta de 10 % (Figura 2). Não foi possível fazer uma correlação entre a sensibilidade de detecção de carne bubalina com os trabalhos citados anteriormente, visto que em nenhum de seus experimentos López-Calleja et al<sup>13, 24</sup> avaliaram a sensibilidade de detecção da espécie bubalina, em virtude de que o objetivo dos autores sempre foi o de determinar o limite de detecção da técnica para a detecção de DNA da espécie bovina adicionada em amostras bubalinas.

Essa capacidade diferenciada dos iniciadores em uma mesma reação de PCR, segundo Hou et al<sup>25</sup> evidencia que a sensibilidade da PCR *multiplex* varia de acordo com a espécie, gene alvo e tamanho do fragmento amplificado. Matsunaga et al<sup>18</sup> identificaram espécies de gado (*Bos taurus*), cabra (*Capra hircus*) e ovelha (*Ovis aries*), utilizando como região alvo o citocromo b, com um limite de detecção de 0,25 ng para todas as espécies. Outros autores<sup>26</sup> trabalhando com o gene alvo 12S do rRNA detectaram um limite de 0,002 % (0,0025 ng) para as mesmas

espécies de ruminantes. Zhang<sup>17</sup> trabalhando com alimentos pré-cozidos, cozidos e processados de carne bovina, utilizando como alvo o gene do citocromo b, detectaram o limite de 0,001 ng de DNA. Zha et al<sup>27</sup> amplificaram sequências da região do tRNA e encontraram limites diferenciados para as espécies em questão, sendo 0,5 % para bovinos (*Bos taurus*), 1 % para suínos (*Sus scrofa*) e 5 % para frangos (*Gallus gallus*). Estes dados demonstram que há uma carência de informações quanto a sensibilidade envolvendo a espécie *Bubalus bubalis*, porém os estudos acima mencionados e os resultados apresentados na presente pesquisa evidenciam que a variação na sensibilidade de detecção em pesquisas de PCR *multiplex* é um fenômeno natural e que varia de espécie para espécie, o que pode explicar o fato da sensibilidade aqui demonstrada para a carne bubalina ter sido inferior do que a para a carne bovina.

Os dados apresentados no presente trabalho demonstram que a técnica proposta pode ser uma importante ferramenta a ser utilizada pelos órgãos oficiais de fiscalização, pois apresentou elevada sensibilidade na análise de amostras de alimentos. O teste empregado foi capaz de identificar com exatidão as espécies em questão, demonstrando bandas específicas apenas a espécie alvo e não apresentando reação cruzada ou formação de dímeros, o que indica sua precisão. A técnica também se demonstrou altamente sensível, sendo capaz de detectar incrementos de 10 % (2,05 ng) de DNA bubalino e 0,1 % (0,041 ng) de DNA bovino, sendo essa sensibilidade compatível com a relatada por diversos autores<sup>13,14,17,18,24</sup>.

Embora os dados demonstrados sejam de extrema relevância, maiores estudos visando a quantificação de DNA bubalino em amostras obtidas no comércio devem ser realizados, objetivando o emprego rotineiro da metodologia em amostras em condições diferentes das propostas neste experimento. Para tal, o uso de *Real Time* PCR, que já vem sendo estudado no Brasil para utilização em produtos alimentícios a partir de matéria prima bubalina<sup>28,29</sup>, pode ser uma alternativa viável para detecção de fraude em produtos cárneos.

## CONCLUSÃO

Concluiu-se que a PCR *multiplex* proposta é uma técnica de elevada precisão, com capacidade de detecção das espécies *Bos taurus* e *Bubalus bubalis* sem pareamentos inespecíficos entre os iniciadores. A técnica mostrou-se de alta sensibilidade, capaz de detectar, de forma precisa, a presença de fraude (identificação simultânea) com um limiar de 2,05 ng de DNA bubalino e 0,041 ng de DNA bovino, e um limiar de detecção em incrementos de 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 90 %, 95 %, 99 %, 99,9 %, 99,99 % e 100 % de carne moída bubalina em carnes moídas bovinas e de 0,1 %, 1 %, 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 90 %, 95 %, 99 %, 99,9 %, 99,99 % e 100 % de carne moída bovina em carne moída bubalina. Além disso, as repetições utilizadas evidenciaram a repetibilidade da técnica, podendo vir a ser uma alternativa na rotina de fiscalização oficial desses produtos.

## REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 83, de 21 de novembro de 2003. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Carne Moída de Bovino. Diário Oficial [da] União, 24 nov. 2003, Seção 1, p.29. [acesso 2014 Nov 20]. Disponível em: [<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=4317>].
2. Torre JCM, Beraquete NJ. Composição centesimal e teor de colágeno em carne bovina moída. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2005;64(2):223-31.
3. Pigarro PMA, Santos M. Avaliação microbiológica da carne moída de duas redes de supermercados da cidade de Londrina- PR [monografia de especialização]. Universidade Castelo Branco; 2008.
4. Mendonça BS, Silva CS, Souza LM, Martins MLL. Qualidade microbiológica da carne moída comercializada na cidade Cariacica, ES. *Rev Hig Aliment*. 2012;26(208/209):101-5.

5. Marques CSS, Oaigen RP, Moraes CM, Tavares REB, Lima MM, Miranda AS. Caracterização da Cadeia Produtiva Bubalina no Brasil: Rebanho, Abates e Limitações. X Congresso Brasileiro de Buiatria; setembro de 2013; Belém: XXXVII Semana do Médico Veterinário do Pará - SEMAVET. p.173-88.
6. Ohly JJ. Prova organoléptica com carnes bubalinas e bovinas de animais criados nas pastagens de várzeas da Amazônia central. *Acta Amaz*. 1997;27(1): 33-42. [DOI:10.1590/1809-43921997271042].
7. Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal (RIISPOA). Diário Oficial [da] União. Brasília, DF, 7 jul. 1956.
8. Mane BG, Mendiratta SK, Tiwari AK. Polymerase chain reaction assay for identification of chicken in meat and meat products. *Food Chem*. 2009;116(3):806-10. [DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.03.030].
9. Mane BG, Mendiratta SK, Tiwari AK. Beef specific polymerase chain reaction assay for authentication of meat and meat products. *Food Chem*. 2012;(28):246-9. [DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.05.031].
10. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2012). Censo Agropecuário 2012. [acesso 2014 Nov 25]. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2012/default\_pdf.shtm].
11. Bender AE. Meat and meat products in human nutrition in developing. *Food and Nutrition Paper* 53. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome; 1992.
12. Karabasanavar NS, Singh SP, Umaphathi V, Kumar D, Patil G, Shebannavar SN. A highly specific PCR assay for identification of raw and heat treated mutton (*Ovis aries*) Small Ruminant Research. *Meat Sci*. 2011;100(2):153-8. [DOI:10.1016/j.smallrumres.2011.07.009].
13. López-Calleja I, González AI, Fajardo V, Rodríguez MA, Hernández PE, García T, et al. PCR detection of cows' milk in water buffalo milk and mozzarella cheese. *Int Dairy J*. 2005;15(11):1122-9. [DOI: 10.1016/j.idairyj.2004.12.003].
14. Darwish SF, Allam HA, Amin AS. Evaluation of PCR assay for detection of cow's Milk in water buffalo's milk. *World Appl Sci J*. 2009;7(4):461-7.
15. Ghovvati S, Nassiri MR, Mirhoseini SZ, Moussavi AH, Javadmanesh A. Fraud identification in industrial meat products by multiplex PCR assay. *Food Control*. 2009;20(8):696-9. [DOI:10.1016/j.foodcont.2008.09.002].
16. Luo JQ, Wang JQ, Bu DP, Dan L, Wang L, Wei HY. Development and application of a PCR approach for detection of bovis, sheep, pig, and chicken derived materials in feedstuff. *Agri Sci China*. 2008;7(10):1260-6. [DOI: 10.1016/S1671-2927(08)60173-X].
17. Zhang C. Semi-nested multiplex PCR enhanced method sensitivity of species detection in further-processed meats. *Food Control*. 2013;31(2):326-30. [DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.11.002].
18. Matsunaga T, Chikuni K, Tanabe R, Muroya S, Shibata K, Yamada J, et al. A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Sci*. 1999;51(2):143-8. [DOI: 10.1016/S0309-1740(98)00112-0].
19. Kitpipit T, Sittichan K, Thanakiatkrai, P. Direct-multiplex PCR assay for meat species identification in food products. *Food Chem*. 2014;(163):77-82. [DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.04.062].
20. Ali ME, Kashif M, Uddin K, Hashim U, Mustafa S, Che Man YB. Species authentication methods in foods and feeds: the present, past, and future of halal forensics. *Food Anal Methods*. 2012;5(5):935-55. [DOI:10.1007/s12161-011-9357-3].
21. Kitpipit T, Sittichan K, Thanakiatkrai P. Are these food products fraudulent? Rapid and novel triplex-direct PCR assay for meat identification. *Forensic Sci Int Genet*. 2013;4(1):e33-4. [DOI:10.1016/j.fsigs.2013.10.016].
22. Bai WL, Yin RH, Zhao SJ, Li C, Ma ZJ, Yin RL, et al. A PCR assay for sex determination of yak (*Bos grunniens*) meat by amplification of the male-specific SRY gene. *Food Control*. 2010;21(5):726-31. [DOI:10.1016/j.foodcont.2009.10.016].

23. Veloso ACA, Teixeira N, Ferreira IMPLVO, Ferreira MA. Detecção de adulterações em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas. *Quim Nova*. 2002;25(4):609-15.
24. López-Calleja I, González I, Fajardo VA, Martín I, Hernández PE, García T, Martín R. Application of Polymerase Chain Reaction to Detect Adulteration of Sheep's Milk with Goats' Milk. *Int Dairy J*. 2005;15(6):3115-20. [DOI:10.3168/jds.S0022-0302(05)72993-3].
25. Hou B, Meng X, Zhang L, Guo J, Li S, Jin H. Development of a sensitive and specific multiplex PCR method for the simultaneous detection of chicken, duck and goose DNA in meat products. *Meat Sci*. 2015;(101):90-4. [DOI: 10.1016/j.meatsci.2014.11.007].
26. Ballin NZ. Authentication of meat and meat products. *Meat Sci*. 2010;86(3):577-87. [DOI:10.1016/j.meatsci.2010.06.001].
27. Zha D, Xing X, Yang F. A multiplex PCR assay for fraud identification of deer products. *Food Control*. 2010;21(10):1402-7. [DOI:10.1016/j.foodcont.2010.04.013].
28. Drumond MG, Brasil BSAF, Dalsecco LS, Brasil RSAF, Teixeira LV, Oliveira DAA. A versatile real-time PCR method to quantify bovine contamination in buffalo products. *Food Control*. 2013;(29):131-7. [DOI:10.1016/j.foodcont.2012.05.051].
29. Teixeira LV, Teixeira CS, Oliveira DAA. Identificação espécie-específica de carnes e produtos cárneos de origem bubalina e bovina pela técnica de PCR RFLP. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2015;67(1):309-14. [DOI:10.1590/1678-7239].

# Composição centesimal de iogurtes tradicionais e iogurtes líquidos: incompatibilidade com as descrições da rotulagem

## Centesimal composition of traditional yoghurts and drinking yoghurts: inconsistency with the descriptions on the labels

RIALA6/1672

Heloísa Fernanda Bandeira PACHECO, Letícia Maria Nogueira SÍGOLO, Ana Paula Badan RIBEIRO, Julicristie Machado de OLIVEIRA\*

\*Endereço para correspondência: Faculdade de Ciências Aplicadas, Universidade Estadual de Campinas, FCA/UNICAMP, Rua Pedro Zaccaria, 1300, Caixa Postal 1068, CEP: 13484-350, Limeira, SP. Email: julicristie.oliveira@fca.unicamp.br

Recebido: 14.07.2015 - Aceito para publicação: 21.09.2015

### RESUMO

O presente estudo teve por objetivo analisar a composição centesimal de iogurtes tradicionais e de iogurtes líquidos de diferentes marcas, e avaliar a fidedignidade desta por meio de comparação com as informações declaradas no rótulo nutricional. Os principais procedimentos metodológicos utilizados incluíram a determinação dos teores de umidade, proteínas, lipídios totais, carboidratos, fibra alimentar total e cinzas. Os teores proteicos apresentaram-se em concordância com as informações declaradas nos rótulos. Em relação aos lipídios, todas as amostras de iogurtes tradicionais demonstraram valores analíticos superiores àqueles declarados nos rótulos. Quanto aos iogurtes líquidos, quatro amostras estavam com discrepância em relação ao teor lipídico e uma amostra não apresentou informação nutricional referente a este macronutriente. Pelo exposto, destaca-se a importância da melhoria dos processos tecnológicos, pois a qualidade das informações expressas nos rótulos dos iogurtes é imprescindível para o consumidor e para os profissionais de saúde como os nutricionistas.

**Palavras-chave:** produtos lácteos, composição de alimentos, rotulagem de alimentos, análise de alimentos, informação nutricional.

### ABSTRACT

This study aimed at analyzing the centesimal composition of traditional yoghurt and drinking yoghurts of different brands, and to evaluate the reliability of them by comparing with the information declared on the nutrition facts labels. The included methodological procedures were the determination of moisture, protein, total fat, carbohydrates, dietary fiber and ashes. The protein contents were in accordance with the information declared on the labels. Concerning to lipids, all of the traditional yoghurt samples showed analytical values higher than those declared on the labels. Among the liquid yoghurts, four samples showed discrepancy regarding to the lipid contents, and no nutritional information related to this macronutrient was provided in one sample label. Accordingly to these findings, it is emphasized the importance of improving the technological process, as the accuracy of the information declared in the nutritional label should be guaranteed to the consumers and to the health professionals as dietitians.

**Keywords:** dairy products, food composition, food labelling, food analysis, nutritional information.

## INTRODUÇÃO

A produção de iogurte remonta há milhares de anos, porém não se conhece sua origem exata<sup>1,2</sup>. Acredita-se que sua produção tenha sido desenvolvida por nômades no Oriente Médio que, ao guardarem o leite à temperatura ambiente em clima subtropical, proporcionaram a modificação de sua estrutura, em decorrência da proliferação de bactérias provenientes das condições primitivas de ordenha e ausência de refrigeração<sup>2</sup>.

A partir de então, aperfeiçoaram-se os processos de sua produção de tal forma que, atualmente, o iogurte é considerado o leite fermentado mais conhecido e difundido no mundo<sup>2</sup>. Ademais, o consumo deste alimento tem aumentado consideravelmente, em decorrência da busca por um estilo de vida saudável<sup>3</sup>.

Segundo a Resolução nº 46 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o iogurte é definido como leite fermentado "...cuja fermentação se realiza com cultivos protossimbióticos de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* aos quais podem-se acompanhar, de forma complementar, outras bactérias ácido-lácticas que, por sua atividade contribuem para a determinação das características do produto final"<sup>4</sup>.

A aceitação do iogurte por parte dos consumidores depende da sua qualidade, que é determinada especialmente por duas características, como a consistência e a viscosidade<sup>3</sup>. A Instrução Normativa nº 68 do MAPA<sup>5</sup> determina que sua consistência deve ser líquida, pastosa ou gelificada, de cor branca ou de acordo com as substâncias e/ou corantes alimentícios que foram adicionados, além de apresentar odor e sabor característicos.

Além de toda publicidade expressa na mercadoria, a informação nutricional também deve estar presente. Espera-se que esta seja fidedigna à composição do produto colocado à venda, pois o Código de Proteção e Defesa do Consumidor<sup>6</sup> assegura o acesso às informações de qualidade, bem como aos indicadores de segurança no consumo<sup>7</sup>.

Apesar do consumo de iogurte ter aumentado no Brasil, há escassez de pesquisas que avaliam

a composição centesimal deste alimento, bem como a veracidade das informações expressas nos rótulos. Desta forma, o presente estudo teve por objetivo analisar a composição centesimal de iogurtes tradicionais e de iogurtes líquidos de diferentes marcas e avaliar a fidedignidade destas pela comparação com as informações declaradas no rótulo nutricional.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para o estudo, foram selecionadas cinco marcas para as classes tecnológicas do produto em questão. A escolha das marcas foi baseada em pesquisa de mercado, utilizando-se o levantamento sobre os produtos mais comercializados no ano de 2012<sup>8</sup>.

Foram analisadas amostras de iogurtes tradicionais sabor morango e iogurtes líquidos com diferentes sabores. Os produtos foram adquiridos na cidade de Limeira/SP, em setembro de 2013, em embalagens íntegras e lacradas, sendo improvável a contaminação externa.

Para cada marca dos produtos, foram homogeneizadas três unidades para as diferentes determinações analíticas. Estas amostras foram designadas respectivamente como A, B, C, D e E, para os iogurtes tradicionais, e da mesma forma os iogurtes líquidos foram denominados como amostras F, G, H, I e J.

### Determinações Experimentais

O estudo da composição centesimal incluiu a determinação dos teores de umidade, proteínas, lipídios totais, carboidratos, fibra alimentar total e cinzas. Com a exceção de fibra alimentar total, as demais análises foram realizadas em duplicata.

O teor de umidade foi investigado pela técnica de secagem em estufa, de acordo com os métodos oficiais da *Association of Official Analytical Chemists*<sup>9</sup> e os métodos analíticos do Instituto Adolfo Lutz<sup>10</sup>. Os valores de proteína foram calculados a partir dos teores de nitrogênio total, usando-se os fatores de conversão da FAO/73<sup>11</sup>. Determinou-se o teor de nitrogênio total pelo método Kjeldahl, seguindo-se os procedimentos da *Association of Official Analytical Chemists*<sup>9</sup>,

do Instituto Adolfo Lutz<sup>10</sup> e da *American Association of Cereal Chemists*<sup>12</sup>.

Os lipídios foram investigados pelo método de extração Soxhlet, com hidrólise ácida prévia, segundo as metodologias da *Association of Official Analytical Chemists*<sup>9</sup> e do Instituto Adolfo Lutz<sup>10</sup>. A pesquisa do teor de cinzas foi realizada por incineração em mufla, de acordo com *Association of Official Analytical Chemists*<sup>9</sup> e Instituto Adolfo Lutz<sup>10</sup>.

Avaliou-se o teor de fibra alimentar total por meio de método enzimático gravimétrico conforme *Association of Official Analytical Chemists*<sup>9</sup> e Prosky et al<sup>13</sup>. Como os iogurtes não representam fontes de fibras, esta análise foi realizada uma única vez para as amostras. O teor de carboidratos foi calculado pela diferença entre 100 e a soma das porcentagens de água, proteína, lipídeos totais, cinzas e fibras<sup>14</sup>. A energia alimentar foi expressa em kilocalorias (kcal) e kilojoules (kJ). No cálculo do valor calórico de cada alimento utilizou-se o calor de combustão e a digestibilidade, baseando-se nos teores em proteínas, lipídios e carboidratos, de acordo com o sistema Atwater, e utilizando-se os coeficientes específicos<sup>15,16</sup>.

\*Energia total metabolizável expressa em kilojoule (kJ) foi calculada a partir da energia dos nutrientes, considerando-se os fatores de conversão de Atwater:  $(17 \times \text{g proteína}) + (16 \times \text{g carboidratos (total carboidratos) - fibra alimentar}) + (37 \times \text{g total lipídios}) + (29 \times \text{g etanol})$ ;

\*Energia total metabolizável expressa em kilocalorias (kcal) foi estabelecida considerando-se os fatores de conversão de Atwater:  $(4 \times \text{g proteína}) + (4 \times \text{g carboidratos (total carboidratos) - fibra alimentar}) + (9 \times \text{g total lipídios}) + (7 \times \text{g etanol})$ .

### Análise Estatística

As informações de composição centesimal obtidas após as determinações laboratoriais foram digitadas em um banco de dados do programa *Microsoft Excel*, bem como a inserção de fórmulas correspondentes a cada componente de análise. A caracterização do perfil das amostras estudadas foi realizada por análise descritiva, com o cálculo de médias e desvios-padrão.

## RESULTADOS

### Iogurtes Tradicionais

Os resultados obtidos na análise da composição centesimal das amostras de iogurte tradicionais encontram-se na Tabela 1. Os teores de umidade mostraram-se semelhantes em todas as amostras avaliadas, situando-se entre 75,00 e 79,75 g/100 g. As amostras foram caracterizadas por conteúdo proteico médio de 2,45 g/100 g, com exceção da amostra B, que apresentou teor de proteínas superior às demais amostras avaliadas (4,11 g/100 g). O teor de lipídios das diferentes amostras variou entre 4,83 e 6,25 g/100 g. Para as cinzas, foi verificado teor máximo de 1,99 g/100 g para a totalidade das amostras. No que se refere à quantidade de carboidratos, as amostras avaliadas foram caracterizadas por teores entre 9,55 e 15,62 g/100 g, que representam a maior variação de um macronutriente específico entre os produtos em análise. De modo geral, os iogurtes não representam fontes de fibras, em consonância com os resultados experimentais para as amostras avaliadas, os quais se situaram entre 0,03 e 0,30 g/100 g, relativos possivelmente à contribuição de aditivos na formulação.

Na Tabela 1 estão apresentadas a comparação entre os resultados experimentais obtidos neste estudo para as diferentes amostras avaliadas, bem como as informações fornecidas nos rótulos dos produtos, no que concerne à composição em macronutrientes.

Quanto ao teor lipídico das amostras avaliadas, notou-se que nos rótulos foram declarados teores inferiores aos valores determinados experimentalmente em quatro produtos: A, B, D e E. Na amostra C, foi indicada quantidade não significativa para lipídios (inferior a 0,5 g/porção), enquanto o valor experimental detectado foi igual a 5,40 g/100 g, e este resultado correspondeu à maior diferença entre os valores encontrados nos rótulos e os dados obtidos em análise (4,9 g/100 g). Estas diferenças foram de 3,38 g/100 g, 3,02 g/100 g, 2,39 g/100 g e 3,7 g/100 g para os produtos A, B, D e E, respectivamente.

**Tabela 1.** Composição centesimal de amostras de iogurte tradicional (A a E) e de iogurte líquido (F a J), observada experimentalmente e declarada na rotulagem

Amostras	Componentes													
	Umidade <sup>1</sup>		Proteínas <sup>1</sup>		Lipídeos <sup>1</sup>		Cinzas <sup>1</sup>		Fibras <sup>1</sup>		Carboidratos <sup>1</sup>		Energia <sup>2</sup>	
	V <sub>observado</sub>	V <sub>rotulado</sub>	V <sub>observado</sub>	V <sub>rotulado</sub>	V <sub>observado</sub>	V <sub>rotulado</sub>								
A	75,00 ± 4,95	NE	2,76 ± 0,14	2,77	5,71 ± 0,60	2,33	0,73 ± 0,34	NE	0,18	0,00	15,62 ± 0,00	17,77	124,19 ± 0,00	103,33
B	75,00 ± 3,53	NE	4,11 ± 0,06	3,44	6,13 ± 0,24	3,11	1,00 ± 0,00	NE	0,04	**	11,28 ± 0,00	14,44	116,57 ± 0,00	100,00
C	79,00 ± 0,00	NE	2,76 ± 0,06	2,80	5,40 ± 0,22	*	0,00 ± 0,00	NE	0,03	**	13,05 ± 0,00	16,00	111,72 ± 0,00	77,00
D	76,75 ± 0,35	NE	2,49 ± 0,10	2,33	4,83 ± 0,09	2,44	1,99 ± 0,01	NE	0,28	0,00	13,66 ± 0,00	17,77	106,95 ± 0,00	102,22
E	79,75 ± 0,35	NE	2,16 ± 0,09	2,11	6,25 ± 0,04	2,55	1,99 ± 0,01	NE	0,30	**	9,55 ± 0,00	15,55	101,89 ± 0,00	93,33
F	82,00 ± 0,00	NE	2,40 ± 0,27	2,70	3,35 ± 0,18	1,50	2,00 ± 0,70	NE	0,09 ± 0,00	NE	10,16 ± 0,00	13,00	80,03 ± 0,00	77,00
G	82,00 ± 0,00	NE	2,56 ± 0,40	2,55	1,88 ± 0,38	1,11	0,49 ± 0,00	NE	0,48 ± 0,00	0,38	12,59 ± 0,00	14,44	75,60 ± 0,00	72,77
H	81,75 ± 0,35	NE	2,67 ± 0,00	2,27	3,97 ± 0,18	1,05	2,49 ± 0,00	NE	0,00 ± 0,00	0,00	9,12 ± 0,00	14,44	82,89 ± 0,00	87,22
I	79,00 ± 0,00	NE	2,29 ± 0,05	2,55	3,23 ± 0,24	1,44	0,24 ± 0,34	NE	0,31 ± 0,00	0,44	14,96 ± 0,00	16,11	96,83 ± 0,00	76,66
J	81,00 ± 0,00	NE	2,58 ± 0,08	2,44	2,44 ± 0,21	NE	2,98 ± 0,02	NE	0,24 ± 0,00	NE	10,76 ± 0,00	16,11	74,36 ± 0,00	71,00

NE: Valor não estabelecido; \*: Menor ou igual a 0,5 g/porção; \*\*: Menor ou igual a 0,5 g/porção; †: valores expressos em g/100 g; ‡: valores expressos em Kcal/100 g; V<sub>observado</sub>: Média dos valores obtidos experimentalmente ± desvio padrão, considerando três amostras analisadas em duplicata; V<sub>rotulado</sub>: Valor declarado na rotulagem do produto

Quanto ao conteúdo proteico, destacou-se a amostra B em que foram detectados valores superiores às demais amostras avaliadas. Em referência à Tabela 1, das informações declaradas nos rótulos das marcas de produtos analisados, observou-se que o teor proteico informado corrobora o valor definido nas determinações analíticas.

Por meio de resultados experimentais, verificou-se que a amostra E continha o menor teor de carboidratos dentre as marcas avaliadas. No entanto, este produto apresentou a diferença mais significativa entre os resultados analíticos e os valores apresentados no rótulo em relação aos lipídios.

Na Tabela 2 estão expostos os valores experimentais inerentes à composição centesimal do produto analisado, bem como as informações previamente disponíveis na literatura para fins comparativos<sup>17-22</sup>.

Com referência à quantidade de proteínas, as amostras D e E apresentaram o teor proteico inferior ao valor mínimo reportado na literatura<sup>18</sup>. Porém, considerando-se a legislação<sup>4</sup>, pode-se afirmar que o teor de proteínas menor do que 2,90 g/100 g é aceitável para iogurtes com adição de frutas e açúcares.

Quanto ao teor lipídico, todas as amostras analisadas demonstraram quantidades superiores às informadas nas referências consultadas, que por sua vez, declararam quantidade de lipídios entre 0,10 e 3,10 g/100 g. Em contrapartida,

os resultados experimentais apontam valores na faixa de 4,83 e 6,25 g/100 g.

### Iogurtes líquidos

Os resultados obtidos na análise da composição centesimal das amostras de iogurtes líquidos estão também apresentados na Tabela 1. Os teores de umidade mostraram-se semelhantes em todas as amostras, situando-se entre 79,00 e 82,00 g/100 g. Os teores de proteínas nestas amostras apresentaram o valor médio correspondente a 2,5 g/100 g. O teor de lipídios variou de 1,88 g/100 g a 3,97 g/100 g, e o produto G mostrou o menor teor quando comparado aos demais. Quanto aos teores de cinzas, nos produtos F, H e J foram detectados valores mais elevados em relação aos outros iogurtes. O valor mínimo de carboidratos obtido foi de 9,12 g/100 g, e o valor máximo foi de 14,96 g/100 g, dados estes que representaram a maior variação entre todos os macronutrientes estudados. Os valores encontrados para as fibras variaram de 0,00 g/100 g a 0,48 g/100 g. O cálculo do valor calórico apresentou grande variação entre as amostras. O maior valor calórico entre os cinco iogurtes analisados foi evidenciado no produto I e o menor valor no produto J.

Conforme indicado na Tabela 1, efetuando-se a comparação dos resultados experimentais obtidos com os valores expressos nos rótulos dos cinco iogurtes analisados, o teor de lipídios mostrou valor elevado em quatro produtos: F, G,

**Tabela 2.** Composição centesimal de referenciada para iogurtes

Referência	Componentes						
	Umidade <sup>1</sup>	Proteínas <sup>1</sup>	Lipídeos <sup>1</sup>	Cinzas <sup>1</sup>	Fibras <sup>1</sup>	Carboidratos <sup>1</sup>	Energia <sup>2</sup>
TACO (2011) <sup>17</sup>	84,6	2,7	2,3	0,6	0,2	9,7	70,00
TBCA-USP (2008) <sup>18</sup>	76,92	2,54	1,85	0,68	0	18,01	99,00
Torres (2000) <sup>19</sup>	85,87	4,29	2,16	0,71	NA	5,26	58,00
IBGE (1999) <sup>20</sup>	80	3,5	0,1	0,9	0	15,5	76,00
IBGE (2008-2009) <sup>24</sup>	NA	3,46	3,47	NA	2,13	14,62	98,69
Philippi (2002) <sup>21</sup>	NA	3,1	2,6	NA	NA	16,81	97,90
Rensis (2008) <sup>22</sup>	82,88	4,81	3,1	1,03	NA	8,18	NA
USDA (2013) <sup>23</sup>	71,2	3,00	3,60	NA	0,00	21,60	127,00
Franco (2007) <sup>25</sup>	NA	3,5	0,10	NA	NA	15,50	76,00

NA: não avaliado; <sup>1</sup>: valores expressos em g/100 g; <sup>2</sup>: valores expressos em Kcal/100 g

H e I. O produto J não apresentou a informação nutricional deste macronutriente. A maior diferença entre os valores indicados nos rótulos e os dados obtidos na análise foi de 2,92 g/100 g, que foi detectada no produto H. As diferenças de 1,95 g/100 g, 0,77 g/100 g e 1,79 g/100 g foram observadas nos produtos F, G e I, respectivamente.

Os teores de proteínas informados nos rótulos dos iogurtes líquidos foram semelhantes aos valores encontrados nas análises de todas as amostras avaliadas. Entre as amostras analisadas, os produtos H e J apresentaram as maiores diferenças no teor de carboidratos quando os resultados experimentais foram comparados aos dados expressos nos respectivos rótulos.

Apenas o produto H demonstrou valor calórico menor do que o indicado no rótulo; e o produto I mostrou a maior diferença energética entre o resultado obtido na amostra analisada e o dado expresso no rótulo.

Considerando-se as faixas de valores máximos e mínimos para cada componente, com base nas referências<sup>17-19,23-25</sup> e apresentados na Tabela 2, pode-se observar que os produtos F e I apresentaram quantidade de proteínas abaixo da faixa estabelecida.

O produto H demonstrou valor acima do teor máximo para lipídios, sendo o valor experimental de 3,97 g/100 g e o de referência<sup>25</sup> de 3,60 g/100 g. Em relação a cinzas, todos os produtos estavam fora da faixa de valores aceitáveis nas referências. Contudo, todos os resultados das análises relativas ao valor calórico estavam de acordo com as referências.

## DISCUSSÃO

Os dados mais relevantes, quanto à incongruência existente entre as informações nutricionais descritas nos rótulos dos respectivos produtos e a real composição dos iogurtes detectada no presente trabalho, foram referentes aos teores de lipídios e ao valor calórico de alguns produtos.

Tendo em vista a Resolução nº 46 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento<sup>4</sup>, que estabelece os padrões de identidade e de qualidade dos leites fermentados

disponíveis para a comercialização e consumo, o iogurte integral deve apresentar o teor lipídico entre 3,00 e 5,90 g/100 g. Foi definido o valor mínimo de 2,90 g/100 g para as proteínas, todavia este teor poderá estar reduzido se os iogurtes forem adicionados de frutas e açúcares.

No presente trabalho, os teores lipídicos de todos os iogurtes tradicionais analisados apresentaram valores analíticos superiores aos expressos nos rótulos. Na amostra A, o teor lipídico declarado no rótulo foi 40,80 % menor do que o identificado pela análise experimental. Outrossim, nos rótulos das amostras B, D e E havia indicação de teores lipídicos, respectivamente, de 50,73 %, 50,52 % e 40,80 % inferiores aos valores determinados experimentalmente.

O mesmo ocorreu para quatro iogurtes líquidos analisados. Os teores lipídicos mencionados nos rótulos dos produtos F, G, H e I foram, respectivamente, 44,77 %, 59,04 %, 26,44 % e 44,58 % inferiores aos valores apontados nas análises realizadas neste estudo. Além disto, é importante destacar que, com exceção das amostras B, F, H e I, as demais não atenderam ao padrão estabelecido pela legislação, pois foi informada a quantidade de lipídios inferior a 3,00 g/100 g<sup>4</sup>.

As características sensoriais de alguns alimentos são influenciadas, em certa medida, pela presença de lipídios<sup>22</sup>. No entanto, sua ingestão excessiva está associada ao desenvolvimento de diversas doenças<sup>22,26</sup>. Desta forma, a fidedignidade de informações presentes nos rótulos dos alimentos é uma importante aliada no processo de escolhas alimentares dos consumidores<sup>26</sup>.

Nos resultados experimentais obtidos para carboidratos, foram encontrados valores inferiores aos informados nos rótulos em todas as amostras analisadas, porém dentro da faixa de variabilidade preconizada pelo padrão de identidade do produto em questão<sup>4</sup>.

Quanto ao valor calórico dos iogurtes líquidos, os resultados experimentais demonstraram valores superiores aos expressos no rótulo de quatro produtos. Em um estudo realizado com análise de diferentes marcas de iogurte, observou-se que a adição de açúcares

ou outros ingredientes, que aumentam o teor de sólidos, é determinante no valor calórico<sup>27</sup>. Como o excesso de ingestão de energia e açúcares está associado ao aumento de peso e demais impactos negativos à saúde, é necessária a instituição de medidas interventivas que visem a redução do consumo de determinados produtos<sup>28</sup>.

Considerando-se a já esperada variabilidade na composição de alimentos em relação aos macronutrientes, além da quantidade limitada de estudos neste campo<sup>29</sup>, fez-se importante a contextualização dos resultados obtidos neste trabalho, comparando-os às diferentes fontes da literatura.

Ao contrapor as informações disponíveis na literatura para os iogurtes tradicionais<sup>17-22</sup>, os resultados experimentais obtidos apresentaram-se dentro das faixas de valores encontradas para umidade, cinzas e carboidratos. Para os iogurtes líquidos, os valores de umidade, fibra alimentar, carboidratos e valor calórico foram concordantes com a faixa de valores descrita em outros estudos<sup>17-19,23-25</sup>.

As informações disponíveis na literatura para macronutrientes foram obtidas por meio de diferentes técnicas analíticas. Por conseguinte, há limitações próprias que podem ter influenciado na variabilidade de informações observadas entre as diferentes fontes consultadas<sup>17-25</sup>.

Apesar de considerar estas limitações, torna-se fundamental o fortalecimento da fiscalização de produtos alimentícios por parte da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), criada pela Lei nº 9.782/1999<sup>30</sup>, para assegurar o acesso às informações de qualidade para o consumidor e para os profissionais de saúde, como os nutricionistas. Os resultados do presente estudo reforçam esta necessidade, pois parte das informações nutricionais expressas nos rótulos de iogurtes foram inconsistentes quando comparadas aos dados obtidos na análise da composição centesimal.

No estudo de Carneiro et al<sup>31</sup>, foram observadas irregularidades em todas as amostras avaliadas de acordo com a Resolução RDC nº 360/2003<sup>32</sup>, na qual foi estabelecida que é tolerável, no máximo, mais de 20 % em relação

aos teores de nutrientes descritos nos rótulos dos alimentos.

Nas amostras analisadas no presente trabalho foram também verificadas as irregularidades nos teores de lipídios e nos valores calóricos conforme a definição 3.5.1 da Resolução RDC nº 360/2003<sup>32</sup>. Com exceção dos produtos C e J, os demais apresentaram valores acima da tolerância máxima de 20% para lipídios e o mesmo foi observado para os produtos A, C e I em relação à energia.

Conforme as observações feitas por Ishimoto e Nacif<sup>33</sup>, a segurança dos alimentos está associada de forma direta com a confiabilidade nas informações declaradas, pois estas servem de subsídio para nortear o consumidor no processo de aquisição dos alimentos. Ademais, em consonância com a Lei 11.346/2006<sup>34</sup>, que consiste na “realização do direito de todos ao acesso regular e permanente a alimentos de qualidade...”, abrangendo também “a garantia da qualidade biológica, sanitária, nutricional e tecnológica dos alimentos...”, a confiabilidade torna-se imprescindível na construção da Segurança Alimentar e Nutricional.

## CONCLUSÃO

O estudo sobre a composição centesimal mostrou que o teor de proteínas encontrava-se em concordância com as informações expressas nos rótulos de ambas as classes tecnológicas de iogurtes. Quanto ao conteúdo de carboidratos, foram também identificados valores inferiores aos dos rótulos, porém dentro da faixa de variabilidade preconizada.

No entanto, verificou-se grande divergência no teor de lipídios nas amostras de iogurtes. Além disto, de forma geral, os teores de lipídios informados nos rótulos não atenderam ao padrão estabelecido pela legislação vigente.

Estes dados reforçam a importância do cumprimento de medidas de controle mais efetivas por parte de órgãos fiscalizadores, bem como a definição de critérios de fiscalização que façam uso das diretrizes, normas e regras presentes nas legislações de alimentos. Assim, os produtos disponíveis no mercado poderão

apresentar informações condizentes com sua composição, e os rótulos podem auxiliar no processo de escolhas alimentares mais saudáveis por parte da população.

## REFERÊNCIAS

1. Almeida CPM. Efeito do fator de concentração nas características de iogurte com baixo teor de lactose obtido por ultrafiltração [dissertação de mestrado]. São Caetano do Sul (SP): Instituto Mauá de Tecnologia; 2008.
2. Tamime AY, Robinson RK. *Yoghurt: science and technology*. 2ª ed. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 1999.
3. Mathias TRS, Andrade KCS, Rosa CLS, Silva BA. Avaliação do comportamento reológico de diferentes iogurtes comerciais. *Braz J Food Technol*. 2013;16(1):12-20. [DOI: 10.1590/S1981-67232013005000004].
4. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. Adota o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 24 out. 2007. Seção 1, p.4.
5. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de leite e Produtos Lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 14 dez. 2006. Seção 1, p. 8.
6. Brasil. Casa Civil, Subchefia para Assuntos Jurídicos. Lei nº 8078, de 11 de setembro de 1990. Dispõe sobre a proteção do consumidor e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 12 out. 1990. p 1.
7. Lobanco CM, Vedovato GM, Bonaldi C, Bastos DHM. Fidedignidade de rótulos de alimentos comercializados no município de São Paulo, SP. *Rev Saúde Pública*. 2009;43(3):499-505. [DOI: 10.1590/S0034-89102009005000020].
8. EBC - Editora Brasileira do Comércio. *A Revista do varejo de vizinhança Abastecimento. As mais vendidas*. Ed 36, 2012. [acesso 2013 Mar 11]. Disponível em: [<http://www.sincovaga.com.br/ct/abastecimento/pdf/AB36.pdf>].
9. Association of Official Analytical Chemists-AOAC. *Official methods of analysis of AOAC international*. 17ª ed. Gaithersburg: AOAC International; 2000.
10. Instituto Adolfo Lutz. *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 3ª ed. São Paulo (SP): Instituto Adolfo Lutz; 1985.
11. Greenfield H, Southgate DAT. *Food composition data: production, management and use*. 1ª ed. London: Chapman & Hal; 1992.
12. American Association of Cereal Chemists-AACC. *Approved methods of the American Association of Cereal Chemists*. 9ª ed. Saint Paul: AACC; 1995.
13. Prosky L, Asp NG, Furda I, DeVries JW, Schweizer TF, Harland BF. Determination of total dietary fiber in foods and food products: collaborative study. *J Assoc Off Anal Chem*. 1985;68(4):677-9.
14. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação (NEPA). *Tabela brasileira de composição de alimentos - Versão 2*. 2ª ed. Campinas (SP): Ed. NEPA-UNICAMP; 2006. 113p.
15. FAO.2003. *Food energy - methods of analysis and conversion factors*. Report of a technical workshop Rome, 3-6 December 2002. FAO Food Nutr Pap. N° 77. Rome. [acesso 2013 Mar 12]. Disponível em: [[http://www.fao.org/uploads/media/FAO\\_2003\\_Food\\_Energy\\_02.pdf](http://www.fao.org/uploads/media/FAO_2003_Food_Energy_02.pdf)].

16. Merrill AL, Watt BK. Energy value of foods - basis and derivation. *Agricultural Handbook*, nº 74. Estados Unidos da América: USDA; 1973 (revised).
17. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação (NEPA). Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. 4ª ed. Campinas (SP): Ed. NEPA-UNICAMP; 2011. 161p.
18. Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental/ BRASILFOODS (1998). Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TBCA) - USP. Versão 5.0. [acesso 2014 Jan 18]. Disponível em: [http://www.intranet.fcf.usp.br/tabela/].
19. Torres EAFS, Campos NC, Duarte M, Garbelotti ML, Philippi ST, Rodrigues RSM. Composição centesimal e valor calórico de alimentos de origem animal. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2000;20(2). [DOI: 10.1590/S0101-20612000000200003].
20. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Estudo da Despesa Familiar. Tabela de Composição de Alimentos. 5ª ed. Rio de Janeiro (RJ): IBGE; 1999.
21. Philippi ST. Tabela de composição de alimentos: suporte para decisão nutricional. 2ª ed. Brasília: Editora Gráfica Coronário; 2002.
22. Rensis CMVB, Souza PFF. Análise sensorial de iogurtes light elaborados com adição de fibras de inulina e oligofrutose. *FAZU Rev*. 2008;5:68-72.
23. United States Department of Agriculture - USDA. National Nutrient Database for Standard Reference. United States of America. [acesso 2014 Jan 24]. Disponível em: [http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/8262?fg=&man=&lfacet=&format=&count=&max=25&offset=0&sort=&qlookup=yogurt].
24. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Pesquisa de orçamento familiar 2008-2009: Tabela de composição nutricional dos alimentos consumidos no Brasil. [acesso 2014 Jan 21]. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicao\_de\_vida/pof/2008\_2009\_composicao\_nutricional/tab\_1.pdf].
25. Franco G. Tabela de composição química dos alimentos. 9ª ed. Rio de Janeiro (RJ): Atheneu; 2007.
26. Chiara VL, Sichieri R. Consumo alimentar em adolescentes. Questionário simplificado para avaliação de risco cardiovascular. *Arq Bras Cardiol*. 2001;77(4):332-6.
27. Rodas MAB, Rodrigues RMMS, Sakuma H, Tavares LZ, Sgarbi CR, Lopes WCC. Caracterização físico-química, histológica e viabilidade de bactérias lácticas em iogurtes com frutas. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2001;21(3):304-9. [DOI: 10.1590/S0101-20612001000300009].
28. Carmo MB, Toral N, Silva MV, Slater B. Consumo de doces, refrigerantes e bebidas com adição de açúcar entre adolescentes da rede pública de ensino de Piracicaba. *Rev Bras Epidemiol*. 2006;9(1):121-30. [DOI: 10.1590/S1415-790X2006000100015].
29. Menezes EW, Giuntini EB, Lajolo FM. A questão da variabilidade e qualidade de dados de composição de alimentos. *J Braz Soc Food Nutr*. 2003;26(1):63-76.
30. Brasil. Casa Civil, Subchefia para Assuntos Jurídicos. Ministério da Saúde. Lei nº 9.782, de 26 de Janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 27 jan. 1999. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\_03/leis/L9782.htm].
31. Carneiro JDS, Menezes CC, Pinto SM, Cláudio MA, Borges A, Pinheiro ACM. Evaluation of the acceptability, nutrition and labelling characteristics of different brands of yoghurt. *Rev Inst Latic Cândido Tostes*. 2010;65(377):21-8.
32. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Aprova Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 23 dez. 2003.
33. Ishimoto EY, Nacif MAL. Propaganda e marketing na informação nutricional. [acesso 2014 Abr 09]. Disponível em: [http://www.signuseditora.com.br/ba/pdf/11/11-propaganda.pdf].

34. Brasil. Casa Civil, Subchefia para Assuntos Jurídicos. Lei nº 11.346, de 15 de setembro de 2006. Cria o Sistema Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional – SISAN com vistas em assegurar o direito humano à alimentação adequada e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 18 set. 2006. p 1.

# Composição proximal e mineral de biscoitos tipo amanteigado enriquecidos com diferentes farinhas de casca de frutas

## Proximal and mineral composition of buttery biscuits enriched with different fruits peel flours

RIALA6/1673

Myrian Dayane Santana NOVAES<sup>1</sup>, Adriana Paiva de OLIVEIRA<sup>1\*</sup>, Thais HERNANDES<sup>2</sup>, Erika Cristina RODRIGUES<sup>1</sup>, Keyla dos Santos SIGARINI<sup>1</sup>, Francisca Graciele Gomes PEDRO<sup>1</sup>, Ricardo Dalla VILLA<sup>3</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso, Campus Cuiabá - Bela Vista. Avenida Juliano da Costa Marques s/n, Bairro Bela Vista, Cuiabá, MT, Brasil, CEP: 78050-560. Tel: 65 3318-5122. E-mail: adriana.oliveira@blv.ifmt.edu.br

<sup>2</sup>Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Mato Grosso, Campus Cuiabá

<sup>3</sup>Departamento de Química, Universidade Federal de Mato Grosso, Campus Cuiabá

Recebido: 28.05.2015 - Aceito para publicação: 01.10.2015

### RESUMO

Este trabalho teve como objetivo determinar a composição proximal e mineral de biscoitos tipo amanteigado enriquecidos com farinha da casca de banana nanica (*Musa paradisiaca*), de manga Tommy Atkins (*Mangifera indica* L.) e de mamão formosa (*Carica papaya* L.). Os biscoitos foram elaborados utilizando-se diferentes níveis de substituição da farinha de trigo pelas farinhas das cascas de frutas. A composição proximal foi obtida por meio de determinação dos teores de cinzas, umidade, proteínas, lipídeos, fibras alimentares, carboidratos digeríveis e valor energético total. A composição mineral foi determinada pela decomposição por via seca das amostras, e a quantificação foi feita por espectrometria de absorção atômica em chama. Os resultados da composição proximal apresentaram diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os biscoitos enriquecidos e a amostra de referência, exceto para o teor de umidade. Os biscoitos enriquecidos apresentaram teores de cinzas acima do biscoito referência, indicando um ganho em relação ao teor de minerais, o que foi comprovado para Fe, K, Cu e Ca. Os biscoitos amanteigados elaborados neste trabalho podem ser uma alternativa simples, sustentável e de baixo custo para o uso de resíduos de frutas na fabricação caseira de produtos alimentícios com ganho nutricional principalmente de conteúdo mineral.

**Palavras-chave.** fruta, casca, aproveitamento, bolacha.

### ABSTRACT

This study aimed at determining the proximal and the mineral composition of buttery biscuits enriched with flours made from nanica banana (*Musa paradisiaca*), Tommy Atkins mango (*Mangifera indica* L.) and papaya (*Carica papaya* L.) peels. The biscuits were prepared by proportional substitution of the wheat flour and replacing with the respective quantity of fruits peel flours. The proximal composition was analyzed by determining ash, moisture, protein, total fat, dietary fiber, digestible carbohydrates contents, and the energetic value. The mineral composition was determined by means of dry decomposition of samples and their quantification was performed by flame absorption atomic spectrometry. The proximate composition results showed significant differences ( $p \leq 0.05$ ) between the fortified biscuits and the reference sample except for the moisture contents. All of the enriched biscuits showed higher ash contents than the reference biscuit, which indicate a gain regarding the mineral contents, and mainly in Fe, K, Cu and Ca elements. The biscuits produced in this study might be a simple, sustainable and inexpensive alternative by using fruits waste for producing home-made food products with nutritional gain, mainly in the mineral contents.

**Keywords.** fruit, peel, harnessing, cookie.

## INTRODUÇÃO

O desperdício de alimentos é um problema mundial, e estima-se que aproximadamente um quarto da produção anual de alimentos para o consumo humano seja perdido ou desperdiçado, o equivalente a cerca de 1,3 bilhões de toneladas de alimentos. A Organização Mundial das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) estima que estes alimentos seriam suficientes para alimentar dois bilhões de pessoas<sup>1</sup>.

Anualmente, a América Latina e Caribe perdem ou desperdiçam aproximadamente 15 % de seus alimentos disponíveis, o que impacta a sustentabilidade dos sistemas alimentares, reduz a disponibilidade local e mundial de comida, gera menor renda para os produtores e aumentam os preços para os consumidores. Entre as perdas e desperdícios que ocorrem ao longo da cadeia produtiva nestas duas regiões, 28 % se dão no âmbito do consumidor; 28 % da produção; 17 % no mercado e distribuição; 22 % durante o manuseio e armazenamento e o 6 % restantes na etapa de processamento<sup>1</sup>.

No Brasil, o desperdício de alimentos é elevado, aproximadamente 26 milhões de toneladas anuais, uma quantidade que poderia alimentar aproximadamente 35 milhões de pessoas. O desconhecimento dos princípios nutritivos do alimento pela população, bem como o seu não aproveitamento, contribui para esse desperdício de toneladas de recursos alimentares<sup>2</sup>.

Os resíduos provenientes das frutas, como cascas, sementes e mesocarpos, podem contribuir como fonte alternativa de nutrientes e serem utilizados como ingrediente substancial de produtos alimentícios já existentes ou para desenvolvimento de novos produtos<sup>3</sup>.

A banana (*Musa* spp.) é originária do continente Asiático, todavia, atualmente é produzida na maioria dos países tropicais e, o Brasil é o quinto produtor mundial da fruta. Essa fruta é um componente constante na dieta dos brasileiros, principalmente os de baixa renda, devido às suas características sensoriais e alto valor nutritivo. Um único fruto de banana

pode suprir cerca de 30 % da ingestão diária recomendada de ácido ascórbico, além de fornecer quantidades significativas de vitaminas A e B, K e outros minerais<sup>4,5</sup>.

A manga (*Mangifera indica* L.) pertence à família Anacardiaceae e representa uma das frutas tropicais de maior expressão econômica mundial, sendo o Brasil o sétimo produtor mundial<sup>3,6,7</sup>. Marques et al<sup>8</sup> avaliaram a composição centesimal e mineral da casca e da polpa da manga variedade Tommy Atkins e observaram que o teor de fibra alimentar da casca da fruta era superior ao da polpa, considerada como rica nesse tipo de nutriente. Além disso, o conteúdo proteico e o teor de amido da casca foram maiores do que na polpa, assim como a concentração dos minerais Mg, P, Na, K e Ca.

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma das principais fruteiras das regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo seu fruto bastante consumido *in natura* ou industrializado. O mamão destaca-se por seu elevado valor nutricional, sendo rico em açúcares e compostos bioativos, como os carotenóides e a vitamina C. O Brasil é o segundo maior produtor mundial, sendo excelentes as condições de desenvolvimento da cultura do mamoeiro no país, pois há possibilidade de cultivo e de produção em todas as regiões, o ano inteiro<sup>9</sup>.

Os biscoitos são alimentos de consumo rápido, consumidos principalmente por crianças. Neste contexto, o enriquecimento deste tipo de alimento com farinhas de cascas de frutas pode ser uma alternativa para a prática de aproveitamento de resíduos de frutas e, além disso, melhorar o valor nutricional de um alimento consumido por uma parcela importante da população, desenvolvendo assim, um alimento com características mais saudáveis.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi determinar a composição proximal e mineral de biscoitos do tipo amanteigado elaborados de forma caseira e enriquecidos com farinha da casca de banana nanica (*Musa paradisiaca*), manga (*Mangifera indica* L.) variedade Tommy Atkins e mamão (*Carica papaya* L.) variedade formosa, maduros.

## MATERIAL E MÉTODOS

As bananas nanicas (*Musa paradisiaca*), mangas (*Mangifera indica* L.) da variedade Tommy Atkins e mamões (*Carica papaya* L.) da variedade formosa foram adquiridos em supermercado de Cuiabá, Mato Grosso. As frutas foram lavadas em água corrente para retirada das sujidades, imersas em solução de hipoclorito de sódio 5 % (v:v) por cerca de cinco minutos e, em seguida lavadas, novamente em água corrente. Posteriormente, as cascas foram retiradas manualmente com auxílio de descascador previamente higienizado.

As cascas foram acomodadas em assadeiras e secas em forno convencional a 120-140 °C por cerca de 30 minutos, com posterior trituração em liquidificador, peneiramento e armazenamento em local seco e arejado em recipientes plásticos descontaminados.

Os ingredientes utilizados para o preparo dos biscoitos do tipo amanteigado enriquecidos com as farinhas das cascas de frutas e o biscoito referência (apenas com farinha de trigo), bem como, suas respectivas quantidades estão descritos na Tabela 1.

A massa dos biscoitos foi processada manualmente da seguinte forma: formou-se um creme homogêneo com margarina e ovos. Em seguida, foram misturados os ingredientes

secos e a massa foi sovada até a obtenção de uma massa contínua. Posteriormente, a mesma foi moldada e os biscoitos foram assados a 140 °C por 20 minutos em forno convencional. Estes foram resfriados à temperatura ambiente e acondicionados em sacos de polipropileno e em vidros hermeticamente fechados para posterior análise da composição proximal e mineral.

Antes das análises, dez unidades de cada tipo de biscoito foram escolhidas aleatoriamente e trituradas em liquidificador doméstico por aproximadamente um minuto. Em seguida, as amostras trituradas foram quarteadas, reduzidas a amostras laboratoriais e armazenadas em recipientes de plástico previamente descontaminados e mantidos em local arejado e seco.

O teor de cinzas foi determinado por meio do resíduo de incineração obtido por aquecimento em forno mufla (Marca Fornitec®) em temperatura de 550 °C (Método Oficial nº 923.03<sup>10</sup>), e a umidade pelo método gravimétrico por meio da secagem em estufa (Marca FANEM® 520 Modelo A-HT) a 100 °C à pressão atmosférica (Método Oficial nº 925.09<sup>10</sup>). O teor de proteínas foi determinado por meio do método de Kjeldahl (Marca TECNAL® modelo TE-0363, Método Oficial nº 950.36<sup>10</sup>).

A porcentagem de fibras solúveis e insolúveis foi feita pelo método gravimétrico enzimático (Método Oficial nº 991.43<sup>10</sup>) e o teor de lipídeos foi feito pelo método gravimétrico com extração em Soxhlet (Marca MARCONI® Modelo MA044/8/50, Método Oficial nº 920.39 C<sup>10</sup>).

Todas as determinações foram feitas em triplicata, segundo as recomendações da *Official Association of Analytical Chemists* (AOAC)<sup>10</sup>.

O teor de carboidratos digeríveis foi obtido por diferença [Carboidratos digeríveis = 100 - (proteínas + cinzas + umidade + lipídeos + fibras alimentares)] segundo Lacerda et al<sup>11</sup>, e, o valor energético total (VET) estimado pelos fatores de conversão de Atwater [VET = (proteínas x 4) + (cinzas x 4) + (gordura x 9)]<sup>12</sup>.

A fim de verificar a existência de diferenças significativas entre os resultados médios obtidos na composição proximal foi feito o teste

**Tabela 1.** Ingredientes e quantidades utilizadas na elaboração dos biscoitos amanteigados referência e enriquecidos com farinhas da casca de banana, manga e mamão

Ingredientes	Tipo de formulação			
	R	A	B	C
Manteiga (g)	48,0	48,0	48,0	48,0
Açúcar Refinado (g)	40,0	40,0	40,0	40,0
Ovo (unidade)	1,0	1,0	1,0	1,0
Farinha de trigo comercial (g)	75,00	71,25	71,25	67,50
FCB <sup>1</sup> (g)	-	3,75	-	-
FCM <sup>2</sup> (g)	-	-	3,75	-
FCMA <sup>3</sup> (g)	-	-	-	7,50

<sup>1</sup>Farinha da casca de banana; <sup>2</sup>Farinha da casca de manga; <sup>3</sup>Farinha da casca de mamão ; R= biscoito referência; A= biscoito com 5 % de farinha de casca de banana; B= biscoito com 5 % de farinha de casca de manga; C= biscoito com 10 % de farinha de casca de mamão

de Tukey ( $p = 0,05$ ) utilizando o programa ASSISTAT® versão beta 7.7<sup>13</sup>.

O preparo das amostras para a determinação da composição mineral foi feito por meio da decomposição por via seca que consistiu inicialmente da secagem das amostras laboratoriais em estufa numa temperatura de 110 °C por 2 horas. Em seguida, as amostras foram trituradas por meio de almofariz e pistilo. Posteriormente, 2,5 g de amostra foram pesadas em cadinhos de porcelana pré-tratados e, as amostras foram calcinadas em forno mufla o qual a temperatura foi elevada gradativamente a cada 30 minutos em 100 °C até a temperatura de 550 °C, permanecendo assim por aproximadamente 8 horas. As cinzas foram transferidas para dessecador e esfriadas até temperatura ambiente. Após isso, as amostras calcinadas passaram por filtração e diluição em solução de 1:1 (v:v) de ácido nítrico, e transferidas quantitativamente para balão volumétrico de 25 mL, que teve o volume completado com água deionizada até a marca de aferição<sup>14</sup>.

A quantificação dos minerais foi feita em um espectrômetro de absorção atômica em chama marca Varian® modelo SpectrAA 220 e lâmpada de catodo oco marca Varian®. As leituras foram feitas de acordo com as recomendações do fabricante e taxa de aspiração das soluções de trabalho e amostras

foram ajustadas em 2,00 mL.min<sup>-1</sup>.

Para a determinação dos parâmetros instrumentais e da concentração dos minerais nas amostras de biscoitos foram construídas curvas analíticas, pelo método de padronização externa, com as seguintes faixas de concentração: 0,0 - 100 mg.L<sup>-1</sup> de Na; 0,0 - 6,0 mg.L<sup>-1</sup> de K; 0,0 - 10,0 mg.L<sup>-1</sup> de Fe; 0,0 - 5,0 mg.L<sup>-1</sup> de Cu; 0,0 - 3,0 mg.L<sup>-1</sup> de Zn; 0,0 - 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de Mn.

A fim de verificar a existência de diferenças significativas entre os resultados médios obtidos na composição mineral foi feito o teste de Tukey ( $p = 0,05$ ) utilizando o programa ASSISTAT® versão beta 7.7<sup>13</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da composição proximal do biscoito referência e dos enriquecidos com farinhas da casca de banana, manga e mamão são apresentados na Tabela 2.

Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os teores de umidade nos quatro tipos de biscoitos preparados e todas as formulações apresentaram teor de umidade em conformidade com a Resolução nº 12 de 1978 da ANVISA<sup>15</sup> onde o percentual máximo permitido é de 14 %. A umidade é um dos fatores mais importantes que afetam os alimentos, pois tem efeito direto na manutenção da qualidade. O baixo teor de umidade contribui

**Tabela 2.** Composição proximal dos biscoitos do tipo amanteigado (valor médio  $\pm$  desvio padrão)

Parâmetros	Tipo de biscoito			
	R	A	B	C
Umidade (%)	11,17 <sup>a</sup> $\pm$ 0,53	11,37 <sup>a</sup> $\pm$ 0,68	10,36 <sup>a</sup> $\pm$ 0,35	11,00 <sup>a</sup> $\pm$ 0,77
Cinzas (%)	0,67 <sup>b</sup> $\pm$ 0,01	0,80 <sup>a</sup> $\pm$ 0,04	0,74 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,05	0,81 <sup>a</sup> $\pm$ 0,02
Proteínas (%)	7,31 <sup>a</sup> $\pm$ 0,13	6,98 <sup>bc</sup> $\pm$ 0,16	7,20 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,10	6,75 <sup>c</sup> $\pm$ 0,07
Lipídeos (%)	19,56 <sup>c</sup> $\pm$ 0,07	21,40 <sup>b</sup> $\pm$ 0,06	22,41 <sup>a</sup> $\pm$ 0,38	21,14 <sup>b</sup> $\pm$ 0,05
Fibra Alimentar Insolúvel (%)	3,74 <sup>a</sup> $\pm$ 0,05	2,61 <sup>b</sup> $\pm$ 0,05	1,92 <sup>c</sup> $\pm$ 0,07	1,69 <sup>c</sup> $\pm$ 0,06
Fibra Alimentar Solúvel (%)	3,13 <sup>c</sup> $\pm$ 0,07	3,25 <sup>c</sup> $\pm$ 0,05	5,19 <sup>a</sup> $\pm$ 0,07	3,55 <sup>b</sup> $\pm$ 0,05
Carboidratos totais (%)	54,42	53,59	52,19	55,07
Valor energético total (kcal/100 g)	422,96	434,88	439,25	437,54

R= biscoito referência; A= biscoito com 5 % de farinha de casca de banana; B= biscoito com 5 % de farinha de casca de manga; C= biscoito com 10 % de farinha de casca de mamão; Letras iguais na mesma linha indicam não haver diferença significativa entre os resultados, para Teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade

para uma maior conservação do produto, aumentando o tempo de vida útil, uma vez que reduz a água disponível para a proliferação dos microrganismos e para as reações químicas<sup>16</sup>.

Os teores de cinzas para todas as formulações estão de acordo com a Resolução nº12 de 1978 da ANVISA<sup>15</sup>, onde o valor máximo permitido é de 3 %. Os biscoitos enriquecidos não apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) em relação aos teores de cinzas. Os biscoitos enriquecidos com farinha de casca de banana e mamão apresentaram os maiores teores de cinzas e, apresentaram diferenças significativas em relação à referência ( $p \leq 0,05$ ), sugerindo um maior conteúdo mineral devido à adição das farinhas das cascas das frutas. Fasolin et al<sup>17</sup> observaram o mesmo comportamento em biscoitos do tipo cookies enriquecidos com farinha de banana verde.

Para as proteínas, os biscoitos enriquecidos com as farinhas da casca de banana e mamão apresentaram teores significativamente ( $p \leq 0,05$ ) inferiores ao do biscoito padrão. Segundo a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO)<sup>18</sup>, para biscoito doce de maisena, o que mais se aproxima ao deste trabalho, o teor médio de proteínas descrito é de 8,1 g/100 g de parte comestível. Sendo assim, os valores obtidos neste estudo estão próximos ao teor proteico médio descrito pela TACO. Fasolin et al<sup>17</sup> encontraram em biscoitos tipo cookies enriquecidos com farinha de banana verde um teor médio de proteínas de 7,17 %, valor próximo aos quantificados para os biscoitos tipo amanteigado enriquecidos com as farinhas da casca de frutas avaliados neste trabalho.

Os teores de fibras alimentares insolúveis quantificados nos biscoitos enriquecidos foram inferiores ao biscoito padrão. Este fato pode ser atribuído a substituição da farinha de trigo, rica em fibras insolúveis, pelas farinhas das cascas de frutas que contém maior quantidade de fibras solúveis<sup>19</sup>.

No caso das fibras solúveis, os biscoitos enriquecidos com farinha da casca de manga e mamão apresentaram teores significativamente ( $p \leq 0,05$ ) superiores ao biscoito padrão, o que pode estar associado à quantidade destas fibras presentes nas cascas das frutas adicionadas na

elaboração dos biscoitos. Stock et al<sup>20</sup> verificaram que a manga e o mamão apresentam maiores teores de fibra bruta na casca (4,16 e 2,09 %) do que na polpa (1,60 e 1,00 %). Já na banana, o teor de fibra bruta é maior na polpa (2,00 %) do que na casca (1,00 %). As fibras solúveis tem muitos efeitos benéficos a saúde humana, podendo contribuir de forma significativa na prevenção de doenças, como, na diminuição de níveis de colesterol e triglicérides e redução de doenças coronárias<sup>19</sup>.

Para o teor de lipídeos, os biscoitos adicionados de farinha de casca de frutas apresentaram teores significativamente ( $p \leq 0,05$ ) superiores ao biscoito padrão.

Em relação aos teores de carboidratos, todos os biscoitos apresentaram teores inferiores ao teor médio descrito pela TACO<sup>18</sup> para biscoito doce de maisena (75,2 %).

A Tabela 3 apresenta o perfil mineral dos biscoitos amanteigados referência e dos enriquecidos com as farinhas das cascas de banana, manga e mamão.

Os resultados obtidos indicam que não há diferença significativa entre os teores médios de Zn, Mn, Mg e Na encontrados nos biscoitos enriquecidos e no de referência. Para o Fe o biscoito com farinha de casca de banana obteve ganho significativo se comparado com as outras amostras. O biscoito enriquecido com farinha de casca de mamão apresentou os maiores teores de Cu e K. Já para o mineral Ca, os biscoitos enriquecidos com as farinhas das cascas de banana e manga apresentaram maior concentração deste mineral do que o biscoito de referência.

Segundo a TACO<sup>18</sup>, a composição mineral média descrita para biscoito doce de maisena é de 54, 7,0, 0,78, 1,8, 352, 142, 0,17, 1,0 mg de Ca, Mg, Mn, Fe, Na, K, Cu e Zn/100 g de parte comestível, respectivamente. Alguns minerais analisados nos biscoitos enriquecidos com as farinhas de cascas de frutas possuem teores próximos aos valores sugeridos para este biscoito, como Zn e K. Já o Ca, Mg, Fe, Cu e Mn apresentaram valores inferiores ao sugerido para o biscoito tipo maisena. Estes resultados podem estar relacionados aos diferentes ingredientes

**Tabela 3.** Composição mineral em mg.100 g<sup>-1</sup> (valor médio ± desvio padrão) presentes nos biscoitos do tipo amanteigado avaliados neste trabalho

Minerais	Tipo de biscoito			
	R	A	B	C
Ferro	0,68 <sup>b</sup> ± 0,01	0,92 <sup>a</sup> ± 0,05	0,72 <sup>b</sup> ± 0,01	0,71 <sup>b</sup> ± 0,01
Zinco	0,55 <sup>a</sup> ± 0,02	0,56 <sup>a</sup> ± 0,02	0,62 <sup>a</sup> ± 0,03	0,60 <sup>a</sup> ± 0,07
Manganês	0,29 <sup>a</sup> ± 0,03	0,33 <sup>a</sup> ± 0,01	0,32 <sup>a</sup> ± 0,01	0,32 <sup>a</sup> ± 0,02
Cobre	0,07 <sup>b</sup> ± 0,00	0,06 <sup>c</sup> ± 0,00	0,08 <sup>b</sup> ± 0,00	0,09 <sup>a</sup> ± 0,00
Magnésio	16,61 <sup>a</sup> ± 0,09	16,77 <sup>a</sup> ± 1,44	18,11 <sup>a</sup> ± 6,19	16,54 <sup>a</sup> ± 0,25
Potássio	95,16 <sup>b</sup> ± 8,49	135,99 <sup>a</sup> ± 0,23	105,38 <sup>b</sup> ± 9,56	152,93 <sup>a</sup> ± 3,13
Cálcio	34,55 <sup>c</sup> ± 1,70	43,90 <sup>a</sup> ± 1,03	43,00 <sup>ab</sup> ± 3,27	35,68 <sup>bc</sup> ± 0,41
Sódio	174,36 <sup>a</sup> ± 7,76	179,61 <sup>a</sup> ± 0,96	172,88 <sup>a</sup> ± 15,72	178,38 <sup>a</sup> ± 1,73

R= biscoito referência; A= biscoito com 5 % de farinha de casca de banana; B= biscoito com 5 % de farinha de casca de manga; C= biscoito com 10 % de farinha de casca de mamão; Letras iguais na mesma linha indicam não haver diferença significativa entre os resultados, para Teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade

utilizados na elaboração dos dois tipos de biscoitos e ao enriquecimento mineral, principalmente de Ca e Fe, de alguns biscoitos industrializados.

Para o Na, os valores encontrados nos biscoitos enriquecidos estão abaixo do valor médio apresentado para o biscoito tipo maisena. Recentemente, o Ministério da Saúde e a Associação Brasileira dos Produtores de Alimentos Processados assinaram um documento para garantir a redução gradual de sódio em alimentos de aproximadamente 40 %<sup>21</sup>. Neste contexto, produtos alimentícios fontes de minerais e com baixo teor de sódio, como os biscoitos enriquecidos desenvolvidos neste trabalho, podem ser uma opção para pessoas que precisam aumentar a ingestão de minerais, sem o consumo excessivo de sódio.

A *Food Drug and Administration* (FDA) recomenda uma ingestão diária (RDA) para crianças entre quatro a oito anos (os maiores consumidores de biscoitos) de: 1000 mg de Ca, 440 µg de Cu, 10 mg de Fe, 130 mg de Mg, 1,5 mg de Mn, 5 mg de Zn, 3,8 g de K e 1,2 g de Na<sup>22</sup>. A Resolução RDC nº 269 da ANVISA, de 22 de setembro de 2005, que dispõe sobre o regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais indica uma ingestão diária para crianças

de quatro a seis anos de 600 mg de Ca, 6 mg de Fe, 73 mg de Mg, 5,1 mg de Zn, 440 µg de Cu, 1,5 mg de Mn<sup>23</sup>.

A Tabela 4 mostra a porcentagem em relação à ingestão diária recomendada pelo FDA e ANVISA de minerais para crianças presentes em 100 g de biscoitos amanteigados enriquecidos com as farinhas das cascas de banana, manga e mamão e no biscoito referência.

A Resolução RDC nº 54/2012, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária<sup>24</sup>, define “alimento fonte de vitaminas e minerais” como “aquele com no mínimo 15 % da Ingestão Diária Recomendada (IDR) de referência por 100 gramas do alimento” e “alimento com alto conteúdo em minerais e vitaminas” como “aquele que contém no mínimo 30 % da IDR de referência por 100 gramas do alimento”. Sendo assim, observa-se que para crianças de 4 a 6 anos, os biscoitos amanteigados enriquecidos com farinha da casca de banana podem ser considerados fontes de Fe, Mg e Mn. Já os biscoitos amanteigados enriquecidos com farinha da casca de manga e de mamão podem ser considerados fontes de Cu, Mg e Mn.

Neste contexto, os resultados obtidos sugerem que o consumo diário de biscoitos enriquecidos com farinhas das cascas de frutas elaborados de forma caseira pode contribuir para que os valores de ingestão diária recomendada

**Tabela 4.** Porcentagem da ingestão diária de minerais recomendadas pela ANVISA e FDA para crianças presentes em 100 g dos biscoitos amanteigados referência e dos enriquecidos com farinha de casca de frutas

Minerais	Porcentagem* (%) em relação à ingestão diária recomendada							
	ANVISA **				FDA***			
	R	A	B	C	R	A	B	C
Na	-	-	-	-	14,53	14,97	14,41	14,86
K	-	-	-	-	2,50	3,58	2,77	4,02
Ca	5,76	7,32	7,17	5,95	3,45	4,39	4,30	3,57
Cu	15,90	13,64	18,18	20,45	15,90	13,64	18,18	20,45
Fe	11,33	15,33	12,00	11,83	6,80	9,20	7,20	7,10
Mg	22,75	22,97	24,81	22,66	12,78	12,90	13,93	12,72
Mn	19,33	22,00	21,33	21,33	19,33	22,00	21,33	21,33
Zn	10,78	10,98	12,16	11,76	11,00	11,20	12,40	12,00

R= biscoito referência; A= biscoito com 5 % de farinha de casca de banana; B= biscoito com 5 % de farinha de casca de manga; C= biscoito com 10 % de farinha de casca de mamão; \*Porcentagem calculada em relação ao valor médio obtido na Tabela 3; \*\*Recomendações para crianças de 4 a 6 anos, referência<sup>20</sup>; \*\*\*Recomendações para criança de 4 a 8 anos, referência<sup>21</sup>

de minerais biodisponíveis ao organismo sejam atingidos.

No que se refere aos hábitos alimentares, à baixa ingestão de minerais é uma constante em nossa população em função, por exemplo, do baixo consumo de vegetais frescos, frutas, entre outros na dieta alimentar. Neste sentido, o desenvolvimento de novos produtos alimentícios que possuam minerais em sua composição natural, sem a necessidade da agregação destes nutrientes em sua produção de forma artificial, como é feito na maioria dos biscoitos comercializados, é de suma importância para a elaboração de alimentos mais saudáveis que atinjam todas as faixas etárias da população, em especial as crianças.

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos na composição proximal demonstraram que os teores de umidade e de proteínas não apresentaram diferenças significativas entre os biscoitos avaliados. A porcentagem de fibras alimentares solúveis nos biscoitos amanteigados enriquecidos com farinha da casca de manga e de mamão foram maiores do que a referência. Os teores

de lipídeos e o VET em todos os biscoitos enriquecidos foram maiores do que no biscoito referência, que pode ser atribuída a adição das farinhas das cascas de frutas. Todos os biscoitos enriquecidos apresentaram uma maior porcentagem de cinzas quando comparados ao biscoito referência, indicando um maior conteúdo mineral.

A composição mineral indicou que o biscoito enriquecido com farinha da casca de banana apresentou uma maior concentração de Fe e Ca em relação aos demais biscoitos avaliados. Já o biscoito enriquecido com farinha de casca de mamão apresentou maior teor de Cu e K. Todos os biscoitos enriquecidos apresentaram teor de sódio menor do que os valores médios apresentados pela TACO para biscoito tipo maisena utilizado para comparação.

Neste contexto, os biscoitos tipo amanteigados enriquecidos com farinhas das cascas de banana nanica, manga Tommy Atkins e mamão formosa podem ser uma alternativa simples, sustentável e de baixo custo para o uso de resíduos de frutas na fabricação caseira de produtos alimentícios com ganho nutricional principalmente em termos de conteúdo mineral.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao IFMT – Campus Cuiabá - Bela Vista pela disponibilização dos laboratórios. Ao Laboratório de Análises de Contaminantes Inorgânicos (LACI) do Departamento de Química da UFMT pelo uso dos equipamentos e reagentes na determinação de cinzas, umidade e minerais. A Faculdade de Nutrição (FANUT) da UFMT pela disponibilização dos equipamentos e reagentes para a determinação de fibras alimentares e lipídeos.

## REFERÊNCIAS

1. FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. A América Latina e o Caribe poderiam erradicar a fome somente com os alimentos que perdem e desperdiçam, 2014. [Acesso 2013 Dez 07]. Disponível em: [https://www.fao.org.br/ALCpefsapd.asp].
2. Abud AKS, Narain N. Incorporação da farinha de resíduo do processamento de polpa de fruta em biscoitos: uma alternativa de combate ao desperdício. *Braz J Food Technol*. 2009;12(4):257-65. [DOI: 10.4260/BJFT2009800900020].
3. Santos AC. Avaliação do uso da farinha de casca da manga Tommy Atkins na reologia da farinha de trigo e na aceitabilidade do pão de forma, 2013. [acesso 2014 Dez 05] Disponível em: [http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/1425/1/CM\_COALM\_2012\_2\_05.pdf].
4. Jesus SC, Folegatti MIS, Matsuura FCAU, Cardoso RL. Caracterização física e química de frutos de diferentes genótipos de bananeira. *Bragantia*. 2004;63(3):315-23. [DOI: 10.1590/S0006-87052004000300001].
5. Souza ME, Leonel S, Martins RL, Segtowick ECS. Caracterização físico-química e avaliação sensorial dos frutos de bananeira. *Nativa*. 2013;1(1):13-7. [DOI: 10.14583/2318-7670.v01n01a03].
6. Brandão MCC, Maia GA, Lima DP, Parente EJS, Campello CC, Nassu RT, et al. Análise físico química, microbiológica e sensorial de frutos de manga submetidos à desidratação osmótico solar. *Rev Bras de Frutic*. 2003;25(1):38-41. [DOI: 10.1590/S0100-29452003000100012].
7. FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Dados agrícolas de FAOSTAT – produção – cultivos primários – manga. [Acesso 2015 Mar 10]. Disponível em: [http://apps.fao.org].
8. Marques A, Chicayban G, Araujo MT, Manhães LRJ, Sabba-Srur AUO. Composição Centesimal e de Minerais de Casca e polpa de Manga (*Mangifera indica L.*) CV. Tommy Atkins. *Rev Bras Frutic*. 2010;32(4):1206-10. [DOI: 10.1590/S0100-29452010005000117].
9. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. Mamão: O produtor pergunta, a Embrapa responde, 2013. [Acesso 2014 Dez 07] Disponível em: [http://mais500p500r.sct.embrapa.br/view/publicacao.php?publicacaooid=90000024].
10. Association of Official Analytical Chemists - AOAC. Official methods of analysis. 19ª edição. Washington; 2012.
11. Lacerda DBCL, Soares JMS, Bassinello PZ, Siqueira BS, Koakuzu SN. Qualidade de biscoitos elaborados com farelo de arroz extrusado em substituição à farinha de trigo e fécula de mandioca. *Arch Latino Am Nutr*. 2009;59(2):199-205.
12. Atwater WO, Bryant AP. The availability and fuel value of food materials. *Storrs Agricultural Experimental Station 12th Annual Report for 1899*. Middletown; 1900. p. 73-110.
13. Assistat – Software Assistat. [Acesso 2014 Out 07]. Disponível em: [http://www.assistat.com/].
14. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - Brasil). Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4ª ed. [1a ed. digital]. Capítulo XXIII. Minerais e Contaminantes Inorgânicos. São Paulo (SP): Instituto Adolfo Lutz; 2008. Disponível em: [http://www.ial.sp.gov.br/resources/editorinplace/ial/2016\_3\_19/analisedealimentosial\_2008.pdf].
15. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução CNNPA nº 12 de 24 de Julho de 1978. Padrões de Identidade e Qualidade para Alimentos e Bebidas. *Diário Oficial [da] União*. Brasília, DF, 27 de jul 1978. [Acesso 2015 Set15] Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/resol/12\_78.pdf].

16. Mendes BAA. Obtenção, caracterização e aplicação de farinha das cascas de abacaxi e de manga, 2013. [acesso 2014 Dez 05] Disponível em: [[http://www.uesb.br/ppgengalimentos/dissertacoes/2013/Bruna\\_de\\_Andrade.pdf](http://www.uesb.br/ppgengalimentos/dissertacoes/2013/Bruna_de_Andrade.pdf)].
17. Fasolin LH, Almeida GC, Castanho PS, Netto-Oliveira ER. Biscoitos produzidos com farinha de banana: avaliações química, física e sensorial. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2007;27(3):524-9.
18. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO. 4ª edição revisada e ampliada. Campinas; 2011.
19. Dhingra D, Michael M, Rajput H, Patil RT. Dietary fiber in foods: a review. *J Food Sci Technol*. 2012;49(3):255-66. [DOI: 10.1007/s13197-011-0365-5].
20. Storck CR, Nunes GL, Oliveira BB, Basso C. Folhas, talos, cascas e sementes de vegetais: composição nutricional, aproveitamento na alimentação e análise sensorial de preparações. *Ciênc Rural*. 2013;43(3):537-43. [DOI:10.1590/S0103-84782013000300027].
21. Nitzke JA, Thys R, Martinelli S, Oliveras LY, Ruiz WA, Penna NG, et al. Segurança alimentar – retorno às origens?. *Braz J Food Technol*. 2012;IV SSA:2-10. [DOI: 10.1590/S1981-67232012005000044].
22. Food and Drug Administration – FDA. Guidance for Industry: A Food Labeling Guide (14. Appendix F: Calculate the Percent Daily Value for the Appropriate Nutrients), 2013. [acesso 2014 Dez 16] Disponível em: [<http://www.fda.gov/food/guidanceregulation/guidancedocumentsregulatoryinformation/labelingnutrition/ucm064928.htm>].
23. Brasil. Ministério da Saúde. Agência de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico sobre a ingestão diária de proteínas, vitaminas e minerais. *Diário Oficial [da] União, Brasília, DF*, 23 de set. 2005. [Acesso 2015 Fev 10] Disponível em: [[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/1884970047457811857dd53fbc4c6735/RDC\\_269\\_2005.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/1884970047457811857dd53fbc4c6735/RDC_269_2005.pdf?MOD=AJPERES)].
24. Brasil. Ministério da Saúde. Agência de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 54, de 12 de novembro de 2012. Regulamento técnico sobre informação nutricional complementar. *Diário Oficial [da] União, Brasília, DF*, 12 de dez. 2012. [Acesso 2015 28 Set] Disponível em: [[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0054\\_12\\_11\\_2012.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0054_12_11_2012.html)].

# Ocorrência de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* resistentes a antimicrobianos e parasitos *Entamoeba coli* e *Ascaris lumbricoides* em merendas escolares

## Occurrence of antibiotic-resistant *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* and of *Entamoeba coli* and *Ascaris lumbricoides* parasites in the school snacks

RIALA6/1674

Daiane Bertholin ANSELMO<sup>1\*</sup>, Catiere Hirsh WERLE<sup>2</sup>, Fernando Leite HOFFMANN<sup>1(In Memoriam)</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Engenharia e Ciência de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rua Cristóvão Colombo nº 2265, Jardim Nazareth, São José do Rio Preto/SP, CEP: 15054-000. Tel: 17 3221-2200. E-mail: daiane\_bertholin@hotmail.com

<sup>2</sup>Laboratório de Genética e Biologia Molecular, Departamento de Genética Evolução e Bioagentes, Universidade Estadual de Campinas

Recebido: 21.05.2015 - Aceito para publicação: 01.12.2015

### RESUMO

Vários surtos de doenças de origem alimentar têm sido relatados nas escolas, e que chegam a matar milhões de crianças a cada ano em todo o mundo. O objetivo deste estudo foi de avaliar o nível de contaminação microbiológica e parasitológica de refeições escolares. Foram avaliadas 102 amostras de diferentes tipos de alimentos, em que foram analisados: coliformes totais, termotolerantes, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* coagulase positiva (CP), *Bacillus cereus* e clostrídios sulfito redutores. Foram encontradas contagens > 1.100 NMP de coliformes totais e < 3 a 240 NMP de termotolerantes. Quatro amostras apresentaram *E. coli* e *Staphylococcus* (CP) foi isolado em duas em nível acima do permitido. No teste de sensibilidade a antimicrobianos, as cepas de *E. coli* e de *Staphylococcus* (CP) detectadas neste estudo demonstraram resistência, respectivamente, a ampicilina e penicilina. Na análise parasitológica dos alimentos crus foram pesquisados: *Entamoeba coli*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia duodenalis* e *Ascaris lumbricoides*. *Entamoeba coli* e *Ascaris lumbricoides* foram detectados na salada. A merenda escolar oferece riscos à saúde das crianças, o que indica a necessidade de melhoria nas condições de seu preparo e de implantação das Boas Práticas nas instituições de ensino.

**Palavras-chave.** higiene alimentar, alimentação escolar, segurança alimentar, doenças veiculadas por alimentos.

### ABSTRACT

Several outbreaks of food-borne diseases have been reported in schools, and these have been responsible for causing death of millions children per year worldwide. The objective of this study was to evaluate the rate of microbiological and parasitological contamination of school meals. This study evaluated 102 samples of different types of food by analyzing total coliforms, thermotolerant, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., coagulase-positive *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and sulfite-reducing clostridia. Total coliforms counts were > 1,100 MPN, and of < 3 a 240 MPN for thermotolerant. *E. coli* was isolated from four samples, and *S. aureus* was detected in two samples in a rate higher than the permitted one. By means of antimicrobial susceptibility testing, *E. coli* and *S. aureus* strains showed to be resistant to ampicillin and penicillin, respectively. In the parasitological analysis in raw foods, the following parasites were investigated: *Entamoeba coli*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia duodenalis* and *Ascaris lumbricoides*. *Entamoeba coli* and *Ascaris lumbricoides* were found in salad. The school meals offer risks to the children health; therefore, it has to improve the conditions of their preparation and to implement the Good Practices in the educational institutions.

**Keywords.** food hygiene, school meals, food security, food-borne diseases.

## INTRODUÇÃO

As Doenças Veiculadas por Alimentos (DVA) abrangem uma ampla variedade de doenças que se manifestam após a ingestão de alimentos contaminados, onde a verdadeira extensão do seu impacto na saúde global é imensa, mas ainda é desconhecida por muitos<sup>1</sup>.

Os alimentos fornecidos para a alimentação escolar, consumidos diariamente pelos alunos, são essenciais para a preservação da saúde, desde que apresentem condições de higiene satisfatórias. Seu controle inadequado é responsável pela ocorrência de surtos de doenças, provocadas principalmente pela ingestão de micro-organismos ou de suas toxinas, causando infecções ou intoxicações<sup>2</sup>.

De acordo com o Ministério da Saúde, de 2000 a 2014 foram notificados 9.719 surtos de DVA pela Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), afetando 1.948.144 pessoas, resultando em 192.803 doentes e mais de 112 óbitos no Brasil; sendo os micro-organismos mais ocorrentes *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. As informações ignoradas sobre o agente etiológico são de 52,3 %. Segundo a SVS, as creches/escolas ocupam o terceiro lugar em ocorrências de surtos<sup>3</sup>.

A prevalência de micro-organismos importantes como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* resistentes a vários antimicrobianos está aumentando, principalmente devido ao seu uso extensivo e indiscriminado. Isso representa um grande problema e ameaça para a saúde pública em muitos países, devido à persistência da circulação de cepas de bactérias resistentes no ambiente e a possível contaminação de água e alimentos, podendo tornar-se um meio pela qual estas bactérias patogênicas resistentes aos antimicrobianos são transmitidas para as pessoas, dificultando o tratamento<sup>4</sup>. Em termos de clínica e terapêutica, o teste de susceptibilidade aos antimicrobianos assume grande relevância para a saúde pública<sup>5</sup>.

Além das bactérias, outro grave problema de saúde pública no Brasil constitui as parasitoses intestinais, responsáveis por um terço da carga global de doença humana<sup>1</sup>. A ascaridíase, uma doença grave provocada pelo *Ascaris lumbricoides*,

acomete milhões de pessoas, especialmente crianças, tornando-as debilitadas, afetando-as física e intelectualmente. Sendo causa e consequência do subdesenvolvimento de um país ou de uma região<sup>6</sup>.

Para garantir alimentos seguros aos alunos, os serviços de alimentação precisam seguir criteriosamente as normas estabelecidas pela Vigilância Sanitária, pois as medidas de segurança tomadas durante as várias fases de preparação da alimentação escolar são ainda insuficientes<sup>7</sup>.

Assim, com a maior frequência de crianças nas escolas durante o período integral, realizando suas principais refeições neste local, a segurança alimentar é uma preocupação, pois é ameaçada principalmente devido a grandes quantidades de alimentos que são preparadas com antecedência nas instituições escolares, então se faz necessário uma investigação e acompanhamento da qualidade desses alimentos consumido pelos alunos em fase de desenvolvimento.

Neste estudo foi investigada a merenda escolar das escolas e creches de uma cidade do interior do estado de São Paulo - Brasil. A comida foi avaliada utilizando os seguintes parâmetros microbiológicos: coliformes totais, coliformes termotolerantes, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Bacillus cereus*, clostrídios sulfito redutores e parasitológicos: *Entamoeba coli*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia duodenalis*, *Ascaris lumbricoides* e *Taenia* spp.

Este estudo teve como principal objetivo avaliar o nível de contaminação microbiológica e parasitológica de refeições escolares. Sendo de suma importância epidemiológica em relação à saúde pública e cuidados higiênico-sanitários no preparo de tais refeições.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram obtidas amostras de merenda escolar da cozinha piloto e de seis escolas de ensino infantil e fundamental de uma cidade do interior do estado de São Paulo. A coleta das amostras foi realizada imediatamente após

o preparo e no momento em que chegaram nas creches e escolas, antes de serem servidas às crianças. As amostras foram coletadas em dias alternados da semana, para garantir uma avaliação completa do cardápio servido às crianças. Foram realizadas coletas nos meses de fevereiro, março, abril e novembro, sendo seis coletas nas duas creches e três coletas nas quatro escolas, totalizando 33 coletas e 102 amostras.

Estas amostras foram divididas nas categorias de arroz, feijão, produtos cárneos e saladas. E subdivididas em arroz branco (18 amostras); arroz + carne moída + macarrão + cenoura (cinco amostras); arroz + seleta de legumes (cinco amostras); galinhada (cinco amostras); feijão (18 amostras); carne de porco (três amostras); carne em pedaços com batata (três amostras); linguíça calabresa (três amostras); linguíça de frango assada (três amostras); frango assado (três amostras); linguíça de frango assado + tomate (três amostras); salada de repolho + cenoura (nove amostras); salada de alface (nove amostras); salada de tomate (dez amostras) e salada de repolho + tomate (cinco amostras).

Todas as amostras coletadas foram encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Estadual Paulista – UNESP – Campus de São José do Rio Preto, acondicionadas em recipiente isotérmico com gelo, e lá mantidas em geladeira até a análise. As merendas escolares foram avaliadas quanto à presença de coliformes totais, coliformes termotolerantes, *Escherichia coli*<sup>8</sup>, *Staphylococcus aureus*<sup>9</sup> *Salmonella* spp.<sup>10</sup>, *Bacillus cereus*<sup>11</sup> e clostrídios sulfito redutores<sup>12</sup>. As análises foram realizadas no mesmo dia da coleta. As cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* isoladas foram submetidas ao teste de susceptibilidade antimicrobiana<sup>13-15</sup>. E nos alimentos crus foram realizadas análises parasitológicas<sup>16,17</sup>.

## RESULTADOS

As contagens de coliformes totais variaram de 3,6 a 1.100 NMP/g. Das 102 amostras avaliadas, 17 (16,7 %) apresentaram contagem

igual ou superior a 1.100 UFC/g, dentre estas estão: arroz + seleta de legumes (Escola C), salada de repolho + tomate (Escola A e Escola V), salada de tomate (Cozinha Piloto, Escola A e Escola O), salada de repolho + cenoura (Cozinha Piloto e Creche I) e salada de alface (Cozinha Piloto, Creche I e Creche D). A maior contagem de bactérias foi obtida nas saladas, observaram-se menores contagens de bactérias nas saladas das escolas e creches em comparação com a cozinha piloto.

Coliformes termotolerantes foram detectados em 15 (14,7 %) amostras, sendo que apenas uma amostra (1 %) não atendeu aos padrões recomendados pela ANVISA<sup>18</sup>. Destas 15 amostras, três (20 %) confirmaram presença de *E. coli* (Cozinha e Creche I), como mostra a Tabela 1, não atendendo aos padrões estabelecidos<sup>18</sup>.

*Staphylococcus aureus* foi detectado em sete (10,1 %) amostras (Galinhada da Cozinha Piloto e Escolas; Arroz da Cozinha Piloto e Creche I), sendo que apenas duas (2,9 %) ultrapassaram o padrão recomendado pela ANVISA<sup>18</sup> (Cozinha e Creche I) como mostra a Tabela 2. Também foi detectado *Staphylococcus* coagulase negativa em 18 (26,1 %) amostras, com contagens de  $0,5 \times 10^2$  a  $1,8 \times 10^5$  UFC/g, dentre estas estão: Arroz + carne moída + macarrão + cenoura (Escola C); Arroz + seleta de legumes (Cozinha Piloto e escolas); Arroz (Cozinha Piloto, Creche D e Creche I); Feijão (Cozinha Piloto, Creche D e Creche I); Linguíça calabresa (Creche D e Creche I) e Frango Assado (Creche D).

Foram pesquisadas 102 amostras de alimentos para presença de *Salmonella* spp., estando todas estas de acordo com o padrão estabelecido<sup>18</sup>.

Para a análise de clostrídios sulfito redutores, todas as amostras apresentaram contagens <10 UFC/g, atendendo aos padrões estabelecidos pela legislação brasileira<sup>18</sup>.

Todas as 69 (100 %) amostras analisadas para *Bacillus cereus* estavam dentro dos padrões estabelecidos pela legislação<sup>18</sup>, porém uma (1,4 %) amostra de arroz da Creche D apresentou contagem de  $2 \times 10^2$  UFC/g.

**Tabela 1.** Resultados obtidos após pesquisa de *Escherichia coli* na Cozinha piloto, Creche D, Creche I, Escola C, Escola O e Escola V

Amostras	Local	Coliformes termotolerantes	<i>E. coli</i>
Repolho com cenoura	Cozinha piloto	20 NMP/g	Ausente
Salada de alface	Cozinha piloto	23 NMP/g	<b>Presente</b>
Repolho com cenoura	Cozinha piloto	28 NMP/g	Ausente
Salada de alface	Cozinha piloto	9,2 NMP/g	Ausente
Salada de alface	Creche D	15 NMP/g	Ausente
Salada de alface	Creche D	3,6 NMP/g	Ausente
Repolho com cenoura	Creche I	3,6 NMP/g	Ausente
Salada de alface	Creche I	3,6 NMP/g	<b>Presente</b>
Repolho com cenoura	Creche I	240 NMP/g	<b>Presente</b>
Salada de alface	Creche I	9,2 NMP/g	Ausente
Arroz+carne moída+macarrão+cenoura	Escola C	9,2 NMP/g	Ausente
Arroz+carne moída+macarrão+cenoura	Escola O	9,2 NMP/g	Ausente
Salada de tomate	Escola O	21 NMP/g	Ausente
Arroz+carne moída+macarrão+cenoura	Escola V	3,6 NMP/g	Ausente
Salada de tomate	Escola A	3,6 NMP/g	Ausente
<b>Padrão Federal Brasil 2001</b>		<b>10<sup>2</sup> NMP/g</b>	<b>Ausência</b>

NMP= técnica de número mais provável

**Tabela 2.** Resultados obtidos da contagem de *Staphylococcus* spp. (UFC/g) na Cozinha piloto, Creche D e Creche I

Amostras	Locais		
	Cozinha Piloto	Creche D	Creche I
<b>Coleta dia 26/02/2013</b>			
Arroz	< 100	1,5 x 10 <sup>2</sup> (-)	< 100
Feijão	< 100	< 100	< 100
Carne de porco	< 100	< 100	< 100
<b>Coleta dia 05/03/2013</b>			
Arroz	< 100	< 100	1 x 10 <sup>2</sup> (-)
Feijão	< 100	< 100	< 100
Carne com batata	< 100	< 100	< 100
<b>Coleta dia 12/03/2013</b>			
Arroz	0,5 x 10 <sup>2</sup> (-)	3 x 10 <sup>2</sup> (-)	1 x 10 <sup>2</sup> (-)
Feijão	0,5 x 10 <sup>2</sup> (-)	1 x 10 <sup>2</sup> (-)	3 x 10 <sup>2</sup> (-)
Linguiça calabresa	< 100	1 x 10 <sup>2</sup> (-)	1,5 x 10 <sup>2</sup> (-)
<b>Coleta dia 26/03/2013</b>			
Arroz	< 100	< 100	< 100
Feijão	< 100	< 100	< 100
Linguiça de frango	< 100	< 100	< 100
<b>Coleta dia 03/04/2013</b>			
Arroz	< 100	1,9 x 10 <sup>4</sup> (-)	< 100
Feijão	< 100	< 100	< 100
Frango assado	< 100	4 x 10 <sup>4</sup> (-)	< 100
<b>Coleta dia 12/11/2013</b>			
Arroz	<b>6 x 10<sup>3</sup> (+)</b>	< 100	<b>5 x 10<sup>3</sup> (+)</b>
Feijão	< 100	< 100	< 100
Linguiça de frango	< 100	< 100	< 100
<b>Padrão Federal Brasil 2001</b>	<b>10<sup>3</sup> UFC/g para <i>Staphylococcus aureus</i></b>		

Já nas análises parasitológicas, o cisto de *Entamoeba coli* estava presente na salada de alface da Creche D e ovo de *Ascaris lumbricoides* (não larvado, não havendo risco de infecção) na salada de repolho com cenoura da Creche I, como mostra a Tabela 3.

Para os testes de sensibilidade aos antimicrobianos das três cepas de *Escherichia coli*

testadas, duas (66,7 %) foram sensíveis a todos antimicrobianos e uma (33,3 %) foi resistente a um antimicrobiano, a ampicilina. Já para *Staphylococcus aureus*, todas as sete cepas (100 %) analisadas foram resistentes a um antimicrobiano, a penicilina, o restante dos antimicrobianos testados foram eficazes para 100% das cepas testadas.

**Tabela 3.** Resultados de análises parasitológicas das saladas da cozinha piloto, Creche D, Creche I, Escola V, Escola C, Escola O e Escola A

Amostra/Data	Local	Resultado
Repolho com cenoura 26/02/2013	Cozinha piloto	Ausente
	Creche D	Ausente
	Creche I	Ausente
Salada de alface 05/03/2013	Cozinha piloto	Ausente
	Creche D	Cisto de <i>Entamoeba coli</i>
	Creche I	Ausente
Salada de alface 12/03/2013	Cozinha piloto	Ausente
	Creche D	Ausente
	Creche I	Ausente
Repolho com cenoura 26/03/2013	Cozinha piloto	Ausente
	Creche D	Ausente
	Creche I	Ovo de <i>Ascaris lumbricoides</i> *
Repolho com cenoura 03/04/2013	Cozinha piloto	Ausente
	Creche D	Ausente
	Creche I	Ausente
Salada de tomate 09/04/2013	Cozinha piloto	Ausente
	Escola V	Ausente
	Escola C	Ausente
	Escola O	Ausente
Repolho com tomate 18/04/2013	Escola A	Ausente
	Cozinha piloto	Ausente
	Escola V	Ausente
	Escola C	Ausente
Salada de tomate 05/11/2013	Escola O	Ausente
	Escola A	Ausente
	Cozinha piloto	Ausente
	Escola V	Ausente
Salada de alface 12/11/2013	Escola C	Ausente
	Escola O	Ausente
	Escola A	Ausente
Salada de alface 12/11/2013	Cozinha piloto	Ausente
	Creche D	Ausente
	Creche I	Ausente

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

As altas contagens de coliformes totais demonstram uma deficiência das condições higiênicas da Cozinha Piloto, Escola C, Escola A, Escola V, Escola O, Creche I e Creche D. A maior contagem de coliformes totais nas saladas pode ser explicada por ser um alimento cru, que tem a contaminação facilitada devido ao contato direto com o solo ou até mesmo causado pela falta de higiene do manipulador. Acredita-se que as menores contagens de bactérias observadas nas saladas das escolas em comparação com a cozinha piloto, seja devido ao vinagre usado nas escolas para temperar as saladas, como mostra o estudo de Sengun e Karapinar<sup>19</sup> que concluíram que o vinagre causa uma redução significativa da carga microbiana presente no alimento. No período de 1996 a 2004, a Administração de Alimentos e Drogas (FDA) respondeu a 14 surtos de doenças transmitidas por alimentos, nos quais alfaces ou tomates foram confirmados como a fonte de infecção, sendo associados a 859 casos da doença relatados. Em 2011, o Comitê Consultivo para a Segurança Microbiológica de Alimentos (ACMSF) informou que no Reino Unido houve 531 casos de morbidade devido o consumo de frutas e vegetais, incluindo um óbito<sup>20</sup>.

A presença de coliformes termotolerantes pode ser explicada pela falha na higienização das mãos dos manipuladores, resultando em uma contaminação cruzada. Da mesma forma Santana et al<sup>7</sup> encontraram coliformes termotolerantes nas saladas de alface com cenoura e tomate da merenda escolar de escolas públicas de Salvador - Brasil. Sospedra et al<sup>21</sup> também coletaram várias amostras de alimentos, onde seus resultados mostraram que as amostras de alface e tomate foram os vegetais que mais apresentaram contaminação por enterobactérias, estando estes micro-organismos em menor quantidade no arroz (13 %). De acordo com os autores, as falhas de higiene na manipulação de alimentos têm contribuído para a contaminação dos alimentos, o que poderá causar surtos de toxinfecção alimentar, sendo estes ainda mais graves se causados pela *E. coli* que pode estar presente. Neste estudo, três (20 %) amostras

foram confirmadas para presença de *E. coli* como mostra a Tabela 1, não atendendo aos padrões estabelecidos, que estipulam ausência deste micro-organismo, considerado como um grande indicador de contaminação fecal. Os sintomas da doença incluem cólicas abdominais e diarreia, que podem ser de sangue. Febre e vômitos também podem ocorrer. A maioria dos pacientes se recupera dentro de dez dias, embora em alguns casos a doença pode tornar-se fatal. Os riscos desta doença são maiores em idosos e em crianças menores de cinco anos de idade<sup>2</sup>. Da mesma forma, Sospedra et al<sup>21</sup> também encontraram *E. coli* em 6,6 % amostras de alface. Em 2006, nos Estados Unidos, houve um surto de *E. coli* O157:H7 devido ao espinafre contaminado, envolvendo 276 casos e três mortes foram relatadas. Em maio de 2011 na Alemanha, foi relatado um surto de *E. coli* produtor de toxina Shiga (STEC), o sorotipo O104:H4. No final do surto, 3.785 casos da doença e 45 mortes foram relatados na Alemanha. Outras doenças e mortes referidas a este surto foram relatadas fora da Alemanha, onde mais tarde foi descoberto que os veículos do surto foram brotos de feijão<sup>20</sup>. De acordo com a legislação, esses alimentos contaminados com *E. coli* são impróprios para o consumo. No entanto estes estão sendo ingeridos por crianças diariamente, podendo causar graves doenças. Esses resultados sugerem um maior cuidado na aquisição da matéria-prima utilizada e principalmente em sua manipulação.

Os resultados apresentados na Tabela 2 podem ter sido ocasionados devido a uma contaminação cruzada, resultante da má higiene e manipulação do manipulador, pois o contato direto das mãos ou recipientes contaminados pode ser suficiente para transferir para o alimento uma quantidade de bactérias suficiente até mesmo para causar doença. O principal reservatório de *Staphylococcus aureus* em seres humanos são as narinas, embora também possa ser encontrada nas mãos, no entanto esta é a causa da maioria dos surtos de intoxicação alimentar, tendo como principais agravantes a produção de toxinas e resistência antimicrobiana<sup>22</sup>. Já para *Staphylococcus coagulase negativa*, a ANVISA não possui padrões

de contagem, porém temos que evitar sua presença, pois estudos realizados por Freitas et al<sup>23</sup> detectaram a presença de genes toxigênicos de *Staphylococcus* spp. isolados de queijo de coalho, o que nos mostra que a ocorrência de vários genes toxigênicos em amostras de *Staphylococcus* coagulase negativa é um fato importante e preocupante. Ryu et al<sup>24</sup>, ao analisarem amostras de alimentos servidos em escolas não encontraram este micro-organismo em nenhuma das amostras investigadas. Por outro lado, Kotzekidou<sup>25</sup> encontrou *Staphylococcus aureus* em 12,5 % das sobremesas com creme de leite e em 11 % dos sanduíches de cantinas universitárias, resultado semelhante a este estudo. Assim como foi encontrado *Staphylococcus aureus* nas amostras de arroz nesta pesquisa, Santana et al<sup>7</sup>, investigando refeições servidas em escolas, mostraram que o arroz e as almôndegas também estavam contaminados por *Staphylococcus aureus*, apresentando contagens maiores do que os padrões estabelecidos pela ANVISA<sup>18</sup>. O *S. aureus* é a terceira causa mais importante de DVA no mundo, tendo como seus principais agravantes a produção de toxinas e resistência antimicrobiana<sup>22</sup>.

Quanto a pesquisa de *Salmonella* spp., os alimentos estavam dentro dos padrões higiênico-sanitários adequados, devido à ausência deste micro-organismo em todas as amostras. Estes resultados foram semelhantes a estudos realizados por Oliveira et al<sup>26</sup> em alimentos servidos em escolas públicas de Porto Alegre. No entanto, Duarte et al<sup>27</sup> encontraram amostras positivas para *Salmonella* spp. em 9,6 % de carcaças de frango, onde a *Salmonella* Enteritidis foi o sorotipo mais frequente. Faustino et al<sup>28</sup>, realizaram pesquisas em alimentos suspeitos de DVA, onde 30,7% das amostras foram condenadas devido a presença de *Salmonella* spp. em mousse de clara de ovos e bolo de chocolate. Em avaliações realizadas no restaurante e na cantina de uma universidade, das 343 amostras analisadas, Kotzekidou<sup>29</sup> encontrou apenas uma (0,3 %) positiva para *Salmonella* spp. em torta congelada. A ausência de *Salmonella* spp. é importante, pois este micro-organismo é uma das principais causas de hospitalização e morte, bem como gastrinterite, principalmente por

se tornarem cada vez mais resistentes aos antimicrobianos clinicamente importantes<sup>30</sup>.

Apesar de apenas uma (1,4 %) amostra apresentar contagem de  $2 \times 10^2$  UFC/g para *Bacillus cereus* e esta não ultrapassar os padrões estabelecidos, sua presença deve ser evitada, pois estudos realizados por Chaves et al<sup>31</sup>, sobre diversidade genética, em relação ao perfil toxigênico de *Bacillus cereus* isolados de alimentos, sugerem que a maioria das estirpes presentes em vários tipos de alimentos no Brasil representa um risco potencial de provocar intoxicação alimentar, devido à elevada prevalência dos genes de toxinas encontrados nestas estirpes. Aragon-Alegro et al<sup>32</sup>, também confirmaram que todas as cepas de *Bacillus cereus* investigadas em alimentos no Brasil, apresentaram capacidade toxigênica podendo representar um risco para os consumidores se as boas práticas não forem seguidas. Em pesquisas realizadas por Kotzekidou<sup>25</sup>, foi encontrada a bactéria patogênica *B. cereus* em 31,8 % dos bolos congelados vendidos em cantinas universitárias. Ryu et al<sup>24</sup> também encontraram *Bacillus cereus* em uma amostra de alimento servida em uma escola da Coréia do Sul. *Bacillus cereus* foi o agente mais identificado, 41,2 % dos 80 surtos de DVA ocorridos no Distrito Federal<sup>33</sup>.

Para análise de clostrídios sulfito redutores, foram pesquisadas amostras a base de carne, que apresentaram contagens  $< 10$  UFC/g do micro-organismo, sendo os mesmos resultados encontrados por Vieira et al<sup>34</sup>, que avaliaram a qualidade microbiológica de preparações a base de carne servidas em nove escolas de Poços de Caldas, MG. Já um surto investigado por Dailey et al<sup>35</sup> ocorrido na Carolina do Norte, foi confirmado por eio de amostras de fezes dos participantes de uma conferência, que *Clostridium perfringens* foi a causa do surto, onde os participantes referiram que o frango servido estava mal cozido. Daelman et al<sup>36</sup> realizaram análises nos alimentos de uma empresa para gestão da segurança alimentar da mesma e detectaram a presença de clostrídios sulfito redutores em 1,94 % das 258 amostras analisadas.

Pelos resultados apresentados na Tabela 3,

as formas evolutivas de parasitos nas saladas apresenta uma necessidade de melhoria na higienização das mesmas e também das mãos dos manipuladores que podem ser um veículo de transmissão, para assim evitar a contaminação às crianças. Peres Junior et al<sup>37</sup>, avaliando amostras de alface de dez restaurantes, também detectaram a presença de enteroparasitos em amostras de dois restaurantes (20 %), sendo encontrados a ameba *Endolimax nana* e o ciliado *Balantidium coli*. Este estudo indica que a via de infecção por saladas desempenha um papel importante na transmissão de parasitas.

Fracassos em tratamentos devido à resistência aos antimicrobianos aumentam o custo do tratamento e causam morbidade por mais tempo aos pacientes, sendo um grande desafio, a busca de estratégias para a cura, que representa um grande problema e ameaça para a saúde pública. Edward e Chikwem<sup>38</sup> também detectaram amostras (100 %) de *E. coli* isoladas de saladas resistentes à amoxicilina. Todos os isolados de *E. coli* foram sensíveis a ofloxacina (100 %). A porcentagem de sensibilidade no caso da gentamicina foi de 96,7 %, ác. nalidíxico 90 %, nitrofurantoína 80 %, cotrimoxazol 50 % e tetraciclina 6,7 %. Ao contrário de resultados encontrados por Furlaneto-Maia et al<sup>39</sup>, onde não houve isolados de *E. coli* resistentes à ampicilina em amostras de sanduíches. Já o oposto deste estudo, em uma pesquisa sobre a caracterização de *S. aureus* em alimentos infantis como cereal de arroz e leite em pó, Wang et al<sup>40</sup> encontraram 54 cepas resistentes a eritromicina (75,9 %), ciprofloxacina (51,9 %) e trimetoprim/sulfametoxazol (27,8 %), gentamicina (22,2 %), tetraciclina (18,5 %) e cefoxitina (3,7 %). Já iguais a este estudo, todos *S. aureus* isolados por Wang et al<sup>40</sup> foram sensíveis à oxacilina e cloranfenicol. Guimarães et al<sup>5</sup> ao investigarem o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de cepas de *Staphylococcus coagulase positiva* em amostras de queijo de coalho, mostraram que nitrofurantoína, tetraciclina, cloranfenicol e sulfametoxazol-trimetoprim foram eficazes, iguais aos resultados obtidos neste estudo; no entanto, verificou-se resistência a gentamicina, oxacilina (13,3 %) e a

eritromicina (26,7 %).

Nesta pesquisa, as cepas analisadas apresentam-se sensíveis a maioria dos antimicrobianos testados. No entanto, o grande desenvolvimento de resistência relatado em vários estudos, estabelece uma grande preocupação em relação à saúde pública, reduzindo a quantidade de antimicrobianos eficazes nos tratamentos, destacando a importância do uso adequado dos antimicrobianos, evitando a veiculação de espécimes multirresistentes.

Por fim, os dados aqui apresentados mostram a necessidade de um melhor aperfeiçoamento nas condições de preparo dos alimentos, devido à alta prevalência de coliformes, a detecção das bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* resistentes à ampicilina e penicilina respectivamente, e de parasitos que indicam condições higiênicas inadequadas. A contaminação detectada pode ocasionar sérias doenças às crianças, além de diminuir os recursos de antimicrobianos que poderão ser utilizados em tratamentos. Recomenda-se a adoção de medidas higiênico-sanitárias e capacitação dos manipuladores de alimentos para garantir alimentos seguros e de qualidade às crianças envolvidas e evitar possíveis surtos.

---

## AGRADECIMENTOS

A CAPES e CNPQ pelo apoio financeiro, a prefeitura, secretaria de educação, cozinha piloto e escolas por permitirem a realização da pesquisa no município.

---

## REFERÊNCIAS

1. Hanson LA, Zahn EA, Wild SR, Döpfer D, Scott J, Stein C. Estimating global mortality from potentially foodborne diseases: an analysis using vital registration data. *Popul Health Metrics*. 2012;10(5):1-7. [DOI: 10.1186/1478-7954-10-5].

2. Campos AKC, Cardonha AMS, Pinheiro LBG, Ferreira NR, Azevedo PRM, Stamford TLM. Assessment of personal hygiene and practices of food handlers in municipal public schools of Natal, Brazil. *Food Control*. 2009;20(9):807-10. [DOI: 10.1016/j.foodcont.2008.10.010].
3. Brasil. Ministério da Saúde - MS. Secretaria de Vigilância em Saúde - SVS. Departamento de Vigilância Epidemiológica - DEVIT. Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis - CGDT. Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos - VE-DTA. Brasília: MS; 2014.
4. Manguiat LS, Fang TJ. Microbiological quality of chicken and pork-based street-vended foods from Taichung, Taiwan, and Laguna, Philippines. *Food Microbiol*. 2013;36(1):57-62. [DOI: 10.1016/j.fm.2013.04.005].
5. Guimarães AG, Cardoso RCV, Azevêdo PF, Meneses RB. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de queijos coalho. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2012;71(2):259-65.
6. Neves DP, Filippis T. *Parasitologia Básica*. 2ª ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2010.
7. Santana NG, Almeida RCC, Ferreira JS, Almeida PF. Microbiological quality and safety of meals served to children and adoption of good manufacturing practices in public school catering in Brazil. *Food Control*. 2009;20(3):255-61. [DOI: 10.1016/j.foodcont.2008.05.004].
8. Kornacki JL, Johnson JL. *Enterobacteriaceae*, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: Downes FP, Ito K. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4ª ed. Washington: American Public Health Association; 2001. p. 69-82.
9. Lancette GA, Bennett RW. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins. In: Downes FP, Ito, K. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4ª ed. Washington: American Public Health Association; 2001. p. 387-403.
10. Andrews WH, Hammack TS. *Salmonella*. In: Food and Drug Administration, *Bacteriological Analytical Manual Online*. Chapter 5; 2007. [DOI:10.1001/jama.1989.03430230024007].
11. Bennett RW, Belay N. *Bacillus cereus*. In: Downes FP, Ito K. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4ª ed. Washington: American Public Health Association; 2001. p. 311-6.
12. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial da União* 2001; 04 jan.
13. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*. 1966;45(4):493-6.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement*. Wayne, PA: CLSI; 2012.
15. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Nota Técnica nº 01/2013. Medidas de Prevenção e Controle de Infecções por Enterobactérias multiresistentes. Brasília, DF, 2013.
16. Ritchie LS. An ether sedimentation technique for routine stool examination. *Bull U S Army Med Dep*. 1948;8(4):326.
17. Young KH, Bullock SL, Melvin DM, Sprull CL. Ethyl acetate as a substitute for diethyl ether in the formalin-ether sedimentation technique. *J Clin Microbiol*. 1979;10(6):852-3.
18. Brasil. Resolução de Diretoria Colegiada nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova o: Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial da União*. 10 jan. 2001
19. Sengun IY, Karapinar M. Effectiveness of household natural sanitizers in the elimination of *Salmonella typhimurium* on rocket (*Eruca sativa* Miller) and spring onion (*Allium cepa* L.). *Int J Food Microbiol*. 2005;98(3):319-23. [DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.07.011].

20. Goodburn C, Wallace CA. The microbiological efficacy of decontamination methodologies for fresh produce: A review. *Food Control*. 2013;32(2):418-27. [DOI:10.1016/j.foodcont.2012.12.012].
21. Sospedra I, Rubert J, Soriano JM, Mañes J. Survey of microbial quality of plant-based foods served in restaurants. *Food Control*. 2013;30(2):418-22. [DOI:10.1016/j.foodcont.2012.08.004].
22. Soares LS, Almeida RCC, Cerqueira ES, Carvalho JS, Nunes IL. Knowledge, attitudes and practices in food safety and the presence of coagulase-positive staphylococci on hands of food handlers in the schools of Camaçari, Brazil. *Food Control*. 2012;27(1):206-13. [DOI:10.1016/j.foodcont.2012.03.016].
23. Freitas MFL, Luz IS, Júnior JWP, Duarte DAM, Vasconcelos AMM, Ribeiro AR, *et al.* Detecção de genes toxigênicos em amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de queijos de coalho. *Rev Cienc Tecnol Aliment*. 2009;29(2):375-9.
24. Ryu JH, Ko J, Park H, Yang S, Kim H. Microbial Examination of Nonheated Foods Served in Feeding Programs of Elementary Schools, Iksan City, Jeonbuk Province, Korea. *J Food Prot*. 2011;74(9):1564-8. [DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-11-009].
25. Kotzekidou P. Microbiological examination of ready-to-eat foods and ready-to-bake frozen pastries from university canteens. *Food Microbiol*. 2013;34(2):337-43. [DOI:10.1016/j.fm.2013.01.005].
26. Oliveira ABA, Capalunga R, Silveira JT, Tondo EC, Cardoso MRI. Avaliação da presença de microrganismos indicadores higiênico-sanitários em alimentos servidos em escolas públicas de Porto Alegre – Brasil. *Rev Saude Coletiva*. 2013;18(4):955-62.
27. Duarte DAM, Ribeiro AR, Vasconcelos AMM, Santos SB, Silva JVD, Andrade PLA, *et al.* Occurrence of *Salmonella* spp. in broiler chicken carcasses and their susceptibility to antimicrobial agents. *Braz J Microbiol*. 2009;40(3):569-73. [DOI: 10.1590/S1517-83822009000300020].
28. Faustino JS, Passos EC, Mello ARP, Araújo ALM, Souza CV, Jorge LIF, *et al.* Análises microbiológicas de alimentos processados na Baixada Santista, envolvidos em doenças transmitidas por alimentos, no período de 2000 – 2006. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2007;66(1):26:30.
29. Kotzekidou, P. Survey of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 in raw ingredients and ready-to-eat products by commercial real-time PCR kits. *Food Microbiol*. 2013;35(2):86-91.
30. Zaidi MB, Campos FD, García TE, Gutierrez F, León M, Chim R, *et al.* Burden and Transmission of Zoonotic Foodborne Disease in a Rural Community in Mexico. *Clin Infect Dis*. 2012;55(1):51-60. [DOI: 10.1093/cid/cis300].
31. Chaves JQ, Pires ES, Vivoni AM. Genetic diversity, antimicrobial resistance and toxigenic profiles of *Bacillus cereus* isolated from food in Brazil over three decades. *Int J Food Microbiol*. 2011;147(1):12-6. [DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.029].
32. Aragon-Alegro LC, Palcich G, Lopes GV, Ribeiro VB, Landgraf M, Destro MT. Enterotoxigenic and Genetic Profiles of *Bacillus cereus* Strains of Food Origin in Brazil. *J Food Prot*. 2008;71(10):2115-8.
33. Nunes MM, Mota ALAA, Caldas ED. Investigation of food and water microbiological conditions and foodborne disease outbreaks in the Federal District, Brazil. *Food Control*. 2013;34(1):235-40. [DOI:10.1016/j.foodcont.2013.04.034].
34. Vieira CRN, Silva RR, Martino HSD, Chavasco JK. Qualidade microbiológica da merenda escolar servida nas escolas estaduais de Poços de Caldas, MG. *Hig Aliment*. 2005;19(128):90-4.
35. Dailey NJM, Lee N, Fleischauer AT, Moore ZS, Alfano-Sobsey E, Breedlove F, *et al.* *Clostridium perfringens* infections initially attributed to Norovirus, North Carolina, 2010. *Clin Infect Dis*. 2012;55(4):568-70. [DOI: 10.1093/cid/cis441].

36. Daelman J, Jacxsens L, Devlieghere F, Uyttendaele M. Microbial safety and quality of various types of cooked chilled foods. *Food Control*. 2013;30(2):510-7. [DOI:10.1016/j.foodcont.2012.07.049].
37. Peres Junior J, Gontijo EEL, Silva MG. Perfil parasitológico e microbiológico de alfaces comercializadas em restaurantes self-service de Gurupi – TO. *Rev Cient ITPAC*. 2012;5(1):1-8.
38. Edward KC, Chikwem C. The antibiotic sensitivity pattern of *Escherichia coli* isolated from street vendored vegetable salad in Umuahia, Nigeria. *J Pure Appl Microbiol*. 2012;6(2):659-64.
39. Furlaneto-Maia L, Oliveira MT, Oliveira AF. Condições higiênico-sanitárias, qualidade microbiológica e teste de susceptibilidade antimicrobiana de cepas isoladas de sanduíches comercializados por ambulantes. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2010;69(4):489-96.
40. Wang X, Meng J, Zhang J, Zhou T, Zhang Y, Yang B, et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from powdered infant formula milk and infant rice cereal in China. *Int J Food Microbiol*. 2012;153(1):142-7. [DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.030].

# Qualidade de frutas e hortaliças orgânicas comercializadas em feiras livres

## Quality of organic fruits and vegetables sold in street markets

RIALA6/1675

Amanda Brinco FERREIRA, Sandra Helena Ferreira de ALVARENGA, Jackline Freitas Brilhante de SÃO JOSÉ\*

\*Endereço para correspondência: Departamento de Educação Integrada em Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo. Av. Marechal Campos, 1468 – Maruípe, CEP: 29040-090, Vitória, ES, Brasil. Tel: 27 3335-7223. E-mail: jackline.jose@ufes.br

Recebido: 21.07.2015 - Aceito para publicação: 22.12.2015

### RESUMO

Pelo cultivo diferenciado, os produtos orgânicos podem estar mais expostos à contaminação microbiológica do que os convencionais, visto que fertilizantes orgânicos geralmente consistem de estrume (adubo orgânico), que pode abrigar micro-organismos patogênicos. Com isso, objetivou-se avaliar a qualidade de frutas e hortaliças orgânicas comercializadas em duas feiras livres da Grande Vitória/ES, bem como as condições higiênico-sanitárias das barracas que comercializam os produtos. Para avaliação das boas práticas foi aplicada uma lista de verificação baseada na Resolução RDC 216/2004. Foram coletadas 16 amostras entre frutas e hortaliças, e submetidas às seguintes análises: pH, acidez total titulável, contagem de mesófilos aeróbios, fungos filamentosos e leveduras, determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e a 45 °C e pesquisa de *Salmonella* spp. Todas as barracas avaliadas foram classificadas como regulares. A contagem de coliformes a 45 °C acima do estabelecido pela legislação vigente foi detectada em uma das amostras (6,25 %). Nessa mesma amostra foi detectada a presença de *Salmonella* spp., o que está em desacordo com o exigido pela legislação brasileira vigente. Apesar de 93,75 % das amostras estarem de acordo com os padrões microbiológicos vigentes, ressalta-se a importância do controle das fontes de contaminação, desde o campo até a comercialização dos alimentos.

**Palavras-chave.** análise microbiológica, alimentos orgânicos, *Salmonella*.

### ABSTRACT

Due to the differentiated cultivation, the organics products might be more exposed to microbiological contamination than the conventional products, since the organic fertilizers are usually consisted of manure (fertilizer compost), and this material might harbor pathogenic microorganisms. This study aimed at evaluating the hygienic conditions of the stalls in two street markets of Vitória/ES, and to assess the quality of organic fruits and vegetables sold in these locations. For assessing the good practices, a checklist based on Resolution RDC 216/2004 was applied. Sixteen samples of organic fruits and vegetables collected in these street markets were analyzed on pH, titratable acidity, mesophilic aerobic bacteria, yeasts and molds, determination of the Most Probable Number (MPN) of total and fecal coliforms, and *Salmonella* spp detection. All of the evaluated stalls were classified as regular. The coliforms counting at 45 °C above the value established by the current legislation were found in one sample (6.25 %). *Salmonella* spp. was detected in the same sample, which was noncompliant with the Brazilian legislation. Although 93.75 % of the samples were in accordance with the current microbiological standards, it is emphasized the importance of controlling the contamination sources, from the field to the food marketing.

**Keywords.** microbiological analysis, organic food, *Salmonella*.

## INTRODUÇÃO

Desde 1990, a agricultura orgânica vem crescendo rapidamente, tanto em área cultivada como em número de produtores e mercado consumidor<sup>1</sup>, impulsionado, principalmente, pela intensa preocupação dos consumidores com o uso intensivo de produtos químicos na agricultura convencional, pela preocupação social com a sustentabilidade, segurança e a qualidade dos produtos convencionais<sup>2</sup>.

A agricultura orgânica tem atraído a atenção do setor de produção de alimentos em todo o mundo, uma vez que revive princípios da ecoagricultura que englobam o uso do solo, da água, a manutenção da qualidade do ar e a aplicação da horticultura mantendo o respeito ao meio ambiente e as relações sociais, econômicas e culturais<sup>3</sup>.

Os alimentos orgânicos são definidos como aqueles alimentos *in natura* ou processados que são oriundos de um sistema orgânico de produção agropecuária e industrial. A produção de alimentos orgânicos é baseada em técnicas que dispensam o uso de insumos como pesticidas sintéticos, fertilizantes químicos, medicamentos veterinários, organismos geneticamente modificados, conservantes, aditivos e irradiação<sup>4</sup>.

Dentre os alimentos orgânicos comercializados têm-se as frutas e hortaliças. Essas podem ser consumidas cruas e desta forma, em caso de contaminação, tornam-se importantes veículos de patógenos<sup>5</sup>. Devido a forma diferenciada de cultivo, o produto orgânico pode ser mais exposto à contaminação microbiológica do que os produtos convencionais, uma vez que os fertilizantes orgânicos geralmente consistem de estrume (adubo orgânico), e este material pode abrigar micro-organismos patogênicos, tais como *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* O157:H7<sup>3</sup>. Smith<sup>6</sup> menciona que a contaminação microbiológica dependerá principalmente das práticas de produção adotadas e das condições ambientais e, assim sendo, tanto os alimentos orgânicos como os convencionais estariam sujeitos ao mesmo nível de risco.

Embora qualquer patógeno possa se tornar

problema potencial em frutas e hortaliças, *Salmonella* spp. assume relevância especial para a saúde pública<sup>7</sup>. Dentre as doenças de origem alimentar (DOA), as mais críticas são aquelas causadas pela *Salmonella* spp., considerada como um dos principais agentes envolvidos em surtos de infecção alimentar registrados em vários países<sup>8,9</sup>.

A realização de análises microbiológicas e a comparação dos resultados obtidos com os padrões estabelecidos pelos órgãos regulamentadores são imprescindíveis para averiguar a qualidade dos alimentos oferecidos aos consumidores. Entretanto, não existem parâmetros microbiológicos para alimentos provenientes de cultivo orgânico. Dessa forma, adota-se como referência a RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária<sup>10</sup>, que dispõe sobre os limites microbiológicos para frutas e hortaliças *in natura*. Devido ao aumento da procura por parte dos consumidores e ao incremento na produção orgânica de alimentos, os produtos orgânicos têm ganhando espaço no mercado brasileiro. Entretanto, os relatos sobre a comercialização destes produtos na região estudada são escassos. Informações sobre boas práticas e qualidade microbiológica destes produtos são de relevância para contribuir na determinação da escolha dos consumidores. Deste modo, objetivou-se avaliar as condições higiênico-sanitárias das barracas de duas feiras livres da Grande Vitória/ES, bem como avaliar a qualidade de frutas e hortaliças orgânicas comercializadas nestes locais.

## MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo transversal realizado no período de outubro de 2014 a maio de 2015. As amostras de frutas e hortaliças orgânicas foram coletadas em feiras livres de produtos orgânicos localizadas na Serra/ES e em Vitória/ES, sendo que existiam 12 e 15 barracas em cada feira, respectivamente. Em ambas as feiras, 11 barracas comercializavam apenas frutas e hortaliças orgânicas. As barracas foram escolhidas de acordo com a variedade de produtos

comercializados.

Inicialmente, os comerciantes foram contatados para apresentação dos objetivos da pesquisa e solicitação de doação de amostras dos alimentos comercializados. A definição das amostras a serem coletadas foi baseada nos seguintes critérios: culturas que permaneçam em contato com o solo, o que possibilita a retenção e a sobrevivência de micro-organismos, e que sejam culturas consumidas na forma *in natura* (sem cocção).

A coleta das frutas e hortaliças foi realizada no horário de comercialização dos produtos. Os pesquisadores responsáveis pela coleta das amostras utilizaram luvas e acondicionaram os alimentos em sacos plásticos disponibilizados pelos comerciantes. Os sacos plásticos foram fechados e identificados. Em seguida, foram transportados em caixas isotérmicas até o laboratório. As amostras foram mantidas a  $7 \pm 1$  °C por no máximo 24 h até o momento das análises. Foi considerada unidade amostral de cerca de 500 g de alimento. Foram coletadas 16 amostras, sendo 14 hortaliças e apenas 2 frutas, de acordo com critérios de escolha. Foram coletadas 8 amostras na feira localizada na Serra/ES e 8 na feira localizada em Vitória/ES.

Do total de barracas que comercializavam frutas e hortaliças orgânicas, foram coletadas amostras em 45,45 % (n = 5). As barracas nas quais foi feita a coleta foram identificadas como barraca 1, 2, 3, 4 e 5. Nas barracas foram coletados os seguintes alimentos: barraca 1 – alface, morango e caqui; barraca 2 – manjerição e rúcula; barraca 3 – couve, tomate, coentro, e agrião; barraca 4 – repolho, rabanete, salsa, cenoura, cebolinha, pepino; barraca 5 – pimentão.

#### **Avaliação das boas práticas das barracas das feiras**

A coleta dos dados ocorreu por meio de observação direta durante as visitas realizadas por pesquisador treinado. Para a avaliação, foi utilizada uma lista de verificação baseada na Resolução RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária<sup>11</sup>, dividida em identificação do local, avaliação e classificação do estabelecimento. A

lista de verificação apresentava quatro blocos de itens avaliados em cada barraca, totalizando 33 itens, conforme a seguir: ‘instalações e utensílios’ (13 itens); ‘abastecimento de água’ (1 item); ‘hábitos higiênicos e vestuário dos manipuladores’ (12 itens) e ‘higiene do alimento’ (7 itens). Cada item possuía três possibilidades de resposta: ‘Conforme’, ‘Não Conforme’ e ‘Não se aplica’ (NA).

A classificação de cada barraca baseou-se nos seguintes critérios de pontuação, fundamentados na Resolução RDC nº 275, de 21 de outubro de 2002, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária<sup>12</sup>: Bom (75 a 100 % de atendimento dos itens), Regular (50 a 74,9 % de atendimento dos itens) e Ruim (0 a 49,9 % de atendimento dos itens). Adotou-se essa mesma classificação para cada um dos quatro blocos da lista de verificação.

#### **Análises Químicas**

Foram avaliadas a acidez titulável e o valor de pH das amostras. Essas análises foram realizadas com objetivo de caracterizar quimicamente as amostras. Para determinação do pH foram pesadas 5 g da amostra em um béquer contendo 50 mL de água e posteriormente homogeneizado com bastão de vidro<sup>13</sup>. A determinação do pH foi realizada por medida direta em potenciômetro devidamente calibrado (Tecnopon®, Londrina-PR, Brasil). A acidez total titulável foi determinado por titulação com NaOH 0,1 N. Foram utilizadas 5 g de amostra e estas foram posteriormente homogeneizadas juntamente com 50 mL de água destilada. Em seguida, adicionou-se três gotas de indicador de fenolftaleína 1 %, procedendo-se às titulações, sob agitação, com solução de NaOH 0,1 N. Os resultados foram expressos em percentual de ácido cítrico<sup>14</sup>.

#### **Análises Microbiológicas**

Os procedimentos empregados nessa etapa foram realizados de acordo com a metodologia da *American Public Health Association* (APHA), descrita no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food*<sup>15</sup>. Foram pesados 25 g de amostra e em seguida foram adicionados 225 mL de água peptonada 0,1 % previamente esterilizada. A homogeneização

foi feita manualmente durante aproximadamente 5 minutos. Nessa etapa, foi obtida a diluição  $10^{-1}$  da amostra. Em seguida, diluições decimais apropriadas foram preparadas e alíquotas dessas diluições foram transferidas para meios de cultura específicos para a determinação de cada grupo microbiano.

A determinação de mesófilos aeróbios foi realizada pela técnica de plaqueamento em profundidade utilizando 1 mL das diluições previamente preparadas e em seguida, foi adicionado Ágar Padrão para Contagem (PCA) (Himedia®), sendo as placas incubadas invertidas a 35 °C por 48 h. O plaqueamento das alíquotas foi realizado em duplicata e o resultado expresso em unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g).

Para determinar a presença de fungos filamentosos e leveduras foi inoculado 0,1 mL das diluições das amostras sobre a superfície seca de ágar batata glicose (Aluka®) 2 %, acidificado a pH 3,5. As placas foram incubadas a  $25 \pm 1$  °C, por 5 a 7 dias. O plaqueamento das alíquotas foi realizado em duplicata e o resultado expresso em unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g).

A determinação de coliformes a 35 °C e coliformes a 45 °C foi realizada pela inoculação de alíquotas de 1 mL de cada diluição previamente preparada. Foram inoculadas em séries de três tubos contendo 9 mL de caldo Lauril sulfato triptose (Oxoid®), com tubo de Duharm invertidos (teste presuntivo); em seguida os tubos foram incubados a 35 °C por 24 – 48 h. A partir dos tubos com leitura positiva (turvação e formação de gás), foram realizados os testes confirmativos para coliformes totais em caldo Lactose Bile Verde Brilhante (Himedia®) a 35 °C por 24 – 48 h, e, coliformes a 45 °C em caldo *Escherichia coli* (Acumedia®) a 45 °C por 24 – 48 h. Após o período de incubação, realizou-se a leitura dos tubos positivos e o número mais provável (NMP) foi quantificado através da leitura na Tabela de Hoskins<sup>15</sup>.

Para análise de *Salmonella* spp., 25 g de amostras foram pré-enriquecidas em frascos contendo 225 mL de água peptonada a 1%. Após 24 h de incubação, as alíquotas foram

transferidas para 10 mL dos caldos de enriquecimento, sendo estes o caldo Rappaport Vassiliadis (Acumedia®) e caldo selenito-cistina (Acumedia®). A partir desses caldos, foi feita a repicagem sobre a superfície previamente seca de placas com meio sólido seletivo para *Salmonella* spp. Dessa forma foram obtidas 2 placas de Ágar Salmonella Shigella (Isofar®), uma originária do caldo Rappaport Vassiliadis (Isofar®) e outra originária do caldo selenito cistina e 2 placas do segundo meio seletivo Ágar Verde Brilhante (Isofar®), obtidas do mesmo modo. As placas, invertidas, foram incubadas a  $36 \pm 1$  °C por 18 a 24 h. Em seguida, foram selecionadas 3 a 5 colônias suspeitas por amostra. As colônias suspeitas foram mantidas em ágar PCA (Acumedia®) até a avaliação pelas provas bioquímicas. Foram interpretados como positivos para *Salmonella*, as culturas que apresentarem reações típicas nas provas bioquímicas. Os resultados foram expressos como presença ou ausência em 25 g<sup>16</sup>.

### **Análise dos dados**

Os dados obtidos na avaliação das condições higiênico-sanitárias por meio da lista de verificação foram tabulados em planilhas do *Microsoft Excel*® e analisados de forma descritiva.

Os resultados das análises microbiológicas foram comparados com o padrão nacional estabelecido pela RDC 12/2001 para frutas e hortaliças<sup>10</sup>. Para comparação foi considerado o valor estabelecido para amostra indicativa.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Adequação das boas práticas das barracas das feiras**

Das cinco barracas avaliadas, 60 % (n = 3) localizavam-se no município da Serra/ES e 40 % (n = 2) em Vitória-ES. Todas as barracas avaliadas comercializavam apenas frutas e hortaliças orgânicas e possuíam de dois a três funcionários.

Em relação ao atendimento aos itens propostos na lista de verificação, o percentual de adequação das barracas variou de 50 a 64,51 %, sendo todas barracas classificadas

como Regular.

O bloco de Instalações e Utensílios apresentou percentual de adequação de 53,84 a 62,53 %, sendo que todas as barracas foram classificadas como Regular. O bloco que apresentou maior percentual de inadequação foi o bloco de abastecimento de água com 100 % de inadequação para todas as barracas. Para o bloco de Higiene dos manipuladores, o percentual de adequação variou de 25 a 58,34 %, sendo todas as barracas classificadas como Ruim. O bloco com maior percentual de adequação foi o de Higiene dos Alimentos, sendo que todas as barracas avaliadas obtiveram 85,71 % de adequação.

De acordo com Almeida Filho et al<sup>17</sup>, na maioria das feiras livres, as condições higiênicas de comercialização dos produtos alimentícios são insatisfatórias, constituindo-se um importante fator no processo de contaminação e proliferação de doenças de origem alimentar.

### **Instalações e utensílios**

As barracas 1, 2 e 4 apresentaram 46,16 % de não conformidade nesse item. As barracas eram de estruturas de madeira removíveis, cobertas de lonas com as laterais abertas. Foi observado que nas bancadas onde são expostos os alimentos existiam frestas e as superfícies eram cobertas por tecido. Resultado semelhante foi observado por Agostinho<sup>18</sup> que ao avaliar barracas de feiras livres de Goiânia/GO verificou que 121 (52,8 %) não se encontravam em condições satisfatórias, com as bancadas forradas com material de difícil higienização e em estado de conservação inadequado. Esses resultados indicam a possibilidade de contaminação cruzada, pois as sujidades nas superfícies favorecem a multiplicação bacteriana e podem atrair pragas<sup>11,19</sup>.

A limpeza e desinfecção são operações fundamentais para a segurança dos alimentos. Entretanto, muitas vezes são etapas realizadas de forma inadequada, o que propicia o desenvolvimento de micro-organismos em superfícies e conseqüentemente torna-se locais com grande potencial de contaminação<sup>20</sup>.

O acondicionamento do lixo nas duas

feiras era realizado em caixas plásticas vazadas próximas às barracas, o que pode contribuir para aproximação de vetores e pragas urbanas.

Segundo Correia e Roncada<sup>20</sup>, as feiras livres apresentam problemas como falta de higiene, estrutura precária de barracas, comercialização de produtos não permitidos, falta de segurança e desorganização. Todos esses problemas comprometem a qualidade dos produtos e colocam em risco a saúde do consumidor.

### **Abastecimento de água**

Em ambas as feiras não havia disponibilidade de água potável, o que é considerado uma falha grave, pois impossibilita os manipuladores a realizarem a higienização correta de mãos e utensílios utilizados durante a comercialização.

### **Hábitos higiênicos e vestuário dos manipuladores**

Com 75 %, a barraca 1 apresentou maior percentual de não conformidade nesse item. Foi observado uso de esmaltes nas unhas, a manipulação dos alimentos sem a anti-sepsia das mãos. Esse último ocorre pela falta de local apropriado para essa ação. O manuseio do dinheiro e dos alimentos era realizado pela mesma pessoa. Este fato pode contribuir para contaminação dos alimentos. Nas feiras livres não existiam banheiros químicos disponíveis, sendo que quando necessário, era utilizado o banheiro de um restaurante próximo ao local.

A resolução RDC 275/2002 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária<sup>12</sup> determina que todos os manipuladores da área de alimentos, devem manter-se adequadamente higienizados. Conforme constatado por Audi<sup>21</sup>, ao analisar 371 manipuladores, verificou-se que mais da metade não obedeceu à legislação.

### **Higiene dos alimentos**

Todas as barracas tiveram apenas 14,29 % de inadequação nesse item, portanto, foi o bloco melhor classificado. Observou-se que os feirantes separam adequadamente cada tipo de produto, os alimentos estavam em perfeitas condições de higiene e não estavam acondicionados

juntamente com alimentos estragados e os alimentos são embalados somente com sacolas plásticas brancas, transparentes e próprias para alimentos. Entretanto, os alimentos não estavam protegidos contra insetos e poeiras. Segundo Germano<sup>22</sup>, os alimentos vendidos nas feiras-livres estão expostos ao ar livre tendo maiores possibilidades de sofrer alterações biológicas, devido às ações dos diferentes organismos atuando sobre eles. Isto se deve ao fato de receber pouco controle da matéria prima ou devido à manipulação inadequada podendo não somente veicular micro-organismos patogênicos como também propiciar o desenvolvimento e a sobrevivência desses patógenos. As frutas e hortaliças podem estar em contato com a poluição urbana, longe da proteção de um estabelecimento coberto e conseqüentemente estão mais expostos à contaminação por micro-organismos e insetos.

### Análises químicas

Os valores médios de pH e acidez total titulável estão dispostos na Tabela 1. Os valores de pH dos produtos avaliados variaram de 3,38 a 6,39. Sabe-se que o pH é um fator intrínseco importante para o desenvolvimento de micro-organismos em alimentos. Amostras com valor de pH mais baixo, como no caso do morango e tomate cereja, podem ser mais suscetíveis ao desenvolvimento de fungos filamentosos e leveduras pois estes micro-organismos toleram estas condições de pH<sup>23</sup>. Estes alimentos apresentam naturalmente ácidos orgânicos em sua composição<sup>24</sup>, o que possivelmente pode ter contribuído para o baixo valor de pH observado.

Amostras de alface, cenoura, coentro, couve, manjeriço, pepino, rabanete e rúcula apresentaram valores de pH superiores a 6. Sabe-se que valores de pH mais próximos de 7 são mais propícios ao desenvolvimento de bactérias, principalmente de bactérias patogênicas.<sup>23</sup>

Os valores de acidez total titulável variaram de 0,6 a 6,8 mg de ácido cítrico/100 g de amostra. A acidez total titulável é um parâmetro envolvido com a apreciação do estado de conservação de um produto alimentício, já que, na maioria das

**Tabela 1.** Valores médios de pH e acidez total titulável de frutas e hortaliças orgânicas de feiras livres da Grande Vitória/ES, 2015

Alimento	pH	Acidez Total Titulável (%)
Agrião	5,73	6,8
Alface	6,14	1,9
Caqui	5,93	2,3
Cebolinha	5,97	2,5
Cenoura	6,03	1,3
Coentro	6,25	2,5
Couve	6,08	3,9
Manjeriço	6,39	1,9
Morango	3,38	2,8
Pepino	6,25	0,6
Pimentão	5,97	1,3
Rabanete	6,28	1,9
Repolho	5,97	3,4
Rúcula	6,25	2,4
Salsa	5,92	2,5
Tomate cereja	4,31	1,7

vezes, a decomposição do alimento quase sempre altera a concentração de íons de hidrogênio<sup>13</sup>, além de influenciar as características sensoriais dos alimentos. Esse parâmetro pode variar em função do grau de maturação e das condições de crescimento<sup>24</sup>.

### Análises microbiológicas

Os resultados das amostras avaliadas encontram-se descritos na Tabela 2.

A contagem de mesófilos aeróbios nas amostras variou de 4,1 a 7,7 log UFC/g. Resultado semelhante foi observado por Maffei et al<sup>3</sup> que observaram variação da contagem desses micro-organismos de 5 a 7 log UFC/g. Santos et al<sup>25</sup> também encontraram resultados semelhantes em frutas e hortaliças minimamente processadas, com contagem total de mesófilos aeróbios variando de 2,3 a > 9,8 log UFC/g. Não está previsto na legislação brasileira o padrão microbiológico para mesófilos aeróbios.

**Tabela 2.** Contagem total de aeróbios mesófilos, fungos filamentosos e leveduras, coliformes a 35 °C, coliformes a 45° C e presença de *Salmonella* spp. de frutas e hortaliças orgânicas de feiras livres da Grande Vitória/ES, 2015

Alimento	Mesófilos Aeróbios (log UFC/g)	Fungos filamentosos e leveduras (log UFC/g)	Coliformes a 35 °C (NMP/g)	Coliformes a 45°C (NMP/g)	<i>Salmonella</i> spp. (em 25 g)
Agrião	7,4	5,4	> 1,1 x 10 <sup>3</sup>	< 3	Ausência
Alface	5,6	5,7	1,1 x 10 <sup>3</sup>	< 3	Ausência
Caqui	6,1	< 10 est.	23	< 3	Ausência
Cebolinha	6,4	4,3	> 1,1 x 10 <sup>3</sup>	3,6	Ausência
Cenoura	6,0	5,7	> 1,1 x 10 <sup>3</sup>	< 3	Ausência
Coentro	6,5	6	> 1,1 x 10 <sup>3</sup>	< 3	Ausência
Couve	4,7	5,5	2,1 x 10 <sup>2</sup>	< 3	Ausência
Manjeriçã	5,5	4,4	4,6 x 10 <sup>2</sup>	6,1	Ausência
Morango	4,5	5,9	9,3 x 10 <sup>2</sup>	< 3	Ausência
Pepino	6,4	< 10 est.	> 1,1 x 10 <sup>3</sup>	< 3	Ausência
Pimentão	4,9	4,0	6,1	< 3	Ausência
Rabanete	5,5	4,7	4,3 x 10 <sup>2</sup>	< 3	Ausência
Repolho	4,1	4,6	< 3	< 3	Ausência
Rúcula	6,5	5,2	> 1,1 x 10 <sup>3</sup>	< 3	Ausência
Salsa	6,1	5,3	> 1,1 x 10 <sup>3</sup>	1,2 x 10 <sup>2</sup>	Presença
Tomate cereja	7,7	5,7	1,5 x 10 <sup>2</sup>	< 3	Ausência

Entretanto, essa análise é importante, pois auxilia na indicação de vida de prateleira e qualidade microbiológica dos alimentos<sup>3,28</sup>. Os alimentos com maior contagem foram tomate e agrião. Esse resultado é corroborado pelo encontrado por Maistro et al<sup>27</sup> que detectaram a maior contagem desses micro-organismos em amostras de agrião, independentemente do sistema de empacotamento, o que evidencia uma contaminação inerente deste produto.

Para fungos filamentosos e leveduras, a contagem variou de 4,0 a 6,0 log UFC/g. Maffei et al<sup>3</sup> e Oliveira et al<sup>28</sup> também observaram resultado semelhante para este grupo de micro-organismos ao analisar qualidade de frutas e hortaliças orgânicas. Apesar da legislação brasileira não indicar limite para estes micro-organismos em frutas e hortaliças, Ferreira et al<sup>29</sup> recomendaram contagem inferior a 4 log UFC/g para garantir a proteção à saúde do consumidor, pois em contagens superiores pode haver

produção de micotoxinas. Além disso, a análise deste grupo de micro-organismos é importante, pois a alta contagem também está relacionada à maior chance de deterioração do alimento.

Nas frutas, a contagem de coliformes a 35 °C variou de 23 a 9,3 x 10<sup>2</sup> NMP/g. O índice de coliformes a 35 °C avalia as condições higiênico-sanitárias gerais dos alimentos. Esse resultado situa-se na faixa encontrada em outros estudos com frutas, conforme verificado por Pinheiro et al<sup>26</sup> e Smanioto et al<sup>30</sup> que encontraram contagem de coliformes a 35 °C variando de < 3 a 2,4 x 10<sup>6</sup> NMP/g e < 3 a 1,1 x 10<sup>3</sup> NMP/g, respectivamente. Segundo Pinheiro et al<sup>26</sup>, os coliformes a 45 °C podem indicar contaminação de origem fecal recente, sendo que a detecção de elevado número pode estar relacionada à possível presença de patógenos intestinais, como *E. coli* e *Salmonella* spp. Segundo a RDC 12/2001<sup>10</sup>, a contagem máxima de coliformes 45 °C para morangos é de 2 x 10<sup>3</sup> UFC/g e para

as demais frutas,  $5 \times 10^2$  UFC/g. Visto que esses micro-organismos não foram detectados nas amostras de frutas, esses alimentos atendem a legislação vigente. Resultado semelhante foi observado por Smanioto et al<sup>30</sup> que também encontraram todas as amostras de frutas de acordo com o padrão da legislação.

Para as hortaliças, a contagem de coliformes a 35 °C variou de  $< 3$  a  $> 1,1 \times 10^3$  NMP/g. Essa contagem foi menor do que as detectadas por Arbos et al<sup>31</sup> que encontraram variação de  $< 3$  a  $\geq 2,4 \times 10^3$  NMP/g em hortaliças orgânicas. Os coliformes a 45 °C foram encontrados em cebolinha, manjeriço e salsa. A contagem máxima de coliformes 45 °C em hortaliças estabelecida pela legislação vigente é de  $1 \times 10^2$  UFC/g, portanto, a amostra de salsa encontra-se com contagem acima do permitido e conseqüentemente imprópria para o consumo. Em estudos realizados por Maffei et al<sup>3</sup>, Arbos et al<sup>31</sup> e Abreu et al<sup>32</sup>, observou-se que hortaliças orgânicas apresentavam contagem de coliformes 45 °C superior ao exigido pela legislação.

A presença de *Salmonella* spp. foi detectada na amostra de salsa, o que está em desacordo com o exigido pela legislação brasileira vigente<sup>10</sup>. A presença deste patógeno é inaceitável em alimentos devido ao alto risco para a saúde. Resultados semelhantes foram encontrados por Arbos et al<sup>31</sup> que detectaram presença de *Salmonella* em amostras de alface e cenoura provenientes do cultivo orgânico. Outros estudos conduzidos no Brasil, também detectaram a presença deste patógeno em vegetais<sup>33-35</sup>. Em estudo realizado por Maffei et al<sup>3</sup> ao avaliar a qualidade microbiológica de frutas e hortaliças orgânicas comercializadas em Araraquara/SP não foi detectada a presença de *Salmonella* spp. nas amostras. Machado et al<sup>35</sup> ao avaliar frutas e hortaliças orgânicas submetidas a diferentes processos de adubação também não encontraram esse patógeno nas amostras. Alimentos comercializados como orgânicos devem atender a especificações exigidas para a certificação, a qual não admite que o esterco animal seja usado antes de sua correta compostagem<sup>31</sup>.

Ao término do trabalho foram desenvolvidas atividades de orientação com a finalidade de

esclarecer os cuidados higiênico-sanitários adequados para a comercialização de alimentos e as boas práticas. Além disso, é preciso que os órgãos responsáveis fiscalizem as feiras e contribuam para tornar o ambiente das feiras mais adequado e sem riscos para a saúde do consumidor.

## CONCLUSÃO

As condições higiênico-sanitárias de venda dos alimentos foram classificadas como regulares, sendo as maiores inadequações vistas nos itens de abastecimento de água e higiene dos manipuladores, que podem favorecer a contaminação dos alimentos. É necessário que sejam feitas várias ações como disponibilização de banheiros e locais para higiene de mãos, instrução quanto aos materiais adequados para construção das barracas e orientação geral sobre as boas práticas na manipulação dos alimentos.

Apesar do baixo número de amostras analisadas, a maioria mostrou-se em acordo com o padrão microbiológico estabelecido pela legislação vigente que estabelece o máximo de 100 UFC/g para coliformes a 45 °C e ausência de *Salmonella* em 25 g da amostra. Apesar do baixo número de amostras impróprias para o consumo, são importantes ações que visem o controle das possíveis fontes de contaminação dos alimentos desde o campo até o momento da comercialização.

## REFERÊNCIAS

1. Santos GD, Monteiro M. Sistema orgânico de produção de alimentos. *Alim Nutr*. 2004;15(1):73-86.
2. Assis RL, Romeiro AR. Agroecologia e agricultura orgânica: controvérsias e tendências. *Desenvolv Meio Amb*. 2002;6:67-80.
3. Maffei DF, Arruda Silveira NF, Catanozi MDPLM. Microbiological quality of organic and conventional vegetables sold in Brazil. *Food Control*. 2013;29(1):226-30. [DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.06.013].

4. Food and Agriculture Organization. Inter-Departmental Working Group on Organic Agriculture. Organic agriculture. [acesso 2015 Mai 11]. Disponível em: [<http://www.fao.org/organicag/oa-faq/oa-faq1/es/>].
5. Berger CN, Sodha SV, Shaw RK, Griffin PM, Pink D, Hand P, et al. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environ Microbiol*. 2010;12(9):2385-97. [DOI: 10.1111/j.1462-2920.2010.02297.x].
6. Smith BL. Organic foods vs. supermarket foods: element levels. *J Appl Nutr*. 1993;45(1):35-9.
7. Elizaquível P, Aznar R. A multiplex RTi-PCR reaction for simultaneous detection of *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* on fresh, minimally processed vegetables. *Food Microbiol*. 2008;25(5):705-13. [DOI: 10.1016/j.fm.2008.03.002].
8. Maijala R, Ranta J, Seuna E, Peltola J. The efficiency of the Finnish *Salmonella* Control Programme. *Food Control*. 2005;16(8):669-75. [DOI: 10.1016/j.foodcont.2004.06.003].
9. Tessari ENC, Cardoso ALSP, Castro AGMD, Zanatta GF. Prevalência de *Salmonella enteritidis* em carcaças de frango industrialmente processadas. *Hig Aliment*. 2003;17(107):52-5.
10. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Dispõe sobre regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. [acesso 2015 Mai 11]. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 10 jan. 2001. Disponível em: [<http://portal.anvisa.gov.br/>].
11. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 216, de 15 setembro de 2004. Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. [acesso 2015 mai. 19]. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 16 set. 2004. Disponível em: [<http://portal.anvisa.gov.br/>].
12. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 275, de 21 de outubro de 2002. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 06 nov. 2002.
13. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo – Brasil). Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4a ed. São Paulo (SP): Instituto Adolfo Lutz, 2008.
14. Association of Official Analytical Chemists - AOAC. Official Methods of Analysis. 14 ed. Arlington:AOAC, 1984.
15. Downes FP, Ito K. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4 ed. Washington: American Public Health Association; 2001. p. 25-36.
16. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 18 set. 2003. Seção 1, p. 14.
17. Almeida Filho ESD, Sigarini CDO, Borges NF, Delmondes ÉC, Ozaki AS, Souza LCD. Pesquisa de *Salmonella* spp em carcaças de frango (*Gallus gallus*), comercializadas em feira livre ou em supermercado no município de Cuiabá, MT, Brasil. *Hig Aliment*. 2003;17(110):74-9.
18. Agostinho TMS. Perfil do risco sanitário de alimentos comercializados em feiras especiais de Goiânia-GO [dissertação de mestrado]. Goiânia (GO): Universidade Federal de Goiás; 2013.
19. Rossi CF. Condições higiênico-sanitárias de restaurantes comerciais do tipo *self-service* de Belo Horizonte-MG [dissertação de mestrado]. Belo Horizonte(MG): Universidade Federal de Minas Gerais; 2006.

20. Correia M, Roncada MJ. Características microscópicas de queijos prato, mussarela e mineiro comercializados em feiras livres da Cidade de São Paulo. *Rev Saude Publica*. 1997;31(3):296-301. [DOI: 10.1590/S0034-89101997000300011].
21. Audi SG. Avaliação das condições higiênico-sanitárias das feiras livres do município de São Paulo. São Paulo [dissertação de mestrado]. São Paulo(SP): Universidade de São Paulo; 2002.
22. Germano PML, Germano MIS. Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos. 3ª ed. Barueri (SP): Manole; 2008.
23. Franco BDGM, Landgraf M. Microbiologia dos Alimentos. São Paulo (SP): Atheneu; 2008.
24. Chitarra MIF, Chitarra AB. Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio. Lavras: UFLA; 2005.
25. Santos TBA, Silva N, Junqueira V, Pereira J. Microrganismos indicadores em frutas e hortaliças minimamente processadas. *Braz J Food Technol*. 2010;13(2):141-6. [DOI: 10.4260/BJFT2010130200019].
26. Pinheiro NM, Figueiredo ATE, Figueiredo RW, Maia FA, Souza PHM. Avaliação da qualidade microbiológica de frutos minimamente processados comercializados em supermercados de Fortaleza. *Rev Bras Frutic*. 2005;27(1):153-6.
27. Maistro LC, Miya NTN, Sant'Ana AS, Pereira JL. Microbiological quality and safety of minimally processed vegetables marketed in Campinas, SP-Brazil, as assessed by traditional and alternative methods. *Food Control*. 2012;28(2):258-64. [DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.05.021].
28. Oliveira M, Usall J, Viñas I, Anguera M, Gatiús F, Abadias M. Microbiological quality of fresh lettuce from organic and conventional production. *Food Microbiol*. 2010;27(5):679-84. [DOI: 10.1016/j.fm.2010.03.008].
29. Ferreira SMR, Quadros DA, Karkle ENL, Lima JJ, Tullio LT, Pacheco MASR, et al. Condições higiênico-sanitárias de verduras e legumes comercializados no CEAGESP de Sorocaba - SP. *Hig Alim*. 2002;16(101):50-5.
30. Smanioto TE, Pirolo NJ, Simionato EMRS, Arruda MCD. Qualidade microbiológica de frutas e hortaliças minimamente processadas. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2009;68(1):150-4.
31. Arbos KA, Freitas RJSD, Stertz SC, Carvalho LA. Segurança alimentar de hortaliças orgânicas: aspectos sanitários e nutricionais. *Cienc Tecnol Aliment*. 2010;30(suppl 1):215-20. [DOI: 10.1590/S0101-20612010000500033].
32. Abreu IMO, Junqueira AMR, Peixoto JR, Oliveira SA. Qualidade microbiológica e produtividade de alface sob adubação química e orgânica. *Cienc Tecnol Aliment*. 2010;30(Supl 1):108-18.
33. Simões M, Pisani B, Marques EGL, Prandi MAG, Martini MH, Chiarini PFT, et al. Hygienic-sanitary conditions of vegetables and irrigation water from kitchen gardens in the municipality of Campinas, SP. *Braz J Microbiol*. 2001;32(4):331-3. [DOI: 10.1590/S1517-83822001000400015].
34. Takayanagui OM, Capuano DM, Oliveira CAD, Bergamini AMM, Okino MHT, Castro e Silva AAMC, et al. Avaliação da contaminação de hortas produtoras de verduras após a implantação do sistema de fiscalização em Ribeirão Preto, SP. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007;40(2):239-41.
35. Machado DC, Maia CM, Carvalho ID, Silva NFD, André MCDPB, Serafini AB. Microbiological quality of organic vegetables produced in soil treated with different types of manure and mineral fertilizer. *Braz J Microbiol*. 2006;37(4):538-44. [DOI: 10.1590/S1517-83822006000400025].

# Qualidade microbiológica do alho (*Allium sativum*) produzido e comercializado em mercados públicos

## Microbiological quality of garlic (*Allium sativum*) produced and sold in public markets

RIALA6/1676

Luiza Mayara dos Santos FONTENELE<sup>1</sup>, Maria Liliane Ximendes AZEVEDO<sup>1</sup>, Francisco das Chagas CARDOSO FILHO<sup>1\*</sup>, Maria Christina Sanches MURATORI<sup>2</sup>, Leonel Rômulo Souza de SÁ<sup>3</sup>, Maria Marlúcia Gomes PEREIRA<sup>2</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Núcleo de Estudos, Pesquisa e Processamento de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí. Campus Ministro Petrônio Portela, Teresina, PI, Brasil. CEP: 64049-550. Tel/Fax: 86 3215- 5754. E-mail: veterinário\_filho@hotmail.com

<sup>1</sup>Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí

<sup>2</sup>Departamento de Morfofisiologia Veterinária, Universidade Federal do Piauí

<sup>3</sup>Faculdade Associação de Ensino Superior do Piauí

Recebido: 23.06.2015 - Aceito para publicação: 18.12.2015

### RESUMO

Considerado um alimento funcional, o alho colabora na melhoria do metabolismo e na prevenção de problemas de saúde. Seu principal composto, a alicina, é responsável pela maioria das propriedades farmacológicas, antioxidantes e antibióticas, além de combater bactérias e fungos. Objetivou-se avaliar a qualidade higiênica e sanitária do alho oriundo da microrregião de Picos/PI. Foram coletadas 35 amostras de alho produzido em Picos e 15 amostras do alho importado exposto à venda no mercado da cidade e encaminhadas ao Laboratório NUEPPA/UFPI. Para efetuar as análises seguiu-se a Instrução Normativa 62. Com relação a coliformes totais e termotolerantes, as amostras de alho não apresentaram diferença significativa. Em amostras de ambas as procedências, foram encontrados os gêneros fúngicos *Absidia* spp, *Alternaria* spp, *Aspergillus* spp, *Chrysonilia* spp, *Cladosporium* spp, *Moniliella* spp e *Penicillium* spp. As amostras produzidas em Picos apresentaram condições higiênicas e sanitárias satisfatórias; e das importadas, apenas uma apresentou condições insatisfatórias. No entanto, vale destacar a presença de gêneros fúngicos, o que sugere maior atenção no armazenamento e conservação.

**Palavras-chave.** bactérias, bolores, condimentos, fungos toxígenos, micro-organismos.

### ABSTRACT

Considered as a functional food, the garlic contributes for improving the metabolism and for preventing the health problems. Allicin, its main compound, is responsible for the majority of pharmacological, antioxidant and antibiotic properties, and for combating fungi and bacteria. The objective of this work was to assess the hygienic and sanitary quality of garlic originated from the micro-region of Picos/PI. For conducting this study, the following samples were collected: 35 garlic specimens produced in Picos, and 15 imported garlic samples for sale at the town market and sent to the NUEPPA/UFPI Laboratory. The analyses were performed by following the Normative Instruction 62. Regarding to the total and thermotolerant coliforms, the garlic samples showed no statistical difference. The presence of fungi of the genus *Absidia* spp, *Alternaria* spp, *Aspergillus* spp, *Chrysonilia* spp, *Cladosporium* spp, *Moniliella* spp and *Penicillium* spp were detected in samples from the both sources. The samples produced in Picos showed satisfactory hygienic and sanitary conditions. Among the imported garlic samples, only one showed unsatisfactory conditions. Nevertheless, it is worth to remark the occurrence of different fungi genera in the analyzed samples, which suggests that it needs a substantial attention in the foods storage and preservation.

**Keywords.** bacteria, molds, condiments, toxigenic fungi, microorganisms.

## INTRODUÇÃO

O alho é um alimento utilizado tanto na cura de doenças como na culinária, podendo ser usado de várias formas por possuir vários nutrientes, destacando-se os altos teores de zinco, selênio e alicina, óleo volátil sulfuroso que caracteriza seu forte odor<sup>1</sup>.

Por ser considerado um alimento funcional, o alho colabora para melhorar o metabolismo e prevenir problemas de saúde. Seu principal composto, a alicina é responsável pela maioria das propriedades farmacológicas, antioxidantes e antibióticas, contra bactérias, fungos e vírus<sup>2</sup>.

O Brasil é um dos países que mais consome alho, sendo principalmente comercializado na forma *in natura*, embora se observe crescimento gradativo do consumo de pastas e outros derivados do alho<sup>3</sup>. O consumo de alho pelos brasileiros cresceu de 166 mil toneladas para 308 mil toneladas entre 1996 e 2012<sup>4</sup>. Em várias regiões do Nordeste há condições propícias ao seu cultivo, desde que sejam supridas as necessidades hídricas da cultura, por meio de irrigação<sup>5</sup>.

Há muito tempo, os temperos industrializados vêm sendo amplamente consumidos, principalmente pela população urbana; entretanto, sua qualidade não pode ser facilmente avaliada pelo consumidor no ato da compra<sup>6</sup>. O uso dos condimentos estimulou a importação, porém estes produtos podem chegar ao consumidor com baixa qualidade devido à perda de seus óleos essenciais voláteis, à contaminação por micro-organismos ou infestação por insetos<sup>7</sup>.

Os condimentos, sob o ponto de vista microbiológico, em condições de umidade e temperatura adequadas, podem favorecer o desenvolvimento de fungos filamentosos ou outros micro-organismos que propiciam a deterioração do alimento e podem ocasionar transtornos à saúde do consumidor. No entanto, alguns condimentos apresentam atividade antimicrobiana, o que pode ajudar na conservação de alimentos, enquanto outros estimulam o metabolismo microbiano e tornam mais rápida a alteração e/ou síntese de toxinas<sup>8</sup>.

Desta forma, a contaminação fúngica pode acarretar perdas econômicas, seja pela alteração dos produtos, como pela redução da sanidade devido a possível contaminação por micotoxinas<sup>9</sup>, as quais correspondem a produtos do metabolismo secundário de alguns fungos toxígenicos; micotoxinas podem ser carcinogênicas, teratogênicas e/ou imunossupressores, podendo causar efeitos tanto em animais como em humanos que consomem alimentos contaminados<sup>10</sup>.

Condimentos podem ser contaminados na sua origem, estocagem, transporte ou mesmo durante a manipulação, por esporos bacterianos, bolores e leveduras. Por outro lado, o armazenamento em galpões velhos, úmidos, mal ventilados, com paredes cobertas de bolores, propiciam a multiplicação das espécies contaminantes e/ou a invasão por novas espécies a partir do ambiente. A perda de qualidade dos condimentos traduz-se por diminuição das propriedades sensoriais como cor, odor e sabor<sup>11</sup>.

Sabe-se que a contaminação, principalmente por micro-organismos patogênicos representa grande risco à saúde dos consumidores, devido à possibilidade de toxinfecções de origem alimentar. Como os condimentos são adicionados a outras preparações, quando estão contaminados acabam por elevar a carga microbiana presente nestes outros alimentos<sup>12</sup>. A estabilidade de alguns alimentos, diante do possível ataque por micro-organismos, deve-se a presença de substâncias naturais que apresentam atividade antimicrobiana como a alicina no alho. Por mais saborosos que sejam os condimentos, sobretudo ao proporcionar o incremento das propriedades sensoriais dos alimentos, elas não são, de todo, isentas de efeitos nocivos à saúde<sup>13</sup>.

Segundo agricultores locais, poucos municípios próximos a Picos ainda cultivam alho e, considerando tratar-se de um condimento produzido, comercializado e consumido no Brasil aumenta a importância de estudos que avaliem a qualidade microbiológica do alho produzido no país, assim como do alho que chega de fora do Brasil. No Piauí, parte da população

adquire seus alimentos nos mercados públicos, onde os condimentos ficam expostos à venda em caixotes de madeira ou de papelão empilhados, de modo a permitir que o consumidor possa tocar e cheirar o produto antes da compra, prática que favorece que os alimentos entrem em contato com propágulos fúngicos. Devido à importância dos condimentos para a alimentação local e por não haver estudos sobre a possível contaminação fúngica neste produto comercializado nos mercados públicos piauiense, objetivou-se avaliar a qualidade higiênico-sanitária de amostras de alho oriundas da microrregião de Picos/PI.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas 35 amostras do alho produzido na microrregião de Picos e 15 amostras do alho importado e exposto a venda no mercado da cidade de Picos/PI, entre os meses de fevereiro a junho de 2013. Cada amostra apresentou aproximadamente 100 gramas, tendo sido devidamente acondicionadas em sacos plásticos e encaminhadas ao Laboratório do Núcleo de Estudos, Pesquisas e Processamento de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Piauí (NUEPPA/UFPI).

Para a realização das análises, seguiu-se o descrito na Instrução Normativa 62<sup>14</sup>. Foram pesadas assepticamente 25 g de cada amostra, as quais foram transferidas para frasco contendo 225 mL de água peptonada a 0,1 %, formando a diluição inicial ( $10^{-1}$ ). A partir desta diluição inicial, foram preparadas diluições decimais seriadas até  $10^{-3}$ . Alíquotas de 1,0 mL de cada uma das três diluições foram transferidas para placas de Petri (em duplicata) e adicionados 20 mL de ágar padrão para contagem, para a enumeração de bactérias mesófilas, seguido de incubação a 37 °C, por 48 h.

Para coliformes totais e termotolerantes, alíquotas de 1,0 mL de cada uma das três diluições foram transferidas para uma série de 3 tubos contendo o caldo Lauril Sulfato Triptose (LST), seguido de incubação a 37 °C, por 48 h. Decorrido o período de incubação, os tubos que apresentaram turvação do meio e produção

de gás no interior dos tubos de Durham foram considerados positivos e a partir destes, transferiu-se uma alçada para tubos contendo Caldo Bile Lactose Verde Brilhante e para tubos contendo caldo EC, que foram incubados a 37 °C e 45 °C respectivamente, durante 24 a 48 h. Fez-se a contagem dos tubos positivos e negativos e utilizou-se a tabela de NMP para calcular o “Número Mais Provável” de coliformes por grama.

Para verificar a presença de *Salmonella* spp. nas amostras, seguiu-se como descrito na Instrução Normativa 62<sup>14</sup>. Foi realizada a incubação a 37 °C por 24 h, de 25 g de cada amostra adicionados a 225 mL de água peptonada. O enriquecimento seletivo foi realizado nos meios líquidos seletivos, caldo Rappaport Vassiliadis e caldo selenito-cistina.

Para bolores e leveduras, foram adicionadas alíquotas de 0,1 mL na superfície do meio de cultivo Dichloran Rose Bengal Cloranfenicol (DRBC)<sup>15</sup>, incubadas a 25 °C por sete dias, sendo as contagens realizadas nas placas que apresentaram entre 10 a 150 UFC<sup>16,17</sup>. Após a contagem, as colônias de bolores foram identificadas quanto ao gênero pelas características macroscópicas e microscópicas, fazendo-se a prevalência dos gêneros<sup>15</sup>.

Após a obtenção dos resultados foi realizada análise de variância e teste de normalidade, depois as médias foram comparadas pelo teste Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As condições de venda dos alimentos nos mercados pesquisados eram precárias. O alho era exposto em caixotes de madeiras e/ou caixas de papelão empilhados, que permaneciam sob luz direta do sol, e os consumidores tinham livre acesso aos produtos, onde esses eram comercializados a granel e podiam ser manipulados pelos mesmos. Foi observada no local a presença de animais como cães, gatos, pombos e pequenos pássaros. Além do alho, eram comercializados pimentas, corantes naturais, frutas e verduras.

Os resultados obtidos na contagem de bactérias mesófilas, coliformes e fungos estão

representados na Tabela 1, onde se pode observar que não houve diferença significativa na contaminação entre o alho produzido em Picos e o alho de importação. Com relação a fungos

filamentosos, houve diferença estatisticamente significativa entre as amostras, onde o alho produzido em Picos mostrou contagem maiores em relação ao alho de importação.

**Tabela 1.** Contagem microbiana verificada no alho produzido e de importação, comercializados na microrregião de Picos, PI

Micro-organismo	Alho produzido em Picos	Alho importado
Bactérias Mesófilas (UFC/g)	2,08 <sup>a</sup> ± 0,47	2,01 <sup>a</sup> ± 0,28
Coliformes Totais (NMP/g)	0,17 <sup>a</sup> ± 0,43	0,48 <sup>a</sup> ± 0,83
Coliformes Termotolerantes (NMP/g)	0,13 <sup>a</sup> ± 0,37	0,26 <sup>a</sup> ± 0,65
Fungos Filamentosos (UFC/g)	1,52 <sup>a</sup> ± 0,66	0,93 <sup>b</sup> ± 0,80
Fungos Leveduriformes (UFC/g)	0,15 <sup>a</sup> ± 0,48	0,11 <sup>a</sup> ± 0,44

<sup>a, b</sup>: letras iguais em coluna <sup>A, B</sup>: letras iguais em linhas, resultados semelhantes ( $p < 0,001$ ). UFC/g: Unidade Formadora de Colônia por grama; NMP/g: Número mais provável por grama

Quando presente em um alimento, as bactérias aeróbias mesófilas indicam a qualidade higiênica e sanitária na qual o alimento foi processado, como as condições da matéria prima, as condições higiênicas durante o processamento a eficácia dos processamentos tecnológicos, as condições sanitárias dos equipamentos e utensílios, a vida de prateleira e o tempo de armazenamento e distribuição dos alimentos.

Foram encontrados  $9,2 \times 10^2$  UFC/g de bactérias aeróbias mesófilas nos alhos produzidos em Picos e  $3,2 \times 10^2$  UFC/g em alho de importação. Leite et al<sup>18</sup>, em amostras de temperos caseiros, encontraram bactérias mesófilas em maior quantidade nas amostras estudadas ( $3,5 \times 10^3$  UFC/g). Já Carvalho et al<sup>6</sup>, em amostras de alho e sal comercializados em Juiz de Fora/MG, observaram médias variando de 1,30 a 5,80, valores semelhantes ao encontrados nas amostras de alho produzido em Picos e de importação.

A salmonelose é um problema de saúde pública comum e economicamente importante, sendo considerada como o principal agente envolvidos em surtos de origem alimentar responsável por 35 % dos casos de DTA que causaram internação. No Brasil, é a principal causa de surtos, sendo as regiões sul e sudeste as que mais notificam ocorrências<sup>19,20</sup>. Nenhuma das amostras avaliadas neste estudo apresentou ocorrência de *Salmonella* spp., indicando condições higiênica e sanitária satisfatórias<sup>21</sup>. O mesmo resultado foi descrito por

Leite et al<sup>18</sup> em amostras de temperos caseiros.

Foi detectada a presença de coliformes em 11 amostras (22 %) analisadas, sendo em maior quantidade em alho de importação. A legislação vigente estabelece a tolerância para amostra indicativa de até  $10^2$  NMP/g, portanto os resultados obtidos para coliformes totais e termotolerantes são considerados aceitáveis para a maioria das amostras analisadas, com exceção de apenas uma amostra que apresentou contagem  $> 1100$  (NMP/g), proveniente do alho de importação<sup>21</sup>.

Leite et al<sup>18</sup>, em estudo com temperos caseiros de Feira de Santana, observaram contagens para coliformes fecais maiores que 0,3 NMP/g. Já Barbariet al<sup>22</sup>, em estudo com pasta de alho, observaram contagens para coliformes fecais maiores que 0,3 NMP/g em diversas amostras e, para bolores e leveduras maiores que  $10^2$ UFC/g, sendo tais valores próximos aos encontrado sem alho de importação, onde foram observadas contagens para leveduras de  $5,0 \times 10^1$  UFC/g e de bolores de  $3,8 \times 10^2$  UFC/g, enquanto que e nas amostras adquiridas no mercado de Picos, foram observadas contagens de  $1,3 \times 10^2$  UFC/g de leveduras e  $1,8 \times 10^2$  UFC/g de bolores. Silva et al<sup>23</sup>, das 36 amostras de condimentos analisados, 28 (77,77 %) apresentaram resultados positivos para fungos, onde verificou-se valores variando de  $8,6 \times 10^3$  a  $1,3 \times 10^5$  UFC/g, não havendo diferença significativa entre eles. Já Carvalho et al<sup>6</sup> em amostras de alho e sal comercializados em

Juiz de Fora/MG, observaram médias variando de 1,00 a 4,36 UFC/g, valores semelhantes ao encontrados nas amostras de alho produzido em Picos e maiores quando comparados ao alho de importação. Assim, a presença de fungos viáveis e em índices elevados nos alimentos indica condições higiênicas deficientes ou multiplicação no produto durante estocagem. Sendo considerados de grande importância na determinação da qualidade da matéria-prima.

Os gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* são os mais importantes e os mais frequentemente encontrados em alimentos, além de serem potencialmente produtores de micotoxina<sup>10</sup>. Tanto em amostras adquiridas nos mercados de Picos PI, como nas amostras de importação, foi possível isolar diversos gêneros, entre os quais *Aspergillus* e *Penicillium* (Tabela 2).

**Tabela 2.** Gêneros fungicos encontrados no alho produzido e de importação, comercializados na microrregião de Picos, PI

Gênero	Alho produzido em Picos	Alho importado
<i>Absidia</i> spp.	6 (6,89 %)	1 (4,54 %)
<i>Alternaria</i> spp.	11 (12,64 %)	2 (9,09 %)
<i>Aspergillus</i> spp.	19 (21,83 %)	7 (31,81 %)
<i>Chrysonilia</i> spp.	5 (5,74 %)	2 (9,09 %)
<i>Cladosporium</i> spp.	21 (24,13 %)	7(31,81 %)
<i>Fusarium</i> spp.	6 (6,89 %)	0 (0,00 %)
<i>Moniliella</i> spp.	3 (3,44 %)	1 (4,54 %)
<i>Penicillium</i> spp.	16 (18,39 %)	2 (9,09 %)
Total	87 (100 %)	22 (100 %)

Silva et al<sup>23</sup>, em amostras de condimentos provenientes das feiras livres e dos supermercados de Teresina/PI, observaram a ocorrência de *Aspergillus* como gênero predominante, seguido de *Penicillium*, e em menor quantidade *Fusarium* e *Absidia*. Gêneros também encontrados por Souza et al<sup>24</sup>, em amostras de condimentos artesanais e industrializados de Recife/PE.

As condições de manipulação das amostras podem ter influenciado na contaminação, portanto, deve-se ter cuidado no armazenamento e a manipulação desses produtos, assim como medidas higiênicas devem ser implantadas para

reduzir a contaminação microbiana e aumentar a segurança dos consumidores. Vale ressaltar que embora a contagem possa ser considerada baixa, foi observado um número significativo de diferentes gêneros presente nas amostras, o que requer uma maior atenção no seu armazenamento, contribuindo para uma melhor conservação do produto.

## CONCLUSÃO

As amostras de alho analisadas proveniente da microrregião de Picos-PI apresentaram condições higiênicas e sanitárias satisfatórias. Porém, uma amostra de alho importado apresentou condições higiênicas e sanitárias insatisfatórias. No entanto, vale destacar a presença dos gêneros fúngicos encontrados, sugerindo maior atenção no armazenamento e conservação.

## REFERÊNCIAS

1. Leonêz AC. Alho: Alimento e Saúde [monografia]. Brasília (DF): Universidade de Brasília (UnB), 2008.
2. Associação Nacional dos Produtores de Alho - ANAPA. Produtores do RS comemoram a qualidade do alho. 2013. [acesso 2015 Abr 17]. Disponível em: [http://www.anapa.com.br/simples/?p=1909].
3. Oliveira CM, Souza RJ, Mota JH, Yuri JE, Resende GM. Determinação do ponto de colheita na produção de alho. *Horticult Bras*. 2003;21(3):506-9.
4. Gutierrez ASD, Rocha IL. O Consumo de alho no Brasil. *Ver Nosso Alho*. 2014; n° 19 p. 30-31.
5. Amorim JRA, Fernandes PD, Gheyi HR, Azevedo NC. Efeito da salinidade e modo de aplicação da água de irrigação no crescimento e produção de alho. *Pesq Agropec Bras*. 2002;37(2):167-76. [DOI: 10.1590/S0100-204X2002000200008].
6. Carvalho W, Silva CAS, Vilela MAP, Meurer VM. Avaliação da qualidade e composição de temperos alho e sal industrializados, comercializados na cidade de Juiz de Fora. *Alim Nutr*.1998;9:39-52.

7. Graciano RAS, AtuiMB, Dimov MN. Avaliação das condições higiênico-sanitárias de cominho e pimenta do reino em pó comercializados em cidades do Estado de São Paulo, Brasil, mediante a presença de matérias estranhas. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2006;65(3):204-8.
8. International Commission on Microbiological Specifications for Foods - ICMSF. *Microbial Ecology of Foods*. v.2. New York: Academic Press, 1980.
9. Santos MRR, Cardoso Filho FC, Lima VBS, Sousa AWB, Caldas ML, Muratori MCS. Pesquisa de fungos produtores de ocratoxina A em granola comercializada. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2013;72(3):226-30.
10. Vecchia AD, Fortes RC. Contaminação fúngica em granola comercial. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2007;27(2):324-7. [DOI: 10.1590/S0101-20612007000200020].
11. Germano PML, Germano MIS. Importância e risco das especiarias. *Rev Hig Alim*. 1998;12(57):23-31.
12. Furlaneto L, Mendes S. Análise microbiológica de especiarias comercializadas em feira livre e em supermercados. *Alim Nutr*. 2004;15(2):87-91.
13. Germano PML, Germano MIS. *Higiene e vigilância sanitária de alimentos*. 3 ed. Barueri(SP): Manole; 2008.
14. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 18 setembro 2003. Seção 1, p.14.
15. Pitt JI, Hocking AD. *Fungi and spoliage*. 2 ed. London: Blackie academic and Professional, 1999.
16. Dalcero A, Magnoli C, Chiacchiera S, Palacios G, Reynoso M. Mycoflora and incidence of aflatoxin B1, zearalenone and deoxynivalenol in poultry feeds in Argentina. *Mycopathologia*. 1997;137(3):179-84.
17. Dalcero A, Magnoli C, Luna M, Ancasi G, Reynoso M, Chiacchiera S. Mycoflora and naturally occurring mycotoxins in poultry feeds in Argentina. *Mycopathologia*. 1998;141(1):37-43.
18. Leite IC, Freitas JR, Reis MJB, Silva VA. Análise microbiológica de condimento pronto produzido em Feira de Santana. 2011. [acesso 2015 Abr 17]. Disponível em: [<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAe590AF/microbiologia-processos>].
19. Centers for Disease Control and Prevention - CDC. Foodborne Illness, Foodborne Disease, (sometimes called "Food Poisoning") 2012. [acesso 2015 Out 02]. Disponível em: [<http://www.cdc.gov/foodsafety/facts.html#howmanycases>].
20. Garcia M. Surtos Alimentares no Brasil – dados atualizados em 2013. *Food Safety Brazil: Segurança de Alimentos*. 2013. [acesso 2015 Out 02]. Disponível em: [<http://foodsafetybrazil.com/surtos-alimentares-no-brasil-dados-atualizados-em-2013>].
21. 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] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 02 jan. 2001. Seção 1, nº 7-E. p.45-53.
22. Berbari SAG, Silveira NFA, Oliveira LAT. Avaliação do comportamento de pasta de alho durante o armazenamento (*Allium sativum* L.). *Cienc Tecnol Aliment*. 2003;23(3):468-72. [DOI: 10.1590/S0101-20612003000300029].
23. Silva LP, Alves AR, Borba CM, Mobin M. Contaminação fúngica em condimentos de feiras livres e supermercados. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2012; 71(1):202-6.
24. Souza JCR, Barros GC, Mendes ES, Mendes PP, Alves CAB. Avaliação microbiológica de condimentos artesanais e industrializados da grande Recife, PE. *Hig Aliment*. 2006;20(145):105-8.

# Parâmetros de qualidade de polpas de frutas congeladas

## Parameters of quality of frozen fruit

RIALA6/1677

Tânia Maria Neves CASTRO<sup>1</sup>, Pâmella Volpato ZAMBONI<sup>2</sup>, Sílvia DOVADONI<sup>1</sup>, Adelino CUNHA NETO<sup>1</sup>, Luiz José RODRIGUES<sup>1\*</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Departamento de Alimentos e Nutrição (DAN), Faculdade de Nutrição (FANUT), Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT). Av. Fernando Corrêa da Costa, 2367, Bloco CCBS I, Bairro Boa Esperança, Cuiabá, MT, Brasil. CEP: 78060-900. Tel: 65 3615-8811. E-mail: rodrigues.lui3@uol.com.br

<sup>2</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso (IFMT), Campus Bela Vista, Cuiabá, MT

Recebido: 27.03.2015 - Aceito para publicação: 30.12.2015

### RESUMO

Neste trabalho foram avaliadas as qualidades microbiológica, física e química de polpas de frutas congeladas de diferentes sabores e marcas, comercializadas no município de Cuiabá - MT. O experimento foi conduzido em DIC, disposto em um arranjo fatorial 3 x 2, em amostras de três marcas (X, Y e Z) de dois períodos de coletas (junho/2014 e outubro/2014), e em triplicata. Foram realizadas análises de: coliformes a 35 °C e a 45 °C, *Salmonella* spp., fungos filamentosos e leveduras, cor (L\*a\*b\*), pH, acidez titulável, sólidos solúveis, *ratio* e vitamina C. Todas as amostras de polpas de frutas congeladas analisadas, independentemente do sabor, da marca e do período de coleta, não apresentaram contagens de coliformes a 35 °C e a 45 °C, tampouco houve isolamento de *Salmonella* spp.; e baixas contagens de fungos filamentosos e leveduras foram detectadas. Houve variações dos valores de cor (L\*a\*b\*), pH, acidez titulável, sólidos solúveis, *ratio* e vitamina C entre as marcas e os períodos de coletas em todas as amostras de polpas de frutas analisadas. Algumas amostras de polpas demonstraram valores fora dos limites preconizados pela IN nº 1 de 7 de janeiro de 2000 do MAPA, que indicaram padrões de identidade e de qualidade deficientes.

**Palavras-chave.** refrigeração, microbiota contaminante, parâmetros físicos e químicos.

### ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the microbiological, physical and chemical qualities of frozen fruit pulp of different flavors and brands, marketed in the city of Cuiabá - MT. The experiment was conducted in DIC, arranged by a 3 x 2 factorial scheme, using samples from three brands (X, Y and Z) and from two sample collecting periods (June/2014 and October/2014) and in triplicate. The following analyses were performed: coliforms at 35 °C and 45 °C, *Salmonella*, yeasts and molds, color (L\*a\*b\*), pH, titratable acidity, soluble solids, ratio and vitamin C. All of the analyzed frozen fruit pulp samples, regardless of the flavor, the brand and the sampling period, none of them showed coliforms at 35 °C and 45 °C, and no *Salmonella* either; and low counts of filamentous fungi and yeasts were found. Variations on the color (L\*a\*b\*), pH, titratable acidity, soluble solids, ratio and vitamin C values were found among the brands and sampling periods of all of the analyzed fruit pulps samples. Some samples showed values which did not follow the limits prescribed by the NI nº 1 of 7 January 2000 of the MAPA, indicating unsatisfactory identity and quality standards.

**Keywords.** refrigeration, microbial contaminants, physical and chemical parameters.

## INTRODUÇÃO

Apesar do crescimento do mercado de polpas de frutas congeladas, a qualidade desses produtos não acompanha essa tendência, fato esse que vem alertando várias entidades públicas e órgãos governamentais, na busca de produtos mais saudáveis sob o ponto de vista biológico e sem alterações pronunciadas em suas características sensoriais, evidenciadas por modificações nos seus parâmetros químicos e bioquímicos, em virtude, provavelmente, de problemas decorrentes de deficiências na matéria-prima, no processamento e/ou no armazenamento do produto<sup>1</sup>.

A produção de polpas de frutas congeladas surge como excelente alternativa no aproveitamento do excedente desses vegetais, podendo ser elaborada nas épocas de safra e permitindo a oferta das polpas nos períodos de entressafra, evitando os problemas ligados à sazonalidade.

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), polpa é o produto não fermentado, não concentrado ou diluído, obtido pelo esmagamento de frutos polposos<sup>2</sup>. Além disso, devem ser preparadas com frutas sãs, limpas, isentas de matéria terrosa, de parasitas e detritos de animais ou vegetal. Não deverão conter fragmentos das partes não comestíveis da fruta, nem substâncias estranhas à sua composição normal, devendo ser observada também a presença ou ausência de sujidades, parasitas e larvas.

A conscientização do consumidor quanto às vantagens de uma alimentação saudável baseada em uma dieta rica em frutas, com alto valor nutricional e ampla variedade de sabores, têm incrementado a demanda de polpa de frutas congeladas no mercado, além de embalagens práticas congeláveis, dispensando uso de aditivos químicos, preservando as propriedades originais da fruta, igualando a alimentação saudável à praticidade que os tempos modernos exigem<sup>3</sup>.

A qualidade da polpa congelada está relacionada à preservação dos nutrientes e às suas características microbiológicas, físicas, químicas e sensoriais, que devem ser próximas

da fruta *in natura*, de forma a atender as exigências do consumidor e da legislação vigente. Tais características não podem ser alteradas pelos equipamentos, utensílios, recipientes e embalagens utilizadas durante o seu processamento e comercialização<sup>4</sup>.

Os requisitos microbiológicos são alvos a serem considerados na qualidade de polpas de frutas congeladas, a fim de se avaliar a presença de micro-organismos, condições de higiene em que os alimentos são preparados, os riscos que o alimento pode oferecer à saúde do consumidor e a vida prateleira do produto.

O controle de qualidade, no que diz respeito aos parâmetros físicos e químicos de polpas de frutas congeladas, como cor, pH, sólidos solúveis, acidez titulável e vitamina C, também devem ser considerados, uma vez que são muito importantes na padronização do produto e na análise de alterações ocorridas durante o processamento e o armazenamento.

A cadeia de frio para polpas de frutas congeladas deve ser respeitada, de modo a não comprometer a qualidade do produto, preservando suas qualidades sensoriais (aroma, cor, sabor e consistência), prevenindo o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e a ocorrência de reações químicas e enzimáticas indesejáveis<sup>5</sup>.

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica, física e química de polpas de frutas pasteurizadas e congeladas, coletadas em diferentes períodos, de marcas processadas em diferentes regiões do Brasil e comercializadas no município de Cuiabá – MT.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção das amostras

Para a condução da pesquisa foram amostradas diferentes marcas comerciais de polpas de frutas pasteurizadas e congeladas, provenientes de indústrias localizadas em três estados do Brasil (Bahia, Mato Grosso e Paraná). As amostras foram adquiridas, em triplicata, nos meses de junho de 2014 (1ª coleta) e outubro de 2014 (2ª coleta), em diferentes estabelecimentos

comerciais da cidade de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil.

As amostras foram transportadas em suas embalagens originais e íntegras, em caixa térmica para o Laboratório de Tecnologia de Alimentos, da Faculdade de Nutrição - FANUT, da Universidade Federal de Mato Grosso - UFMT, Cuiabá - MT, sendo mantidas congeladas em freezer vertical na temperatura de -18 °C, para posteriores análises.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), disposto em um arranjo fatorial 3 x 2, ou seja, 3 níveis do fator marcas (X, Y e Z) e 2 níveis do fator períodos de coletas (Junho/2014 e Outubro/2014), com 3 repetições. As polpas de frutas congeladas das diferentes marcas, foram coletadas nos sabores acerola, goiaba e maracujá, sendo que para resguardar a identidade das empresas avaliadas, estas foram identificadas pelas letras X, Y, e Z. Cada amostra foi identificada quanto à origem, número do lote, data de fabricação e data de validade, procurando reunir as mesmas características em cada período de coleta. A parcela experimental foi representada por 3 embalagens de 100 g, analisadas em sistema de *pool* (homogenato das três amostras da parcela experimental, de mesma marca, sabor, lote e coleta), perfazendo um total de 54 amostras.

Previamente às análises, as amostras foram descongeladas nas embalagens originais do produto, em geladeira (2-5 °C) por 18 horas, em seguida, as amostras foram homogeneizadas por agitação e deixadas em repouso para estabelecer o equilíbrio com a temperatura ambiente.

### **Análises microbiológicas**

Asépticamente se retirou uma alíquota de 25 g de polpa que foram inclusas em 225 mL de solução salina peptonada 0,1 % (p/v) esterilizada, contida em saco plástico estéril para *Stomacher* de 720 mL (Hexis Científica® S/A, Brasil) e processadas em homogeneizador de amostras *Stomacher* (Marconi®, Brasil), durante 60 segundos. Posteriormente diluídas 10, 100 e 1000 vezes, para análise de coliformes e fungos. Todas as análises foram realizadas segundo a *Internacional*

*Commission on Microbiological Specification for Foods Method* - ICMSF<sup>6</sup> e Silva et al<sup>7</sup>.

Os coliformes, 35 °C e 45 °C, foram determinados através de análise de tubos múltiplos com séries de três tubos de caldo lauril sulfato triptose (Himedia®, Mumbai, Índia), análise presuntiva, confirmatória em caldo verde brilhante bile a 2 %, e caldo *Escherichia coli* (Himedia®, Mumbai, Índia), incubados pelo período de 24/48 horas, e os resultados expressos em log NMP.g<sup>-1</sup>, (ICMSF<sup>6</sup> e Silva et al<sup>7</sup>).

A enumeração de fungos filamentosos e leveduras foi realizada utilizando-se o método contagem direta por plaqueamento em profundidade e os resultados expressos em log UFC.g<sup>-1</sup>.

Pesquisa de *Salmonella* spp. compreendeu três fases: pré - enriquecimento em água peptonada tamponada (Himedia®, Mumbai, Índia), enriquecimento seletivo em caldo de Rappaport-Vassiliadis (RV) de caldo tetratoato (TT), (Himedia®, Mumbai, Índia), e o isolamento diferencial em Rambach agar (Merck®, Alemanha), e agar verde brilhante (Himedia®, Mumbai, Índia), as colônias suspeitas *Salmonella* foram submetidas a provas bioquímicas para identificação (ICMSF<sup>8</sup> e Silva et al.<sup>9</sup>).

### **Análises físicas e químicas**

Os valores das coordenadas de cor das polpas de frutas foram determinados com o auxílio do colorímetro Minolta, modelo CR-400, com iluminante D65 e no sistema CIE L\*a\*b\*. As leituras dos valores L\*, a\* e b\* foram feitas de forma aleatória nos lados opostos das três embalagens dos produtos de cada repetição.

As análises de acidez titulável (AT), pH e sólidos solúveis (SS) foram realizadas na polpa sem diluição e após o seu descongelamento. A determinação de AT (% de ácido cítrico) foi realizada por titulação com solução de NaOH 0,1 N, utilizando como indicador a fenolftaleína<sup>10</sup>. Os SS foram determinados por refratometria, utilizando-se refratômetro digital, marca RR 11 - Nr 19501<sup>11</sup>.

A determinação do ratio foi realizada pela relação entre sólidos solúveis e acidez titulável, feita por meio da operação algébrica de divisão de

valores encontrados para essas variáveis, segundo a técnica estabelecida nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz<sup>10</sup>, sendo os resultados expressos em números absolutos.

A determinação do teor de vitamina C seguiu as recomendações do Instituto Adolfo Lutz<sup>10</sup>, pelo método volumétrico de Tillmans, com os resultados expressos em miligramas de ácido ascórbico por 100 g de polpa de fruta.

### Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa estatístico SISVAR 4.3<sup>12</sup>. Após a análise de variância dos resultados obtidos, observou-se o nível de significância do teste F. As médias dos tratamentos, quando significativas, foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5 % de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Análises microbiológicas

As 54 amostras avaliadas se apresentaram dentro dos limites da Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que preconiza para polpas de frutas congeladas, limite máximo de  $5 \times 10^2$  NMP/g (2,7 ciclos log) para coliformes a 45 °C e ausência de *Salmonella* spp. em 25 g do produto<sup>13</sup>, independentemente do sabor, da marca e do período de coleta.

A ausência da contagem de micro-organismos do grupo dos coliformes e de *Salmonella* spp. nas polpas de frutas está associada à qualidade satisfatória do produto, que se dá, possivelmente, por meio de adequada aplicação das técnicas de processamento e/ou armazenamento. Outros autores apresentaram resultados semelhantes<sup>13-15</sup>, indicando que esse comportamento se deve à manipulação correta da matéria prima no processamento das polpas de frutas congeladas.

A RDC nº 12, de 2001 da ANVISA<sup>13</sup>, não estabelece limites para fungos filamentosos e leveduras, contudo, o MAPA, por meio da Instrução Normativa nº 1, de 7 de janeiro de 2000, limita esses microrganismos numa contagem de  $2 \times 10^3$  UFC/g (log 3,30 UFC/g) para polpa de fruta que sofreu tratamento térmico

e/ou conservada quimicamente<sup>4</sup>. Considerando os valores encontrados para essa variável no presente trabalho (Tabela 1), todas as amostras analisadas estão dentro dos limites preconizados. As baixas contagens de fungos filamentosos e leveduras em alimentos frescos e congelados são consideradas normais, enquanto que, elevados valores representam, além do aspecto deteriorante, que resulta em rejeição do produto pelo consumidor, riscos à saúde pública devido à possível produção de micotoxinas por algumas espécies de fungos, podendo crescer e produzir toxinas em alimentos submetidos a processos tecnológicos, devido a sua resistência ao calor, ao congelamento, alguns antibióticos e irradiação<sup>15</sup>. É importante ressaltar ainda, que estratégias de sanitização e condições adequadas de temperatura na conservação das polpas reduzem sua microbiota normal, além das temperaturas de pasteurização, que controlam o crescimento de alguns patógenos, acreditando que essas ações influenciaram no controle da microbiota das polpas de frutas analisadas nesse trabalho. As polpas de frutas contêm altos teores de água e de açúcares, o que favorece o desenvolvimento microbiano, mas a pasteurização mostrou-se eficiente em inibir o crescimento de fungos filamentosos e leveduras.

As contagens de fungos filamentosos e leveduras estavam abaixo do limite máximo aceitável<sup>4</sup>, no entanto, podemos observar nos resultados encontrados que estes micro-organismos foram afetados significativamente ( $p \leq 0,05$ ), pela interação períodos de coleta: junho/2014 (outono) e outubro/2014 (inverno) entre as marcas (X, Y e Z) das polpas de frutas congeladas (Tabela 1). As polpas da marca X, proveniente da região Sul, apresentaram contagens maiores no 1º período de coleta, sendo exceção a polpa de acerola com contagens elevadas no 2º período. As polpas de frutas das marcas Y e Z mostraram uma homogeneidade de elevadas contagens no 1º período em relação ao 2º, marcas correspondentes às regiões Centro-Oeste e Nordeste, respectivamente. Observando as contagens destes micro-organismos em relação aos sabores, verifica-se que nas polpas de goiaba e acerola produzidas pelo fabricante Y

**Tabela 1.** Valores médios de fungos filamentosos e leveduras (log UFC.g<sup>-1</sup>) de marcas de polpas de frutas congeladas coletadas em diferentes períodos

Polpas de frutas	Marcas	Fungos filamentosos e leveduras (log UFC.g <sup>-1</sup> )	
		Períodos de coletas	
		Jun/2014	Out/2014
Acerola	X	0,54bA	1,57cB
	Y	0,37aB	0,20bA
	Z	0,69cB	0,11aA
Goiaba	X	0,82bB	0,70cA
	Y	0,12aA	0,09bA
	Z	1,10cB	0,03aA
Maracujá	X	0,48aB	0,44cA
	Y	0,63bB	0,26bA
	Z	1,46cB	0,10aA
CV (%)	3,82		
MAPA***		Máximo de 2 X 10 <sup>3</sup> UFC.g <sup>-1</sup> (log 3,30 UFC.g <sup>-1</sup> )	

\*Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna, representam semelhança estatística entre as marcas (X, Y e Z), a 5 % de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott; \*\*Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha, representam semelhança estatística entre os períodos de coleta (Junho/2014 e Outubro/2014), a 5 % de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott; \*\*\*MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Instrução Normativa nº 1, de 7/01/2000

foram detectadas baixas contagens, tanto no 1º, quanto no 2º período de coletas (Tabela 1). Segundo o CPTEC/INPE (Centro de Previsão do Tempo e Estudos Climáticos/Instituto de Pesquisa Espacial), na região nordeste, na estação do outono há um aumento nas chuvas e diminuição na temperatura, na primavera acontece à seca e a manutenção de temperaturas elevadas nesta região. Nas regiões sul e centro-oeste, no outono apresentam baixos índices pluviométricos, e baixas temperaturas, na primavera chuvas intensas no centro-oeste e intermitentes no sul, com uma elevação gradativa na temperatura (CPTEC/INPE<sup>16</sup>). Talvez estes fatores associados às condições de higiene ambiental influenciem nas contagens, justificando assim os resultados obtidos pelo fabricante Y nos produtos dos dois períodos.

### Análises físicas e químicas

A avaliação das coordenadas de cor, por meio dos valores L\*, a\* e b\*, foi afetada significativamente pelas marcas das polpas de frutas congeladas, não sendo influenciada pela coleta, tampouco pela interação entre marcas das polpas de frutas congeladas e tempos de coleta ( $p \leq 0,05$ ) (Tabela 2).

Na polpa de fruta congelada sabor acerola, os valores de L\*, a\* e b\* apresentaram-se

estatisticamente diferentes entre as marcas X, Y e Z, com os maiores valores de L\* e b\* encontrados na marca Z, proveniente da região Nordeste, e maiores valores de a\* na marca X, advinda da região Sul. Já nas polpas de frutas congeladas nos sabores goiaba e maracujá, pôde-se observar comportamento semelhante, sendo que os valores de L\* e b\* foram maiores nas marcas Y e Z, não diferindo estatisticamente entre si; e a marca Z apresentando o maior valor da variável a\*; com X e Y semelhantes estatisticamente (Tabela 2).

A cor é um atributo de qualidade importante tanto para frutos *in natura* quanto aos produtos pós-processamento, sendo um fator decisivo na escolha do produto pelo consumidor<sup>17</sup>. A determinação instrumental da cor em polpas de frutas congeladas, medida por meio dos parâmetros L\*, a\* e b\*, torna-se de grande valia na avaliação de qualidade desses produtos, sendo que variações nos valores desses parâmetros podem representar diferenças, sobretudo, na época de colheita e no estágio de maturação da matéria-prima<sup>18</sup>.

Possivelmente, as diferenças encontradas entre as marcas X, Y e Z nas polpas congeladas nos sabores acerola, goiaba e maracujá, se devem ao estágio de maturação desses frutos à época da colheita, tendo relação direta com a cor do produto

**Tabela 2.** Valores médios de cor (valores L\* a\* e b\*) de diferentes marcas de polpas de frutas congeladas

Polpas de frutas	Marcas								
	L*			a*			b*		
	X	Y	Z	X	Y	Z	X	Y	Z
Acerola	37,73b	35,43a	46,04c	19,96c	17,19b	8,91a	20,15b	17,20a	32,56c
Goiaba	40,70a	46,69b	45,02b	16,19a	15,38a	20,50b	19,53a	23,51b	24,94b
Maracujá	41,34a	49,36b	50,86b	0,84a	0,82a	3,95b	33,04a	39,88b	41,70b
CV (%)	4,22			7,97			9,68		

\*Médias seguidas da mesma letra, representam semelhança estatística entre as marcas (X, Y e Z), a 5 % de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott

final. A coloração dos vegetais pode pertencer a três classes principais: carotenoides, antocianinas e clorofila. Portanto, a coloração das frutas é resultante dos pigmentos clorofila e carotenoides presentes nos cloroplastos e cromoplastos, bem como dos pigmentos fenólicos (antocianinas, flavonóis e protocianinas) presentes nos vacúolos; no caso da acerola, goiaba e maracujá, representado principalmente, pelos carotenoides, presentes por meio dos ésteres de xantofila e caroteno, responsáveis pela cor amarela (coordenada b\*) das frutas maduras e as antocianinas que conferem as cores vermelha e violeta (coordenada a\*), sendo que esses pigmentos podem estar presentes em maiores teores em função do seu estágio de maturação na colheita<sup>6,7</sup>.

Pereira et al<sup>15</sup> e Benevides et al<sup>18</sup>, trabalhando com a avaliação da qualidade de diferentes polpas de frutas congeladas, observaram que as marcas também promoveram diferenças significativas em relação aos parâmetros L\*a\* e b\* nos produtos, vindo ao encontro dos resultados detectados no presente trabalho. Esses autores ainda creditam essa diferença entre as marcas, devido a possíveis variações climáticas, no ponto de colheita, resultando em diferenças nos teores pigmentos presentes nos frutos.

Neves<sup>19</sup>, verificando a estabilidade de polpa congelada de acerola, obteve valores de L\* variando de 36,79 a 47,50; a\* de 6,59 a 14,20 e b\* 16,93 a 23,06. Pereira et al<sup>15</sup>, avaliando a cor na polpa congelada de goiaba, encontrou valores de L\* variando de 47,89 a 45,82; a\* de 22,79 a 15,47; e b\* de 14,77 a 10,94, entre as marcas. Vianna-Silva<sup>30</sup>, determinando a qualidade de suco de maracujá, mostrou as coordenadas L\* a\* e b\* variando de 44,51 a 46,01; 4,38 a 7,94; 38,97 a 39,28, respectivamente. Baseado nesses autores,

os valores do presente trabalho se encontram discrepantes para a polpa de goiaba na marca X e polpa de maracujá em todas as marcas na cor L\*; para a polpa de acerola nas marcas X e Y e polpa de maracujá em todas as marca na cor a\*; para a polpa de acerola na marca Z, polpa de goiaba e de maracujá em todas as marcas para a cor b\*, o que corrobora para indicar diferenças na matéria-prima, sobretudo, em relação ao índice de maturidade.

As variáveis pH, acidez titulável (AT) e sólidos solúveis (SS) foram afetadas significativamente pela interação períodos de coleta (junho/2014 e outubro/2014) e marcas (X, Y e Z) das polpas de frutas congeladas ( $p \leq 0,05$ ) (Tabela 3). As polpas congeladas nos sabores acerola, goiaba e maracujá apresentaram maiores valores de pH, AT e SS no 2º período de coleta quando comparados com o 1º período, independentemente da marca avaliada. No sabor acerola, nos 1º e 2º períodos de coleta, os maiores valores de pH, AT e SS foram apresentados pelas marcas Y, Z e X, respectivamente, sendo que as demais marcas foram semelhantes em cada variável, à exceção do SS, que diferiram entre si em ambos os períodos. Já no sabor goiaba, no 1º período de coleta, os maiores valores de pH, AT e SS foram apresentados pelas marcas X, Z e Y, respectivamente, enquanto que, no 2º período de coleta, os maiores valores dessas variáveis foram promovidos pelas marcas X, X e Y, respectivamente, sendo que as outras marcas foram diferentes em cada variável, à exceção da AT, em que as marcas X e Y foram semelhantes em ambos os períodos. Nas polpas congeladas no sabor maracujá, as marcas Z, X e X apresentaram os maiores valores de pH, AT e SS, respectivamente, na 1ª coleta, sendo que os mesmos parâmetros avaliados na 2ª coleta foram

majoritários nas marcas X para pH, X para AT e Y para SS (Tabela 3).

As oscilações observadas nas variáveis pH, acidez titulável e sólidos solúveis entre as marcas e os períodos de coleta, podem indicar deficiências quanto ao controle de qualidade da matéria-prima utilizada nas indústrias de polpas. Essas diferenças nos constituintes em polpas de frutas se devem ainda, a procedência do fruto (solo, estação do ano, sistema de produção, maturação) e ao manuseio (transporte, acondicionamento, processamento e armazenamento)<sup>18</sup>.

Alguns autores discorrem sobre importantes variações na qualidade de polpas de frutas congeladas, seja entre os períodos de coleta das amostras, seja pelas marcas obtidas para avaliação, cujos trabalhos apresentaram resultados semelhantes aos encontrados na presente pesquisa, para os valores de pH, AT e SS<sup>19,20,21</sup>.

A indústria de alimentos utiliza o efeito do pH sobre os micro-organismos, para a preservação dos alimentos. O grau de acidez dos alimentos tem uma influência na determinação da microbiota alterante, principalmente no que se refere aos alimentos com baixo pH<sup>20</sup>. Assim, pode-se dizer que os baixos valores de pH encontrados no trabalho tenham contribuído sensivelmente para as diminutas contagens de bolores e leveduras

e a ausência de bactérias (*Salmonella* sp. e coliformes a 5 °C), averiguadas nas polpas de frutas congeladas nos diferentes sabores.

A acidez é um parâmetro importante na apreciação do estado de conservação de um produto alimentício. Geralmente, um processo de decomposição do alimento, seja por hidrólise, oxidação ou fermentação, altera quase sempre a concentração dos íons de hidrogênio, e por consequência a sua acidez<sup>22</sup>.

Os ácidos orgânicos são produtos intermediários do metabolismo respiratório dos frutos e são muito importantes do ponto de vista do sabor e odor. De forma geral, a acidez diminui com o processo de maturação do fruto, estando presentes em alimentos e influenciam o sabor, odor, cor, estabilidade e a manutenção de qualidade<sup>18</sup>.

Os sólidos solúveis são usados como índice de maturidade de alguns frutos e indica a quantidade de substâncias que se encontram dissolvidas no suco, sendo constituídos por compostos solúveis em água, que representam substâncias, tais como: açúcares, ácidos, fenólicos, vitaminas, orgânicos e pectinas<sup>18,23</sup>.

O teor de sólidos solúveis pode variar com a quantidade de chuva durante a safra, fatores climáticos, variedade, solo, tipo de processamento,

**Tabela 3.** Valores médios de pH, acidez titulável - AT (% de ácido cítrico) e sólidos solúveis - SS (%) de marcas de polpas de frutas congeladas coletadas em diferentes períodos

Polpas de frutas	Marcas	Períodos de coletas					
		Jun/2014			Out/2014		
		pH	AT	SS	pH	AT	SS
Acerola	X	3,2aA	0,69aA	7,17cA	3,6aB	0,8aB	8,14cB
	Y	3,7bA	0,74aA	7,00bA	3,9bB	0,96bB	7,10bB
	Z	3,3a A	1,02bA	6,46aA	3,6aB	1,12cB	6,92aB
PIQ***		2,80	0,80	5,50	2,80	0,80	5,50
Goiaba	X	4,02cA	0,40aA	8,50bA	4,29bB	0,45aB	9,17aB
	Y	3,92bA	0,42aA	9,53cA	4,38cB	0,48aB	9,83bB
	Z	3,64aA	0,74bA	8,17aA	3,92aB	0,98bB	11,00cB
PIQ***		3,50	0,40	7,00	3,50	0,40	7,00
Maracujá	X	2,80aA	2,74bA	10,67cA	3,32cB	3,19cB	11,67aB
	Y	3,09bA	2,52aA	10,50bA	3,20bB	3,04bB	15,33cB
	Z	3,38cA	2,57aA	10,33aA	3,12aB	2,68aB	13,33bB
PIQ***		2,70	2,50	11,00	2,70	2,50	11,00
CV (%)		pH= 3,82 AT=2,08 SS=4,06					

\*Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna, representam semelhança estatística entre as marcas (X, Y e Z), a 5 % de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott; \*\*Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha, representam semelhança estatística entre os períodos de coleta (Junho/2014 e Outubro/2014), a 5 % de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott; \*\*\*PIQ, Padrão de Identidade e Qualidade - Instrução Normativa nº 1, de 7/01/2000

além da adição eventual de água durante o processamento, levando à diminuição dos teores de sólidos solúveis no produto final<sup>23</sup>.

Baseado na Instrução Normativa nº 1 de 7 de janeiro de 2000 do MAPA<sup>2</sup>, que dispõe sobre o Padrão de Identidade e Qualidade de polpas de frutas, o pH das marcas X e Y do 2º período de coleta (Outubro de 2014) das polpas no sabor goiaba, a acidez titulável das marcas X e Y do 1º período de coleta (Junho de 2014) das polpas no sabor acerola e os sólidos solúveis das marcas X, Y e Z do 1º período de coleta das polpas no sabor maracujá, mostraram-se fora dos limites preconizados por essa legislação, que estabelece valores na ordem de 3,5; 0,8 % de ácido cítrico e 11,0 %, para o pH da goiaba, a acidez titulável da acerola e os sólidos solúveis do maracujá, respectivamente, conforme Tabela 3. Contudo, alguns autores<sup>15</sup> salientam que, de maneira geral, as polpas de frutas em relação ao pH, devem apresentar essa variável abaixo de 4,5, para garantir sua conservação sem a necessidade de tratamento térmico muito elevado, para que assim não coloque em risco a sua qualidade.

Como mencionado anteriormente, teores de pH, AT e SS abaixo dos valores preconizados pela legislação podem estar associados a uma falta de padronização na maturação dos frutos.

A relação SS/AT (*ratio*) foi afetada significativamente pelo fator isolado marcas (X, Y e Z) das polpas de frutas congeladas ( $p \leq 0,05$ ) (Tabela 4). A polpa de fruta no sabor acerola da marca X apresentou maior valor de *ratio* quando comparado com as demais marcas, que diferiram entre si. Já para o sabor goiaba, os maiores valores da variável foram representados pelas marcas X e Y, estatisticamente semelhantes. Na polpa de maracujá, as marcas Y e Z mostraram-se com o *ratio* mais elevado (Tabela 4). Essas discrepâncias entre as marcas dentro de uma polpa de fruta no mesmo sabor mais uma vez ressaltam a não conformidade da qualidade do produto<sup>21</sup>. Valores de *ratio* afetados significativamente pelas marcas das polpas de frutas congeladas, também foram apresentados por diferentes pesquisadores<sup>15,7</sup>.

O *ratio* é uma das melhores formas de avaliação do sabor, maturação e palatabilidade dos frutos, a qual ocorre, em grande parte, devido

**Tabela 4.** Valores médios de *ratio* (SS/AT) de diferentes marcas de polpas de frutas congeladas

Polpas de frutas	Ratio (SS/AT)		
	Marcas		
	X	Y	Z
Acerola	11,74c	8,21b	6,69a
Goiaba	21,48b	23,00b	11,19a
Maracujá	3,77a	5,10b	5,30b
CV (%)	8,28		

\*Médias seguidas da mesma letra, representam semelhança estatística entre as marcas (X, Y e Z), a 5 % de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott

ao balanço de ácidos orgânicos e açúcares, sendo mais representativo que a mensuração destes parâmetros isoladamente. Quando esses valores são altos, significa que o fruto está em bom grau de maturação, pois o mesmo aumenta quando há decréscimo de acidez e alto conteúdo de SS, decorrentes da maturidade<sup>18</sup>.

A relação SS/AT de frutas é um indicativo usado para estabelecer o índice de colheita de alguns frutos, indicando a doçura dos frutos para seleção de uma melhor matéria-prima, ou seja, quanto maior for à razão SS/AT, mais doces serão as frutas<sup>18</sup>. Durante o amadurecimento ocorre a degradação dos ácidos orgânicos, pois há um aumento da concentração de enzimas como as hidrolases (amilases, celulasas, enzimas pectinolíticas), peroxidases e catalase, reduzindo assim a adstringência e o sabor ácido do fruto. A relação entre teor de sólidos totais (representado principalmente pelos açúcares) e a acidez da fruta aumenta, promovendo o sabor doce característico<sup>18</sup>.

Kader<sup>25</sup> discorre sobre o *ratio* de diversas frutas no estágio ideal de maturação, sendo que os valores para acerola podem variar de 6,0 a 14,0 %; para a goiaba de 10,00 a 16,00 % e maracujá de 3,0 a 6,0 %. Logo, as polpas de frutas congeladas no sabor goiaba nas marcas X e Y apresentaram índices de *ratio* acima dos valores sugeridos como estágio ideal de maturação para o fruto.

A vitamina C foi afetada significativamente pela interação períodos de coleta (junho/2014 e outubro/2014) e marcas (X, Y e Z) das polpas de frutas congeladas ( $p \leq 0,05$ ) (Tabela 5). Todas as polpas de frutas, nos sabores acerola, goiaba e maracujá, apresentaram teores de

vitamina C diferentes entre os períodos de coleta em todas as marcas analisadas. Seguindo essa mesma tendência, tanto no 1º período quanto no 2º período de coleta, as marcas X, Y e Z mostraram-se com valores de vitamina C diferentes para as polpas congeladas de acerola, goiaba e maracujá (Tabela 5).

As inúmeras diferenças nos teores de vitamina C observadas entre os períodos de coleta e as marcas das diferentes polpas de frutas podem estar geralmente associadas a fatores como influência ambiental (condições do solo, clima, regime pluvial) e grau de maturação, entre outros fatores pré e pós-colheita. Alguns autores apresentaram resultados semelhantes<sup>25,26</sup> aos encontrados no presente trabalho, indicando que os teores de ácido ascórbico podem variar dependendo do cultivar, local e manejo.

A vitamina C ou ácido ascórbico está distribuído na natureza em altas concentrações, principalmente nas frutas cítricas, sendo que seu teor difere com a variação da espécie, tipo de tecido, grau de maturação e procedência.

**Tabela 5.** Valores médios de vitamina C (mg.100 g<sup>-1</sup>) de marcas de polpas de frutas congeladas coletadas em diferentes períodos

Polpas de frutas	Marcas	Vitamina C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	
		Períodos de coletas	
		Jun./2014	Out./2014
Acerola	X	835,33aA	1187,33cB
	Y	949,00bB	754,00aA
	Z	1053,00cA	1196,33bB
PIQ***		800,00	800,00
Goiaba	X	21,28aB	19,95aA
	Y	35,26bB	24,45bA
	Z	28,00cA	34,45cB
PIQ***		40,00	40,00
Maracujá	X	8,97aA	10,55bB
	Y	16,38cB	13,20cA
	Z	11,66bB	5,85aA
PIQ***		NE	NE
CV (%)		3,82	

\*Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna, representam semelhança estatística entre as marcas (X, Y e Z), a 5 % de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott; \*\*Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha, representam semelhança estatística entre os períodos de coleta (Junho/2014 e Outubro/2014), a 5 % de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott; \*\*\*PIQ, Padrão de Identidade e Qualidade - Instrução Normativa nº 1, de 7/01/2000. NE- Não Existe

É um antioxidante de muito fácil degradabilidade, sendo reduzida desde o processamento e obtenção das polpas de frutas e também durante todo o armazenamento<sup>18</sup>.

De acordo com a Instrução Normativa nº 1 de 2000 do MAPA<sup>2</sup>, a marca Y do 2º período de coleta (Outubro de 2014) da polpa no sabor acerola e todas as amostras avaliadas da polpa no sabor goiaba estão fora dos limites estabelecidos para a vitamina C, < 800 mg.100 g<sup>-1</sup> e < 40 mg.100 g<sup>-1</sup>, respectivamente, indicando que essas amostras estão em desacordo com os padrões de identidade e qualidade desses frutos. Já para a polpa no sabor maracujá, a referida legislação não traz qualquer menção sobre os teores mínimo da variável (Tabela 5). Entretanto, quando comparado com os teores de vitamina C da polpa congelada de maracujá de diferentes marcas encontradas por alguns autores<sup>23,27</sup>; entre de 11,28 e 11,79 mg.100 g<sup>-1</sup>, os valores encontrados são inferiores, mostrando que houve degradação durante o processamento ou a comercialização.

O ácido ascórbico é o nutriente mais afetado pelo processamento de frutas, por isso sua retenção é frequentemente usada como indicativo da qualidade nutricional e até mesmo do estado de conservação dos alimentos<sup>28</sup>. Algumas vezes, até mesmo interações com outras substâncias presentes no alimento contribuem para a diminuição dos níveis de vitamina C. A destruição desta, por exemplo, pode ser catalisada pela lumiflavina, produto de degradação da vitamina B<sub>2</sub>, que pode ser induzida pela presença de aminas (pois reações de escurecimento ocorrem com o ácido ascórbico de forma semelhante às que ocorrem com a glicose e outros açúcares) ou ainda pela presença de enzimas como a ácido ascórbico oxidase<sup>27</sup>.

## CONCLUSÃO

Todas as amostras de polpas de frutas congeladas, independentemente da marca e do período de coleta, apresentam reduzidas contagens de micro-organismos, indicando condições higiênico-sanitárias satisfatórias.

Observou-se inúmeras diferenças nos

parâmetros de cor ( $L^*a^*b^*$ ) e nos valores de pH, acidez titulável, sólidos solúveis, ratio e vitamina C entre as marcas e os períodos de coletas de todas as amostras de polpas de frutas analisadas.

Algumas das amostras de polpas de frutas se encontraram fora dos limites preconizados pela Instrução Normativa nº 1 de 7 de janeiro de 2000 do MAPA, indicando padrões de identidade e qualidade deficientes, quer seja por fatores relacionados com as condições da matéria-prima, quer seja por fatores ligados aos transporte, ao processamento e embalagem.

## REFERÊNCIAS

1. Brunini MA, Oliveira AL, Varanda DB. Avaliação da qualidade de polpa de goiaba “Paluma” armazenada a -20 °C. *Rev Bras Frutic*. 2003;25(3):394-6.
2. Brasil. Ministério da Agricultura, Abastecimento e Pecuária. Instrução Normativa nº 01, de 07 de Janeiro de 2000. Aprova o Regulamento Técnico geral para fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para polpa de fruta. *Diário Oficial [da] União*. Brasília, DF, 10 jan. 2000. Seção 1, nº 06. p.54.
3. Bueno MS, Lopes MR, Graciano RAS, Fernandes ECB, Cruz CHG. Avaliação da qualidade de polpas de frutas congeladas. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2002;61(2):121-6.
4. Batista AGB, Oliveira BD, Oliveira MA, Guedes TJG, Silva DF, Pinto NAVD. Parâmetros de qualidade de polpas de frutas congeladas: uma abordagem para produção do agronegócio familiar no Alto Vale do Jequitinhonha. *Tecnol Ciên Agropec*. 2013;7(4):49-54.
5. Evangelista RM, Vieites RL. Avaliação da qualidade de polpa de goiaba congelada, comercializada na cidade de São Paulo. *Seg Alim Nutric*. 2006;13(2):76-81.
6. Matta VM, Junior MF, Cabral LMC, Furtado AAL. Polpa de fruta congelada. 1ª ed. Brasília (DF): Embrapa Informação Tecnológica, 2005. [acesso 2014 Mai 16]. Disponível em: [http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/114308/1/00076180.pdf].
7. International Commission on Microbiological Specifications for Foods - ICMSE. *Microorganisms in Foods*. Toronto: University of Toronto Press; 2000.
8. Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA, Taniwaki MH, Santos RFS, Gomes RAR. *Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimento e Água*. 4ª ed. São Paulo (SP): Livraria Varela; 2010.
9. 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 [acesso 2014 Jan 22]. Disponível em: [http://www.ial.sp.gov.br/index.php?option=com\_remository&Itemid=7&func=select&orderby=1&Itemid=7].
10. Association of Official Analytical Chemists - AOAC. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. Arlington: AOAC International, 2000.
11. Ferreira DF. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows 4.3. 45ª Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria; julho de 2000; São Carlos: UFSCAR. p.255-8.
12. 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.
13. Benevides SD, Ramos AM, Stringheta PC, Castro VC. Qualidade da manga e polpa da manga Ubá. *Ciênc Tecnol Alim*. 2008;28(3):571-8. [DOI: 10.1590/S0101-20612008000300011].
14. Lima RMT, Figueiredo RW, Maia GA, Souza PHM, Figueiredo EAT, Rodrigues CS. Estabilidade química, físico-química e microbiológica de polpas de acerola pasteurizadas e não pasteurizadas de cultivo orgânico. *Ciênc Rural*. 2011;42(2):367-73. [DOI: 10.1590/S0103-84782012005000005].

15. Santos CAA, Coelho AFS, Carreiro SC. Avaliação microbiológica de polpas de frutas congeladas. *Ciênc Tecnol Alim*. 2008;28(4):913-15. [DOI: 10.1590/S0101-20612008000400023].
16. Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos, Instituto de Pesquisa Espacial-CPTEC/INPE. Estações do ano. [acesso 2014 Nov 06]. Disponível em [ww.clima1.cptec.inpe.br/estacoes/].
17. Sebastiany E, Rego ER, Vital MJS. Qualidade microbiológica de polpas de frutas congeladas. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2009;68(2):224-31.
18. Pereira JMATK, Oliveira KAM, Soares NFF, Gonçalves MPJC, Pinto CLO, Fontes EAF. Avaliação da qualidade físico-química, microbiológica e microscópica de polpas de frutas congeladas comercializadas na cidade de Viçosa-MG. *Alim Nutr*. 2006;17(4): 437-42.
19. Neves MVM, Lima VLAG. Efeito do congelamento sobre a estabilidade de polpa de acerola adicionada de extrato comercial de própolis. *Alim Nutr*. 2009;20(1): 87-94.
20. Raimundo K, Magri RS, Simionato EMRS, Sampaio AC. Avaliação física e química da polpa de maracujá congelada comercializada na região de Bauru. *Rev Bras Frutic*. 2009;31(2):539-43. [DOI: 10.1590/S0100-29452009000200031].
21. Paglarini CS, Silva FS, Porto AG, Santos P, Leite ALMP. Avaliação físico-química de polpas de frutas congeladas comercializadas na região do médio norte mato-grossense. *Encicl Biosfera*. 2011;7(13):1391-8.
22. Aroucha EMM, Gois VA, Leite RHL, Santos MCA, Souza MS. Acidez em frutas e hortaliças. *Rev Verde*. 2010;5(2):1-4.
23. Chitarra MIF, Chitarra AB. Pós-colheita de frutos e hortaliças: Fisiologia e Manuseio. 2ª ed. Lavras (MG): Editora UFLA; 2005.
24. Urbano GR, Zeponi J, Seibel NF, Sakanata LS. Avaliação de parâmetros de qualidade físico-química e microbiológica de polpa de acerola congelada. *RETEC*. 2011;4(2):1-10.
25. Kader A A. Postharvest biology and technology: an overview. *In: Postharvest technology of horticultural crops*. 3. ed. California: University of California; 2002.p.435-61.
26. Caldas ZTC, Araújo FMCM, Machado AV, Almeida AKL, Alves FMS. Investigação de qualidade das polpas de frutas congeladas comercializadas nos estados da Paraíba e Rio Grande do Norte. *Rev Verde*. 2010; 5(4): 156-63.
27. Silva JWP, Silva NA, Borges DO, Santos CGP, Rodrigues LM. Estudo de parâmetros físico-químicos de qualidade para polpas de acerola, abacaxi e maracujá. *FAZU Rev*. 2011;8:89-94.
28. Oliveira ES, Barbosa JB, Talma SV, Pereira SMF. Qualidade de polpas de frutas congeladas comercializadas em Campos de Goytacazes – RJ. *Rev Vértices*. 2012;14(1):73-80. [DOI: 10.5935/1809-2667.20120004].
29. Pérez AG, Olías R, Espada J, Olías JM, Sanz C. Rapid determination of sugar, nonvolatile acids and ascorbic acid in strawberry and other fruits. *J Agric Food Chem*. 1997;45(9):3545-49. [DOI: 10.1021/jf9701704].

## Detection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* by PCR in samples collected by scraping the lesion edges from patients of an endemic area

## Detecção de *Leishmania (Viannia) braziliensis* por PCR em amostras coletadas por raspagem de bordas de lesões de pacientes de uma área endêmica

RIALA6/1678

Aparecida Helena de Souza GOMES<sup>1</sup>, Izabel Madornado ARMELIN<sup>1</sup>, Vera Lucia PEREIRA-CHIOCCOLA<sup>2\*</sup>

\*Corresponding author: <sup>2</sup>Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas, Centro de Parasitologia e Micologia, Instituto Adolfo Lutz. Av. Dr Arnaldo, 351, 8º andar, São Paulo, SP, Brazil. CEP: 01246-000. Tel: 11 3068 2991. Fax: 3068 2890. E-mail: pchioccola@gmail.com

<sup>1</sup>Centro de Laboratório Regional de Sorocaba, Instituto Adolfo Lutz

Recebido: 30.06.2015 - Aceito para publicação: 22.12.2015

### ABSTRACT

American cutaneous leishmaniasis (ACL) is an infectious disease caused by *Leishmania*. Their diagnosis is performed in samples collected from the lesion biopsies, which has to be performed by physicians. For simplifying the sample collection, this study proposes a minimally invasive procedure, by scraping the lesion edges. Laboratory diagnosis by PCR was performed and compared with the microscopic examination, by analyzing 28 samples collected from patients with suspicion of ACL. Sample collected from the lesion edge with a sterile toothpick was divided into two aliquots. One aliquot was analyzed under direct microscopy, and the second by PCR, by using two primer pairs (one for *Leishmania* genus and other for *L. (V.) braziliensis*). Of 28 samples, 27 (96.43 %) showed concordant results in both methodologies (eight positive and 20 negative). The PCR methodology is an invaluable tool: (i) to determine the *Leishmania* species; (ii) to provide an alternative procedure of sample collection, when an authorized professional is not available in the respective health service; and (iii) to propose a minimally invasive procedure for collecting biological material.

**Keywords.** American cutaneous leishmaniasis, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, PCR.

### RESUMO

Leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença infecciosa causada por *Leishmania*. O diagnóstico é realizado em material de biópsias das lesões, cuja coleta é feita por médicos. Para simplificar a coleta de amostra, este estudo propõe um procedimento minimamente invasivo, realizando-se a raspagem das bordas da lesão. O diagnóstico por PCR foi comparado com o exame microscópico, analisando-se 28 amostras coletadas de pacientes com suspeita de LTA. Cada amostra, coletada da borda da lesão com um palito estéril, foi dividida em duas alíquotas. Uma foi analisada pelo exame microscópico direto e a outra pela técnica de PCR, utilizando-se dois pares de oligonucleotídeos (um específico para gênero *Leishmania*, e outro para *L. (V.) braziliensis*). Das 28 amostras, 27 (96,43 %) apresentaram resultados concordantes em ambas as metodologias (oito positivas e 20 negativas). A PCR em material de raspado da borda de lesões foi mais sensível quando comparado com o exame direto. A metodologia de PCR apresenta vantagens para: (i) determinar as espécies de *Leishmania*; (ii) oferecer um meio alternativo de coleta de amostras, quando os serviços de saúde não têm o profissional autorizado para coletar o material de biópsia; (iii) propor um procedimento minimamente invasivo de coleta de amostra biológica.

**Palavras-chave.** Leishmaniose cutânea americana, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, PCR.

## INTRODUCTION

American cutaneous leishmaniasis (ACL) is an infectious disease caused by protozoan of the genus *Leishmania* that affects skin and mucosa. According to World Health Organization (WHO) 1- 1.5 million new human cases of cutaneous forms occur yearly. From 2001 to 2011 around 270,500 cases were reported, with an average of 27,500 new cases/year<sup>1,2</sup>. Around 3 to 5 % patients who develop cutaneous lesions can also develop mucosal leishmaniasis<sup>1-3</sup>. In the Sao Paulo State, the incidence is approximately 400 new cases/year<sup>4</sup>. Another considerable problem is the urbanization of the infection. Autochthonous cases have been described in urban areas<sup>5</sup>. The incidence of peri-urban and urban cases has been increasing. Approximately 10 % of the population living in endemic areas is at risk for acquiring the infection<sup>5,6</sup>. ACL was also considered one of the most common dermatological syndromes diagnosed in travelers (or tourists) who had visited endemic areas<sup>6</sup>.

Species such as *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* and *L. (L.) amazonensis* can cause ACL<sup>3,6</sup>. Such parasite diversity causes different forms and manifestations, mainly in the skin and mucous membranes and in the host immune system<sup>6</sup>.

The traditional diagnosis of ACL is performed using clinical, epidemiological and laboratory methodologies. Considering the laboratory techniques, biopsies from lesions are normally processed for direct examination, after Giemsa staining, "in vitro" culture, including histopathological techniques, and more recently, molecular methods as polymerase chain reaction (PCR)<sup>7</sup>. Studies related the determination of the infecting species can cooperate with the epidemiological and preventive strategies. Our group previously evaluated a PCR for detecting *L. (V.) braziliensis* in clinical samples, which has been shown to be highly sensitive and specific<sup>7,8</sup>.

The human biopsy collection must be performed only by physicians; in addition,

it is a complex and expensive procedure<sup>1,3,4</sup>. Based on this, and in order to simplify the sample collection for molecular ACL diagnosis, the present study aimed to propose a minimally invasive procedure, simple and fast sample collection procedure using molecular and parasitological methods.

## MATERIAL AND METHODS

### Patients and samples

This study was conducted analyzing clinical samples from 28 patients with cutaneous lesions living and attending public dermatology clinics of Sorocaba Region, Sao Paulo State. All patients analyzed in this study also lived in these cities and were selected considering epidemiological risk factors for cutaneous leishmaniasis, such as close proximity to other infected patients as well as signs or symptoms of the disease. In the dermatology clinics, a complete dermatological examination was performed, and all patients presented cutaneous lesions suggestive of leishmaniasis. None of them had acquired the infection before or had been treated with drugs for leishmaniasis. Lesions were initially cleaned with antiseptics. The borders of the lesions were scraped or smears of material were obtained with the aid of a sterile toothpick. One part of samples was immediately added to a tube containing 1-2 mL of a sterile 0.85 % NaCl for DNA extraction. The other part of sample was distended directly on two glass slides for parasitological test (microscopic examination).

For negative control in PCR, DNA was extracted from three biopsies with other diseases and for positive control, from the standard WHO strain, *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903). Promastigotes were maintained by serial passages and grown at 24 °C in 199 medium supplemented with 10 % calf serum and 0.25 % hemin 25. In the log curve phase,  $1 \times 10^8$  promastigotes were harvested, and washed twice in phosphate-buffered saline (pH 7.2) at 1,000 g for 10 min. The parasite pellets were used for DNA extraction.

## Ethical considerations

This study was performed according to recommendations of the Human Ethics Committee (CONEP-IAL, number 424.827) that approved this study.

## Microscopic method

Smears on glass slides were fixated with methanol and stained with Giemsa according to the WHO<sup>1,2</sup>. The presence of amastigotes was observed microscopically with an immersion objective (magnification 1,000X).

## Molecular diagnosis

### DNA extraction

Clinical samples and *Leishmania* WHO reference strain were crushed and digested, until complete tissue lysis, in a lysis buffer (This-HCl, 10 mM, pH 8.0; EDTA 10mM; SDS, 0.5 %; N-laurilsarcozil, 0.01 %; proteinase K, 100 µg/mL) by incubation in water bath at 56 °C. Next, DNA molecules were extracted by QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. DNA concentrations and purity were determined by the NanoDrop ND1000® (Thermo Scientific).

### PCR, targets for *Leishmania* and internal controls

*Leishmania* spp. was identified by using the primer set 150/152<sup>9</sup>, targeting a 120-base pair (bp). PCR product from a conserved region of kDNA minicircles. *L. (V.) braziliensis* complex was determined by using the primer set LU-5A/LB-3C (5'-TTTATTGGTATGCGAAACTTC-3'/5'-CGT(C/G)CCGAACCCCGTGTC-3') targeting an amplified fragment of 146-149 bp from the multicopy spliced leader RNA gene<sup>7,8,10</sup>. These reactions were run following the same conditions as described by Gomes et al<sup>7</sup> and Gomes et al<sup>8</sup>. To check PCR inhibitors, samples were assayed by using a reference gene ( $\beta$ 1- $\beta$ 2)<sup>11</sup>, in the same conditions as previously described<sup>8</sup>. The samples were tested in two replicates. Each amplification run contained two negative controls (ultra-pure water and a negative DNA sample for *Leishmania*) and one positive control (DNA extract of *L. (V.) braziliensis* promastigotes).

After thermal cycles, PCR products were electrophoresed in 2 % agarose gel and stained with ethidium bromide. DNA fragments were visualized under UV illumination. The images were analyzed by a Mini Bis Gel Imager and Documentation (DNR Bio-Imaging Systems). The size of fragments was based on comparison with a 100-bp ladder.

### Data Analysis

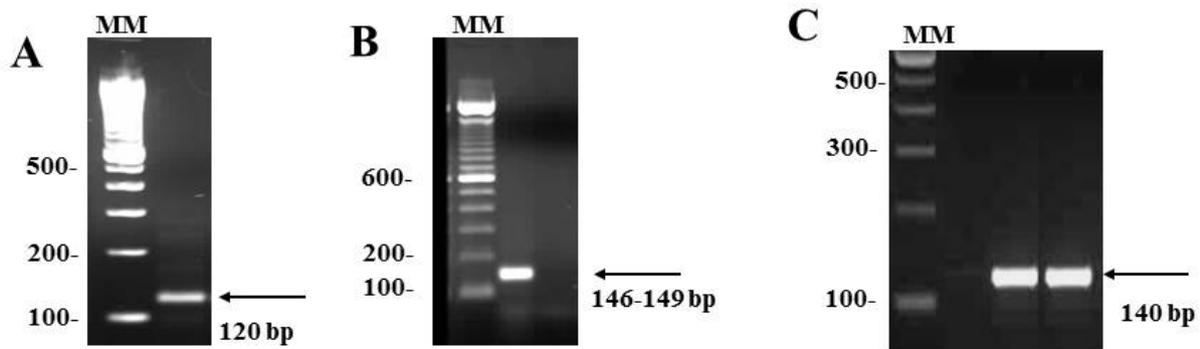
According analyses made in previous studies<sup>7,8</sup> and in the laboratory routine in our laboratory, clinical and laboratory criteria were used to establish the diagnosis. The samples were considered positive when stained tissue smears or PCR were positive. These values were used as the "consensus laboratory criteria" against which each individual diagnostic assay was compared<sup>8</sup>.

## RESULTS AND DISCUSSION

During the study-period, the 28 patients clinically suspected of having ACL referred to the public dermatology clinics were diagnosed by clinical, epidemiological and laboratorial data. Parasites were identified by, at least one of the methods employed. The central objective of this study was to investigate whether PCR or the direct microscopic examination could determine *L. (V.) braziliensis* in clinical material collected by scraping the edges of the lesions, in case physicians could not perform biopsies to collect the material.

DNA extraction and PCR inhibitors were evaluated by  $\beta$ 1- $\beta$ 2 marker that amplified a PCR fragment of human  $\beta$ -globulin gene. All DNA samples had positive amplifications showing that no substance present in DNA samples inhibited the reaction. *Leishmania* determination was made using two primer pairs: a 120 bp, specific for *Leishmania* spp, and a 146-149 bp fragment from the SL RNA gene of *L. (V.) braziliensis* complex. As an illustration, Figure 1 shows the amplified PCR products of all markers used in this study.

The overall laboratory results, showing each individual diagnostic test for clinical samples of all patients, are described in Table 1. Samples from the 28 patients presented the following results: eight



**Figure 1.** Amplified PCR products in two different target regions of *Leishmania*: 150/152, 120 bp (for *Leishmania* spp) (A) and LU-5A/LB-3C, 146 to 149 bp (for *L. (V.) braziliensis* complex) (B). B1-β2 primer pair was used as PCR control and amplified a 140 bp fragment of human β-globulin gene (C). The amplified products were resolved in 2 % agarose gels stained with ethidium bromide. Lane MM, 100 bp ladder

patients had positive results for PCR (with both primer pairs), whereas parasites were detected by parasitological methods in seven patients. No parasites were shown in the other 20 samples suggesting that patients may have other diseases.

These data suggest the possibility to use PCR in dermal scrapings, since our data showed concordance between parasitological and molecular methodologies. The collection of dermal scrapings is a methodology minimally invasive if compared with skin biopsies. Previous studies have equally described good sensitivity of PCR when compared with direct microscopy in lesion scrapings. In addition, sensitivity was similar to that of DNA samples extracted from biopsies<sup>12,13</sup>.

In conclusion, this study showed the possibility of PCR use in scraping of lesion

edges (i) to determine *Leishmania* species in positive samples (ii) to use an alternative way of collecting material, when biopsy procedures are not available at the health services, and (iii) to use a minimally invasive procedure.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants from the FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil) 2011/13939-8, and the CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) 303489/2012-0 for Vera L. Pereira-Chioccola.

## REFERENCES

1. World Health Organization - WHO. Leishmaniasis: Fact sheet N° 375, updated January 2014. WHO; 2015. [Accessed September 2015]. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/index.html>.
2. World Health Organization - WHO. Technical Report series. Control of the leishmaniasis. Report of a meeting of the WHO. Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010; 949: 1-186. [Accessed September 2015]. Available at: [http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_949\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf)

**Table 1.** Comparison of parasitological and molecular methods for *L. (V.) braziliensis* detection in scrapings of lesions edge from patients with cutaneous lesions

		Parasitological		
		Negative	Positive	Total
PCR	Negative	20	0	20
	Positive	01	07	08
	<b>Total</b>	<b>21</b>	<b>07</b>	<b>28</b>

3. Ministério da Saúde - MS. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. 2. ed., Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010. [Accessed September 2015]. Available at: [http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_leishmaniose\\_tegumentar\\_americana.pdf](http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar_americana.pdf)
4. Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo – CVE. [Accessed September 2015]. Available at: [ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc\\_tec/zoo/LTA9806\\_SH.pdf](ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/zoo/LTA9806_SH.pdf)
5. Silva RA, Mercado VT, Henriques LF, Ciaravolo RM, Wanderley DM. Magnitude and trend of American tegumentary leishmaniasis in the State of São Paulo, Brazil, 1975 to 2008. *Rev Bras Epidemiol*. 2012;15(3):617-26. [DOI:10.1590/S1415.790X2012000300015].
6. Goto H, Lauletta Lindoso JA. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Infect Dis Clin North Am*.2012;26(2):293-307. [DOI: 10.1016/j.idc.2012.03.001].
7. Gomes AHS, Ferreira IM, Lima ML, Cunha EA, Garcia AS, Araujo MF, et al. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol*. 2007;144(3-4):234-41. [DOI:10.1016/j.vetpar.2006.10.008]
8. Gomes AHS, Armelin IM, Menon SZ, Pereira-Chioccola VL. *Leishmania (V.) braziliensis*: detection by PCR in biopsies from patients with cutaneous leishmaniasis. *Exp Parasitol*. 2008;119(3):319-24. [DOI: 10.1016/j.exppara.2008.02.014].
9. Passos VM, Fernandes O, Lacerda PA, Volpini AC, Gontijo CM, Degraive W, et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the predominant species infecting patients with American cutaneous leishmaniasis in the state of Minas Gerais, Southeast Brazil. *Acta Trop*. 1999;72(3):251-8. [DOI:10.1016/S0001-706X998000100-4].
10. Harris E, Kropp G, Belli A, Rodriguez B, Agabian N. Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. *J Clin Microbiol*.1998;36(7):1989-95.
11. Lee CN, Cavanagh HM, Lo ST, Ng CS. Human papillomavirus infection in non-neoplastic uterine cervical disease in Hong Kong. *Br J Biomed Sci*. 2001;58 (2):85-91.
12. Isaza DM, Arboleda M, Restrepo M, McCann SH, Barker DC. Validation of the polymerase chain reaction for the diagnosis of human cutaneous leishmaniasis in north-west Colombia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2002;96Suppl1:S165-8. [DOI: 10.1016/S0035-9203(02)90043-X].
13. Venazzi EA, Roberto AC, Barbosa-Tessmann IP, Zanzarini PD, Lonardon MV, Silveira TG. Polymerase chain reaction with lesion scraping for the diagnosis of human American tegumentary leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101(4):427-30. [DOI: 10.1590/S0074-02762006000400014].

# Importância da atuação do Laboratório de Saúde Pública nas perícias judiciais relacionadas a matérias estranhas em alimentos

## Importance of the Public Health Laboratory on the expert advice requested by the courts regarding foreign matter in food

RIALA6/1679

Sonia de Paula Toledo PRADO<sup>1\*</sup>, Cristina Eico YOKOSAWA<sup>1</sup>, Roberta Ribeiro Costa ROSALES<sup>2</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas, Centro de Laboratório Regional de Ribeirão Preto, Instituto Adolfo Lutz. Rua Minas, 877, Campos Elíseos, Ribeirão Preto, SP, Brasil. CEP: 14085-410. Tel: 16 3625-5046 - ramal 214. E-mail: sptprado@hotmail.com

<sup>2</sup>Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

Recebido: 08.10.2015 - Aceito para publicação: 22.12.2015

### RESUMO

O Instituto Adolfo Lutz (IAL) atua de maneira relevante em processos judiciais realizando perícias laboratoriais conhecidas como produção antecipada de provas. Este trabalho faz o relato da investigação da suspeita de presença de cacos de vidro em vinho tinto, referente a um processo judicial de município da região de Ribeirão Preto/SP. Em abril de 2013, uma amostra de vinho foi encaminhada ao IAL-Ribeirão Preto para confirmação de corpo estranho e sua identificação pelo Laboratório de Microscopia de Alimentos. Realizaram-se inicialmente as análises de dissolução da amostra e o exame direto por microscopias estereoscópica e óptica. Constatou-se a presença de borra no gargalo e de sedimento com cristais diversos no fundo das garrafas. Posteriormente, os cristais foram encaminhados ao Departamento de Biologia Celular e Molecular da FMRP-USP para quantificar e identificar a composição através do microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM-6610LV e do EDS (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy). A ausência de sílica confirmou a pesquisa negativa para caco de vidro, e a composição dos elementos encontrados sugeriu a presença de sais de tartarato de cálcio e potássio no vinho. Apesar destes cristais não serem prejudiciais à saúde, a alteração da aparência do produto pode causar rejeição pelo consumidor.

**Palavras-chave.** vinho, cristalização, microscopia, análise de alimentos, Laboratório de Saúde Pública.

### ABSTRACT

The Adolfo Lutz Institute (IAL) conducts laboratorial researches concerning the production of early evidence driven by law-suit processes. This study reports an investigation for analyzing the suspected presence of broken glass in a red wine, referring to a law-suit of city of Ribeirão Preto region. In April 2013 a wine sample was sent to the Food Microscopy Laboratory of IAL-Ribeirão Preto to confirm the presence of a foreign body and their identification. Analyses were made by dissolving the sample and by examining under stereoscopic and optical microscopy. Dreg was found in the bottle neck, and sediments containing crystals of varied sizes and shapes were deposited on the bottom. These crystals were sent to the Department of Cellular and Molecular Biology at Medical School of Ribeirão Preto-USP for identifying and quantifying them through the scanning electron microscope JEOL JSM- 6610LV and EDS (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy). Silica was not detected, and this finding ruled out the presence of broken glasses. Analysis of the found elements suggested the presence of calcium and potassium tartrate salts in this wine. Although these crystals are not harmful to human health, they might change the wine aspect and cause rejection by the consumers.

**Keywords.** wine, crystallization, microscopy, food analysis, Public Health Laboratory.

## INTRODUÇÃO

O Instituto Adolfo Lutz (IAL), Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de São Paulo, juntamente com doze Centros de Laboratório Regional espalhados estrategicamente no Estado, lidera as ações laboratoriais de vigilância sanitária, epidemiológica e ambiental. Na área de alimentos, o IAL além de atender a vários órgãos e participar de diversos programas, atua em processos judiciais solicitados por juízes e promotores, realizando perícias laboratoriais conhecidas como produção antecipada de provas. Essa análise, realizada comumente pela área da Microscopia de Alimentos, visa salvaguardar a existência e a eficiência de uma prova a ser produzida que se encontra na iminência de não mais poder se fazer presente, sendo o exame pericial documentado em laudo uma importante ferramenta para auxiliar a decisão do juiz e o andamento do processo.

A segurança sanitária dos alimentos ofertados para consumo da população é um dos desafios da Saúde Pública e os perigos relacionados à segurança alimentar são classificados em microbiológicos, químicos e físicos.

Alguns perigos físicos que envolvem a produção do vinho, principalmente durante o recebimento das uvas, processamento e envase incluem a presença de folhas, pedras, insetos, peças soltas, partes de vedantes, borras finas, fragmentos de rolhas e cacos de vidro que podem ficar na garrafa<sup>1</sup>. Na vinificação, as borras são partículas sólidas em suspensão presentes nos mostos e nos vinhos, que podem causar turvações ou depósito no fundo dos recipientes<sup>2</sup>.

No tocante à qualidade, aspectos como aparência, aceitabilidade, aromas, sabor, cor e componentes (álcool, acidez, entre outros) são características sensoriais importantes para a aceitação do consumidor. Referem-se a defeitos que alteram o produto sem afetar a saúde do consumidor<sup>3</sup>.

Por falta de conhecimento da tecnologia de produção ou por fenômenos químicos, físicos ou biológicos que podem alterar os alimentos e bebidas, os consumidores eventualmente confundem essas alterações com a presença de

corpos estranhos. Em outras ocasiões, devido à dificuldade de visualização pelo tipo de embalagem, a verdadeira natureza da matéria estranha é supostamente confundida com partes de animais e objetos diversos.

Em decorrência desses fatos é comum a existência de processos judiciais com pedido de indenização por danos morais. Essa análise é conhecida por produção antecipada de provas, sendo solicitada pelo juiz para evitar o perecimento ou a perda do objeto de uma prova. Assim, a ação cautelar visa assegurar a prova para que, em momento oportuno, ela possa se fazer valer no processo principal<sup>4</sup>. A produção da prova não significa apenas a possibilidade das partes de produzi-la para demonstrar a veracidade das alegações apresentadas, mas sim, para fundamentar na decisão sobre a situação fática a ser tomada pelo julgador<sup>5</sup>.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo o relato da investigação de suspeita da presença de cacos de vidro de uma produção antecipada de provas e identificar a natureza do corpo estranho em vinho tinto de mesa referente a um processo judicial da Vara Cível da Comarca de um município da região de Ribeirão Preto/SP.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material

Em abril de 2013, uma amostra composta por duas unidades fechadas de vinho tinto de mesa, acondicionado em garrafa de vidro lacrada, foi encaminhada pela Vara Cível de um município da região de Ribeirão Preto/SP ao Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas do Centro de Laboratório Regional do Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto, para a realização de perícia de produção antecipada de provas em ação de indenização por danos morais. Foram solicitadas ao Laboratório de Microscopia de Alimentos, a confirmação da presença do corpo estranho (suspeita de caco de vidro), a sua identificação e outras informações requeridas pelo juiz através de quesitos formulados pelas partes interessadas da referida ação.

## Métodos

### Análise microscópica

As análises feitas inicialmente incluíram a dissolução da amostra, filtração e exame direto com auxílio dos microscópios estereoscópico binocular (aumento de 7 a 40X) e óptico<sup>6</sup>. Posteriormente, os cristais e resíduos foram encaminhados ao Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP para a confirmação da sua natureza, utilizando microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM-6610LV em baixo vácuo com voltagem de 25 kV e o EDS (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy) Oxford. Os cristais foram presos em um suporte com cola de carvão para a observação ao microscópio, tendo sido feitas imagens de 30X e 500X de magnificação; o EDS quantificou e identificou adequadamente a composição dos cristais, sendo obtidos mapas e gráficos com a distribuição dos elementos identificados na superfície da amostra.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise macroscópica constatou a presença de borra no gargalo e de sedimento com vários cristais de tamanhos e formatos diversos depositados no fundo das garrafas de vinho. A pesquisa para fragmento de vidro foi considerada negativa.

Após a análise por microscopia de varredura confirmou-se a ausência de sílica (principal componente do vidro) nos referidos cristais e, portanto, descartou-se a suspeita inicial do material estranho tratar-se de fragmentos de vidro. A composição dos principais elementos encontrados (Ca = 67,74 %; O = 49,59 %; C = 47,99 %; K = 0,68 %) e o EDS sugeriram a presença de sais de tartarato de cálcio e potássio no vinho, decorrentes do processamento da uva (Figuras 1 e 2).

Um dos problemas mais frequentes que deprecia o aspecto visual do vinho tinto e também do suco de uva é a presença de depósito no fundo do recipiente depois de engarrafado, devido à precipitação do bitartrato de potássio (cremor

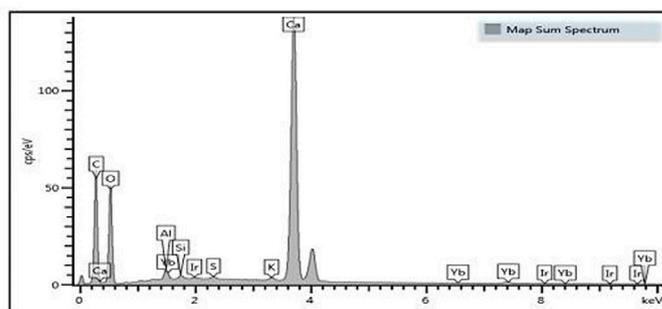
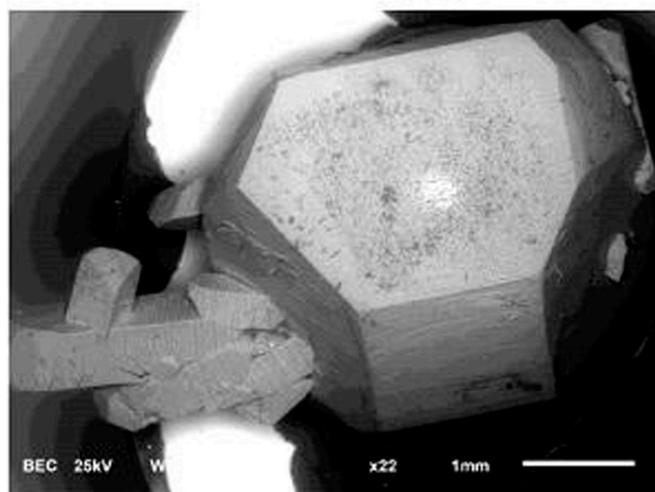


Figura 1. Distribuição dos elementos químicos identificados na superfície dos cristais



aumento (30x)



aumento (500x)

Figura 2. Cristais encontrados na amostra, observados em microscópico eletrônico de varredura Jeol JSM-6610LV

de tártaro) e/ou o tartarato neutro de cálcio. A formação desses cristais é consequência de um excesso de bitartarato de potássio ou de tartarato de cálcio, sais cuja solubilidade diminui com a redução da temperatura<sup>7</sup>.

Esta precipitação tartárica em vinhos, por cristalização espontânea em condições naturais, é um fenômeno imprevisível e pode ocorrer durante a vinificação, estágio, ou depois de embalados. A ocorrer nesta última fase, geralmente dão origem a reclamações dos consumidores que associam a presença de um precipitado com uma adulteração ou defeito do vinho<sup>8</sup>.

De acordo com Larentis<sup>1</sup>, a presença de cristais de tartarato pode ser considerada um perigo físico, porém de baixa severidade e risco, nos quais medidas preventivas devem ser adotadas.

Para evitar o aparecimento desses cristais utiliza-se como prática enológica a estabilização do ácido tartárico ao vinho antes do engarrafamento. O tratamento consiste em resfriar rapidamente o vinho até -3 °C a -4 °C, por um período de 8 a 10 dias, o que provoca a insolubilidade e precipitação dos sais para filtragem posterior<sup>2</sup>.

Este pode ser considerado um assunto controverso, pois para muitos enólogos a presença de cristais não é sinal de deterioração nem tampouco defeito do vinho, podendo indicar um processo de estabilização leve ou sua ausência. Já as borras ocorrem naturalmente com a evolução dos vinhos tintos e também denotam pouca ou nenhuma estabilização e filtração<sup>9</sup>.

O laudo pericial juntamente com as respostas aos quesitos fundamentou a decisão judicial, tornando a ação improcedente e extinguindo o processo com resolução de mérito.

## CONCLUSÃO

As análises laboratoriais efetuadas pela área da microscopia de alimentos comprovam ou descartam a existência de matérias estranhas indicativas de falhas das Boas Práticas e/ou indicativas de risco à saúde humana, sendo considerada uma prática de vigilância sanitária

fundamental à proteção da saúde da população. As investigações realizadas no Laboratório de Saúde Pública (CLR – IAL de Ribeirão Preto) elucidaram a verdadeira natureza do material encontrado no vinho e auxiliaram o Poder Judiciário no andamento do processo judicial que tramitava na justiça por muitos anos, afastando a hipótese inicial de presença de matéria estranha (caco de vidro) com risco à saúde humana.

Apesar desses cristais não serem prejudiciais à saúde humana, a alteração da aparência do produto pode causar reação de rejeição por parte de consumidores que desconhecem o processo de fabricação dos vinhos. Estes cristais podem ser confundidos com matérias estranhas como fragmentos de vidro, inclusive produzindo um ruído similar a esses quando deslocados dentro da garrafa. Assim, sugere-se a inclusão de frase no rótulo dos vinhos informando o consumidor sobre a possibilidade da existência desses cristais no fundo da embalagem.

Os dados do estudo irão suprir uma lacuna no conhecimento da área e poderão ainda servir como subsídio para incluir item específico sobre o assunto na próxima revisão da legislação relacionada à presença de matérias estranhas macroscópicas e microscópicas em alimentos e bebidas.

---

## AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

---

## REFERÊNCIAS

1. Larentis BZ. Sistematização do APPCC para uso nas vinícolas: o caso do vinho Merlot da vinícola Larentis [dissertação de mestrado]. Caxias do Sul (RS): Universidade de Caxias do Sul; 2014.

2. Meneguzzo J, Manfroi L, Rizzon LA. Sistema de Produção de Vinho Tinto. Bento Gonçalves (RS): Embrapa Uva e Vinho; 2006. [acesso 2014 Set 18]. Disponível em: [<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Vinho/SistemaProducaoVinhoTinto/glossario.htm>].
3. Christaki T, Tzia C. Quality and safety assurance in winemaking. *Food Control*. 2002;13(8):503-17. [DOI: 10.1016/S0956-7135(02)00030-0].
4. Moreira JM. Breves aspectos sobre a produção de provas na ação civil. [acesso 2015 Set 02]. Disponível em: [<http://www.abdpc.org.br/abdpc/artigos/JUSSARA%20MARION%20MOREIRA%20-%20VERS%C3%83O%20FINAL.pdf>].
5. Torres AFM. Produção antecipada de prova. *Rev Âmbito Jurídico* [Internet]. 2002. [acesso 2015 Set 14]. Disponível em: [[http://www.ambitojuridico.com.br/site/index.php?n\\_link=revista\\_artigos\\_leitura&artigo\\_id=4579](http://www.ambitojuridico.com.br/site/index.php?n_link=revista_artigos_leitura&artigo_id=4579)].
6. Food and Drug Administration – FDA. FDA Technical Bulletin number 5: Macroanalytical Procedures Manual; 1984. [acesso 2014 Abr 11]. Disponível em: [<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm2006953.htm>].
7. Rizzon LA, Meneguzzo J. Suco de uva. Bento Gonçalves (RS): Embrapa Uva e Vinho; 2007. 45 p.
8. Andrade MJC. Estabilização tartárica de vinhos tintos por combinação de nanofiltração e permuta catiônica [dissertação de mestrado]. Porto: Universidade Católica Portuguesa; 2012.
9. Marcel M. Os defeitos e os “defeitos” do vinho. [acesso 2014 Out 23]. Disponível em: [[http://revistaadega.uol.com.br/artigo/os-defeitos-e-os-defeitos-do-vinho\\_436.html#ixzz3OFzRnJ2c](http://revistaadega.uol.com.br/artigo/os-defeitos-e-os-defeitos-do-vinho_436.html#ixzz3OFzRnJ2c)].

## Avaliação das características físico-químicas da carne de perna de avestruz (*Struthio camelus*) para produção de embutidos

### Evaluation of physical-chemical characteristics of the meat of ostrich (*Struthio camelus*) leg for sausage production

RIALA6/1680

Edvaldo Vasconcelos de CARVALHO FILHO<sup>1\*</sup>, João Andrade da SILVA<sup>2</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Faculdade de Ciências da Saúde do Trairi. Av. Rio Branco s/nº, Centro, Santa Cruz-RN, Brasil, CEP: 59200-000. E-mail: edvaldovasconcelos@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA/CTDR/UFPB), João Pessoa, PB, Brasil

Recebido: 18.08.2014 - Aceito para publicação: 28.10.2015

#### RESUMO

A qualidade da carne de avestruz tem despertado o interesse de pecuaristas e consumidores, tanto para consumo direto como para produção de embutidos. Neste estudo foram analisados o rendimento e as características físico-químicas dos músculos de pernas de avestruzes *Gastrocnemius pars externa*, *Fibulares Longus* e *Gastrocnemius pars internus* utilizados para produzir embutidos. Foram determinadas a composição centesimal, cor objetiva pelo sistema CIELab, pH, atividade de água, textura objetiva, capacidade de emulsificação e capacidade de absorção de água. A carne da perna apresentou rendimento de 87,27 %. Houve diferença no músculo do *Gastrocnemius pars internus* quanto à composição química. Após a trituração dos músculos, a mistura apresentou capacidade de emulsificação média de 136,40 mL de óleo/0,5 g e capacidade de absorção de água de 55,63 %. Este estudo mostra que a carne de perna de avestruz pode ser utilizada para produção de embutidos.

**Palavras-chave.** rendimento, qualidade, capacidade de emulsificação, textura.

#### ABSTRACT

The quality of ostrich meat has been increased the interest of cattle breeders and consumers, not only for direct consumption, but also for producing sausages. The objective of this study was to analyze the yields and the physicochemical characteristics of the leg muscles of ostriches *Gastrocnemius pars external*, *Fibulares Longus* and *Gastrocnemius pars internus*, for producing sausages. The centesimal composition, objective color by CIELab system, pH, water activity, objective texture, emulsification capacity and water-absorbing ability were determined. The leg meat yield was of 87.27 %. Difference on the chemical composition was detected in *Gastrocnemius pars internus* muscle. After the muscles comminution, the mixture showed the average emulsification capacity of 136.40 mL of oil/0.5 g and the water absorption capacity of 55.63 %. This study demonstrates the effectiveness of ostrich leg meat in producing sausage.

**Keywords.** yield, quality, emulsifying capacity, texture.

## INTRODUÇÃO

O avestruz (Ordem *Struthioniformes*, Subgênero *Struthiores*, Família *Struthionidae*, Gênero *Struthio*, Espécie *camelus*) é uma ave corredora, incapaz de voar, pertencente ao grupo das Ratitas. É a maior ave existente com altura média, do chão até a cabeça, variando de 2,0 a 2,5 m, quando adulta pode pesar até 160 Kg<sup>1</sup>.

Diferente de outros animais, onde a carne é vendida por partes ou porções, a carne de avestruz é vendida por músculos que são divididos em: músculos da perna (*M. gastrocnemius*, pars interna, *M. gastrocnemius*, pars externa, *M. gastrocnemius*, pars media, *M. fibularis longus*), músculos da coxa (*M. pubo-ischio femoralis*, *M. flexor cruris medialis*, *M. iliofemoralis*, *M. flexor cruris lateralis*, *M. iliofibularis*, *M. iliotibialis lateralis*, *M. ambiens*, *M. iliotibialis cranialis*, *M. iliofemoralis externus*, *M. femorotibialis medius*) e por fim o *M. obturatorius medialis*, localizado na parte traseira do animal<sup>1</sup>.

O rendimento da carcaça fria de um avestruz é de aproximadamente 51 %, não existindo diferença no rendimento de carcaça, entre machos e fêmeas, quando os animais têm idade e peso semelhante<sup>1,2</sup>. A carne de avestruz apresenta características físicas diferenciadas de outros animais, depois de 24 horas do abate apresenta pH alto (5,8-6,2). Esta característica influencia na cor, umidade e vida de prateleira<sup>1</sup>.

A introdução da carne de avestruz no atual e competitivo mercado global implica no fornecimento de garantias nutricionais adequadas para um determinado nicho de consumidores em diversos países. As estratégias para a introdução de novos produtos à base de carne de avestruz devem concentrar-se na sua qualidade superior, tanto do ponto de vista nutricional como organoléptico sensorial, que são determinados pela composição química da carne<sup>3</sup>. Devido a constante busca dos consumidores por novos produtos alimentícios, considerados saudáveis, tem-se observado a necessidade do desenvolvimento de produtos utilizando os cortes da perna de carne de avestruz que tenha baixo valor de mercado, que permita a agregação de valor a carne e a

oferta de novos produtos cárneos com carne de avestruz.

Assim, objetivou-se com este estudo determinar o rendimento e as características físicas e químicas da carne de perna de avestruz, avaliando sua viabilidade para utilização como matéria prima na produção de embutidos cárneos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material Experimental

As amostras da carne de avestruz (*Struthio camelus*) provenientes do abate de 04 (quatro) machos com 14 meses de idade foram adquiridas na cidade de Recife-PE, provenientes da Cooperativa dos Criadores de Avestruzes do Nordeste e transportadas congeladas para o Laboratório de Bioquímica dos Alimentos da Universidade Federal da Paraíba. Foram avaliados os músculos da perna: *Muscularis gastrocnemius pars externa*, *Muscularis fibulares longus* e *Muscularis gastrocnemius pars internus* de avestruz por serem considerados por Feijó et al<sup>4</sup> músculos de textura mais dura e, conseqüentemente apropriados para produção de embutidos.

### Analises de qualidade da carne

#### Rendimento de cortes

O rendimento da carne da perna do avestruz foi avaliado depois da desossa manual em mesa. Foi calculado pelo peso da peça inteira, menos o peso do osso.

#### Composição química

Na determinação da composição centesimal foram avaliados a umidade, proteína, lipídio e cinzas de acordo com as metodologias descritas pela Association of Official Analytical Chemists – AOAC<sup>5</sup>. As análises foram realizadas em triplicata e os valores expressos em g/100 g.

#### pH

A determinação do pH foi realizada com potenciômetro Modelo Q400AS, calibrado com soluções padrão pH 7 e 4, utilizando-se 10 g de amostra homogeneizada com 100 mL de água

desionizada, em seguida, a suspensão foi filtrada e realizada as leituras em triplicata, de acordo com as metodologias descritas pela Association of Official Analytical Chemists – AOAC<sup>5</sup>.

#### *Atividade de água*

A atividade de água foi determinada em aparelho AQUA LAB CX-2, com alíquotas pesando 20 g e em temperatura padronizada de 25 °C, com seis leituras para cada corte.

#### *Determinação de cor objetiva sistema CIELab*

Para a realização da análise de cor foram cortados pedaços de carne de 2,5 cm de espessura de cada músculo analisado. As medidas de luminosidade ( $L^*$ ), da intensidade de vermelho/verde ( $a^*$ ) e da intensidade de amarelo/azul ( $b^*$ ) foram realizadas em colorímetro Minolta Modelo GR10, (Osaka - Japão), sistema CIELab, para a leitura dos parâmetros. O colorímetro foi calibrado com placa de cerâmica branca e o iluminante utilizado foi o D65, com ângulo de 10°. Foram feitas duas medidas, em quatro diferentes pontos do corte, anotando-se os valores médios de  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ , de acordo com a metodologia descrita por Houben et al<sup>6</sup>.

#### *Textura*

A textura da carne dos três músculos da perna de avestruz foi medida por meio da força de cisalhamento, seguindo a metodologia descrita por Solomon et al<sup>7</sup>, utilizando-se amostra com peças medindo 3 cm de comprimento e 1,2 cm de diâmetro, sendo cisalhadas ao longo do diâmetro. O cisalhamento foi feito perpendicularmente às fibras utilizando texturômetro TA XT Express (Stable Micro Systems®, 1997). Foram realizadas seis repetições da força de cisalhamento para cada amostra e os resultados foram expressos em quilograma força (Kgf/cm<sup>2</sup>).

#### *Capacidade de emulsificação*

Para a determinação da capacidade de emulsificação foram pesadas 25 g de carne proveniente da cominuição dos músculos da perna de avestruz e homogeneizadas em 100 mL de solução de NaCl (1M) durante dois minutos.

Pesou-se 2,5 g dessa solução inicial e foram adicionados 20 mL de água destilada e 10 mL de óleo de soja. Em seguida, ocorreu o emulsionamento em aparelho agitador mecânico de médio torque (100 a 2200 rpm) com a adição de óleo em uma velocidade de 0,3 mL/s até a quebra da emulsão, com os resultados expressos em mL de óleo/0,5 g de carne<sup>7</sup>.

#### *Capacidade de absorção de água*

A capacidade de absorção de água foi determinada a partir da pesagem de 30 g de carne moída, com a adição de 90 mL de água destilada. Foram pesados 35 g da pasta obtida e centrifugados por 15 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi desprezado, o tubo foi pesado e a capacidade de absorção foi calculada da seguinte forma:  $\%CAA = \{[(PP-PC)-PS]/PC\} * 100$ , em que: PP = peso da pasta, PC = peso da carne na pasta e PS = peso do sobrenadante<sup>8</sup>, com os resultados expressos em porcentagem.

#### *Análise estatística*

A avaliação estatística dos dados foi realizada utilizando-se o software estatístico SigmaStat® 3.1 (Systat software Inc.; Richmond, Califórnia, EUA, 2005) aplicando-se a Análise de Variância (ANOVA) para comparações entre os músculos analisados. Quando a ANOVA atestava a existência de diferença, utilizou-se o Teste de Tukey ao nível de significância de 5 %.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Com a desossa manual da perna de avestruz foi observado um rendimento médio, 87,27 % para carne e de 12,73 % para osso (Tabela 1). Flemming et al<sup>9</sup>, avaliando o rendimento de desossa de perna de cinco linhagens de frango de corte mais criadas no Brasil, encontraram valores de 77,30 % para linhagem Ross, 81,81 % para Cobb, 75,88 % para Hubbard, 76,85 % para Arbor Acres e 75,88 % para Isa Vedette.

Comparando-se os valores da desossa manual realizada na perna de avestruz em nosso estudo, e o reportado por diversos autores para diversas linhagens de frango comercializadas no

Brasil, observamos que os valores de rendimentos, na desossa manual da perna de avestruz são superiores.

**Tabela 1.** Rendimento percentual médio de desossa manual de perna de avestruz

Porção	Rendimento		
	Peso (g)	EPM	%
Osso	625,00	15,00	12,73
Carne	4285,00	65,00	87,27
Perna inteira	4910,00	80,00	100,00

EPM: Erro Padrão da Média

Foi observada diferença ( $p < 0,05$ ) para as análises de umidade, Resíduo Mineral Fixo e Lipídeos (Tabela 2). Com relação ao percentual de lipídios o músculo *Fibulares longus* ( $3,83 \pm 0,06$ ) e o *Gastrocnemius pars internus* ( $4,41 \pm 0,12$ ) apresentaram valores maiores que o *Gastrocnemius pars externa* ( $2,50 \pm 0,21$ ).

Na avaliação da composição centesimal da perna de avestruz, Feijó et al<sup>4</sup> encontrou umidade variando de  $74,70 \pm 0,10$ ;  $75,11 \pm 1,52$ ;  $75,10 \pm 0,35$ , resíduo mineral fixo - RMF  $1,27 \pm 0,01$ ;  $1,16 \pm 0,20$ ;  $1,10 \pm 0,22$ , lipídios  $2,03 \pm 0,01$ ;  $2,35 \pm 0,09$ ;  $1,60 \pm 0,60$  e proteínas  $23,80 \pm 0,50$ ;  $21,94 \pm 0,84$ ;  $22,20 \pm 1,13$ , sendo semelhantes

aos valores encontrados nesta pesquisa. Majewska et al<sup>10</sup> avaliaram a composição centesimal do *M. iliofibularis* e encontraram uma umidade de 76,10 %, um pouco acima do registrado nesta pesquisa, porém o percentual de lipídio foi semelhante, qual seja 3,1 %.

Os valores de pH são apresentados na Tabela 2. Carnes com esses valores de pH variando entre 6,16 a 6,44 aproximam-se do que é classificado como carne Dark, Firm and Dry - DFD, que é considerada uma anomalia advinda do processo de pré abate e que de forma geral apresenta-se firme, seca, pegajosa e escura.

Polawska et al<sup>3</sup>, avaliando a média de pH dos músculos de avestruz após 24 horas do abate, classificou como uma carne de pH intermediário, ou seja, pH médio variando entre 5,8 e 6,2, com exceção dos músculos *Ambiens*, *iliofibuaris* e *Medial obturatorius*, resultados semelhantes ao encontrado nesta pesquisa (Tabela 2).

Balog et al<sup>2</sup> avaliaram o processo de abate de avestruzes e as características físicas e químicas da carne, especificamente dos músculos *Gastrocnemius internus* e *Fibulares longus* e encontraram pH de 6,06 e 6,20 logo depois do abate, semelhante aos resultados desta pesquisa, principalmente no músculo *Gastrocnemius internus*.

**Tabela 2.** Composição centesimal dos músculos da perna de avestruz

Parâmetros	<i>Gastrocnemius pars externa</i>		<i>Fibulares longus</i>		<i>Gastrocnemius pars internus</i>		Valor de p
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	
Umidade (g/100 g)	73,28 <sup>a</sup>	0,25	72,58 <sup>a</sup>	0,26	71,43 <sup>b</sup>	0,26	<0,001
RMF (g/100 g)	0,93 <sup>a</sup>	0,011	0,90 <sup>a</sup>	0,05	0,77 <sup>b</sup>	0,03	0,013
Lipídios (g/100 g)	2,50 <sup>a</sup>	0,21	3,83 <sup>ab</sup>	0,06	4,41 <sup>b</sup>	0,12	< 0,001
Proteínas (g/100 g)	22,46 <sup>a</sup>	0,30	21,58 <sup>a</sup>	0,14	22,12 <sup>a</sup>	0,35	0,102
pH	6,16 <sup>a</sup>	0,00	6,23 <sup>a</sup>	0,02	6,44 <sup>a</sup>	0,02	0,07
Aa	0,99 <sup>a</sup>	0,00	0,98 <sup>a</sup>	0,00	0,98 <sup>a</sup>	0,00	0,07
Textura (Kgf/cm <sup>2</sup> )	6,53 <sup>a</sup> ±	0,55	5,14 <sup>a</sup>	0,27	1,58 <sup>b</sup>	0,22	< 0,001
L*	36,49 <sup>a</sup>	0,70	36,12 <sup>a</sup>	0,78	36,78 <sup>a</sup>	2,54	0,93
a*	7,58 <sup>a</sup>	1,18	6,18 <sup>a</sup>	0,23	6,95 <sup>a</sup>	0,39	0,33
b*	5,94 <sup>a</sup>	0,64	5,14 <sup>a</sup>	0,06	5,67 <sup>b</sup>	1,07	0,66

Letras diferentes dentro da mesma linha indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). RMF: Resíduo Mineral Fixo; EPM: Erro Padrão da Média; Aa: Atividade de água

Os valores encontrados na determinação da atividade de água nos músculos *Muscularis gastrocnemius pars externa*, *Muscularis fibulares longus* e *Muscularis gastrocnemius pars internus* não apresentaram diferença significativa, variando de 0,98 a 0,99. Esses resultados estão em concordância com os encontrados por Allonso-Calleja et al<sup>11</sup> que obtiveram valores médios de 0,995 em carne de avestruz resfriada e embalada a vácuo.

Houve diferença ( $p < 0,05$ ) nos valores de textura nos músculos analisados. O *Gastrocnemius pars internus* apresentou uma textura menor do que os outros músculos estudados, o que pode ser explicado por ser um músculo interno privado de grandes contrações musculares, bem como de atrito com o meio externo, diferente dos demais músculos avaliados.

Marks et al<sup>12</sup> avaliaram músculos de seis carcaças de avestruzes quanto ao seu valor de textura em intervalos de uma hora, um dia e uma semana depois do abate, encontraram valores de 10,1 kg/g, 10,0 kg/g, 10,0 kg/g, resultados superiores aos encontrados neste experimento.

Houve diferença ( $p < 0,05$ ) significativa em relação ao parâmetro de cor  $b^*$  entre os músculos avaliados. Segundo Balog et al<sup>2</sup>, a carne de avestruz apresenta uma coloração fortemente avermelhada, isso ocorre devido ao alto teor de ferro, sendo que alguns autores sugerem que dependendo da alimentação e do procedimento de abate, podem assumir colorações mais arroxeadas.

Majewska et al<sup>10</sup>, avaliando a cor do músculo *M. iliofibularis* da coxa do avestruz, encontraram valores para os parâmetros de cor  $L^*$  31,5–33,5,  $a^*$  16,7–19,1 e  $b^*$  11,3–13,1 diferente dos resultados encontrados nesta pesquisa. Hoffman e Fisher<sup>13</sup>, avaliando a cor do *M. iliofibularis*, encontraram  $L^*$  29,42,  $a^*$  5,48 e  $b^*$  3,51 semelhantes aos encontrados nos músculos avaliados.

A carne de avestruz apresentou um valor médio de capacidade de emulsificação 136,40 mL de óleo/0,5 g. Em pesquisas realizadas por Komiyama et al<sup>8</sup>, foi avaliada a capacidade de emulsificação de carne de frango e o valor médio encontrado foi 76,67 mL de óleo/0,5 g, considerada esta carne pelos autores, uma boa matéria-prima para produtos emulsionados.

Desta forma, a carne de avestruz analisada nesta pesquisa, apresenta boa capacidade de formar emulsões, haja vista que apresentou uma capacidade de emulsificação quase duas vezes superior, qual seja, 136,40 mL de óleo/0,5 g, podendo ser utilizada como matéria-prima na elaboração de produtos emulsionados.

O que pode explicar esta superioridade da carne de avestruz na capacidade de emulsificação encontrada neste trabalho em relação à carne de frango é que a carne de avestruz apresenta um percentual de proteína superior ao da carne de frango no músculo estudado. Sales e Hayes<sup>14</sup> compararam a composição centesimal das carnes de avestruz, boi e frango e também encontraram teores de proteínas superiores na carne de avestruz.

A capacidade de absorção de água pode ser influenciada por diversos fatores, por exemplo, o pH. A carne de avestruz apresentou valores de capacidade de retenção de água média de 55,63 %. Komiyama et al<sup>8</sup> avaliaram a capacidade de absorção de água da carne de peito de frango e encontraram valores médios de 57,74 %, semelhante a média encontrada neste experimento. No entanto, Sanfelice et al<sup>15</sup> encontraram valores de 64,54 % em peito de galinhas matrizes pesadas em final de ciclo produtivo.

## CONCLUSÃO

A carne de perna de avestruz apresenta superior rendimento pós-desossa, em relação a outras espécies de aves, bom percentual de macronutrientes, baixa quantidade de gordura, alta capacidade de emulsificação e absorção de água, o que torna possível sua utilização como matéria prima na fabricação de embutidos.

---

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

---

## REFERÊNCIAS

1. Balog A, Almeida PICL. Ostrich (*Struthio camellus*) carcass yield and meat quality parameters. *Rev Bras Ciênc Avic*. 2007;9(4):215-20. [DOI:10.1590/S1516-635X2007000400002].
2. Balog A, Mendes AA, Almeida Paz ICL, Silva MC, Takahashi SE, Komiyama CM. Carne de avestruz: rendimento de carcaça e aspectos físicos e químicos. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2008;28(2):400-7.
3. Poławska E, Marchewka J, Bagniowski E, Wójcik A. The ostrich meat - an updated review. I. Physical characteristics of ostrich meat. *Anim Sci Pap Rep*. 2011;9(1):5-18.
4. Feijó MBS, Mano SB, Jacob SC, Lethiais H, Moraes ML. Carne de avestruz (*Struthio camellus*): proposta de padronização nacional dos cortes e características da carne. *Hig aliment*. 2009;23(178/179):92-7.
5. Association of Official Analytical Chemists - AOAC. Official methods of analysis of AOAC International. 18 ed. Washington (DC): AOAC;2005.
6. Houben JH, Dijk A, Eikelenboom G, Hoving-Bolinkah AH. Effect of dietary vitamin E supplementation, fat level and packagins on coulor stability an lipid oxidation in micend beff. *Meat Sci*. 2000;55(3):331-6.
7. Solomon MB, Liu MN, Patel J, Paroczay E, Eastridge J, Coleman SW. Tenderness improvement in fresh or frozen/thawed beefsteaks treated with hydrodynamic pressure processing. *J Muscle Foods*. 2008;19(1):98-109. [DOI: 10.1111/j.1745-4573.2008.00102.x].
8. Komiyama CM, Mendes AA, Sanfelice C, Canizeres MC, Roça RO, Takahashi SE, et al. Qualidade físico-química e sensorial da carne de peito de matrizes pesadas de descarte. *Cien Rural*. 2010;40(7):1623-9.
9. Flemming JS, Janzen SA, Endo MA. Rendimento de carcaças em linhagens comerciais de frangos de corte. *Arch Vet Sci*. 1999;4(1):61-3. [DOI: <http://dx.doi.org/10.5380/avs.v4i1.3781>].
10. Majewska D, Jakubowska M, Logocki M, Tarasewicz Z, Szczerbinska D, Karamuchi T, et al. Physicochemical characteristics, proximate analysis and mineral composition of ostrich meat as influence by muscle. *Food Chem*. 2009;117(2):207-11. [DOI:10.1016/j.foodchem.2009.03.100].
11. Alonso-Calleja C, Martínez-Fernández B, Prieto M, Capita R. Microbiological quality of vacuum-packed retail ostrich meat in Spain. *Food Microbiol*. 2004;21(2):241-6. [DOI:10.1016/S0740-0020(03)00060-1].
12. Marks J, Stadelman W, Linton R, Schmieder H, Adams R. Tenderness analysis and consumer sensory evaluation of ostrich meat from different muscles and different aging times. *J Food Qual*. 1998;21(5):369-81. [DOI: 10.1111/j.1745-4557.1998.tb00529.x].
13. Hoffman LC, Fisher P. Comparison of meat quality characteristics between young and old ostriches. *Meat Sci*. 2001;59:335-7. [DOI: 10.1016/S0309-1740(01)00055-9].
14. Sales J, Hayes JP. Proximate, amino acid and mineral composition of ostrich meat. *Food Chem*. 1996;56(2):167-70. [DOI: 10.1016/0308-8146(95)00201-4].
15. Sanfelice C, Mendes AA, Komiyama CM, Cañizares MC, Rodrigues L, Cañizares GIL. Avaliação do efeito do tempo de desossa sobre a qualidade da carne de peito de matrizes pesadas de descarte. *Acta Sci Anim Sci*. 2010;32(1):85-92. [DOI: 10.4025/actascianimsci.v32i1.6128].

## Esporotricose em cão Yorkshire Terrier na cidade de São Paulo, SP – Brasil: relato de caso

### Sporotrichosis in Yorkshire Terrier dog in the city of São Paulo, SP – Brazil: case report

RIALA6/1681

Fernanda Fidelis GONSALES<sup>1\*</sup>, Juliana Mariotti GUERRA<sup>2</sup>, Danilo Gouveia WASQUES<sup>3</sup>, Rodrigo Albegaria RÉSSIO<sup>4</sup>, Paulo Eduardo BRANDÃO<sup>5</sup>, Laura Yaneth VILLARREAL Buitrago<sup>6</sup>, Natália Coelho Couto de Azevedo FERNANDES<sup>4</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Laboratório de Bacteriologia e Micologia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP), Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade Universitária São Paulo, SP, Brasil. CEP: 05508 270. Tel: 11 3091-7655. E-mail: fe.gonsales@gmail.com

<sup>2</sup>Núcleo de Anatomia Patológica, Centro de Patologia, Instituto Adolfo Lutz

<sup>3</sup>Histopet, Patologia Veterinária

<sup>4</sup>Núcleo de Patologia Quantitativa, Centro de Patologia, Instituto Adolfo Lutz

<sup>5</sup>Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo

<sup>6</sup>MSD Brasil

Recebido: 19.10.2015 - Aceito para publicação: 30.12.2015

#### RESUMO

A esporotricose é uma micose subcutânea de implantação causada pelo fungo dimórfico *Sporothrix* spp. que acomete seres humanos e animais, sendo rara em cães e com baixo potencial zoonótico. O presente relato refere-se a um cão da raça Yorkshire Terrier, fêmea, com um ano de idade, sem histórico de contato com felinos, que apresentou lesão cutânea em membro torácico direito, resistente ao tratamento com antibiótico. A amostra obtida da biópsia excisional da lesão foi enviada para realização de exame histopatológico (H&E, PAS e Grocott) e análise imuno-histoquímica para a investigação de dermatozoonoses. Os resultados confirmaram o diagnóstico de *Sporothrix* spp. O animal foi tratado com itraconazol (10 mg/kg/dia via oral durante 120 dias). Não foram observadas lesões após 11 meses do início do tratamento. Atualmente, a esporotricose não é considerada como doença de notificação compulsória. Entretanto, é importante conscientizar os profissionais veterinários quanto ao potencial zoonótico da doença, e quanto às características clínicas, que podem ser sutis e semelhantes à outras dermatopatias comuns.

**Palavras-chave.** *Sporothrix*, cão, imuno-histoquímica, dermatite ocupacional, zoonose.

#### ABSTRACT

Sporotrichosis is an implantation or subcutaneous mycosis caused by the dimorphic fungus *Sporothrix* spp. that infects both humans and animals. Dogs are rarely affected and this microorganism is considered as of low zoonotic potential. The present study reports a case of sporotrichosis in a one year old female Yorkshire Terrier dog, with no history of previous contact with cats. Histopathological and immunohistochemical analyses performed in the sample, collected by means of the lesion biopsy, revealed a nodular dermatitis with intra-lesion *Sporothrix* spp. The dog was treated with itraconazole (10 mg/kg/day for 120 days). No additional skin lesions were detected, 11 months after starting the treatment. Currently, sporotrichosis has not been included as a disease requiring the mandatory report. However, it is important to instruct the professionals concerning the zoonotic potential of this disease, and on the clinical features which might be very subtle and similar to those found in the most common skin diseases.

**Keywords.** *Sporothrix*, dog, immunohistochemistry, occupational dermatitis, zoonosis.

A esporotricose é uma micose subcutânea de implantação<sup>1</sup> causada pelo fungo dimórfico *Sporothrix* spp. que acomete seres humanos e animais<sup>2,3</sup>. *Sporothrix schenckii* tem distribuição natural geográfica cosmopolita e tem sido isolado como saprófita a partir do solo e de vegetais<sup>4</sup>. A esporotricose é uma zoonose e o felino doméstico é considerado a principal fonte de infecção. A transmissão ocorre via mordedura ou arranhadura do animal infectado. Os indivíduos mais frequentemente acometidos são donas de casa, médicos veterinários e cuidadores de animais<sup>1</sup>. A esporotricose em cães é considerada rara e com baixo potencial zoonótico<sup>2,3,5</sup>, não sendo diretamente envolvidos na transmissão da doença, devido a escassez de células fúngicas em lesões e a ausência do agente na cavidade bucal<sup>1</sup>. O conhecimento atual da esporotricose canina é derivado de alguns relatos de caso isolados<sup>1</sup>.

A esporotricose é considerada a micose subcutânea mais importante em saúde pública em diversos países<sup>5</sup>. No Brasil, os primeiros casos de esporotricose zoonótica (*Sporothrix schenckii*), transmitida por gato, foram relatados pelo Instituto Evandro Chagas, Fiocruz, no Rio de Janeiro, entre 1994 e 1997<sup>1</sup>. Até a década de 1990, havia somente 12 casos relatados envolvendo cães. Desde 1998, o número de casos de esporotricose zoonótica no Rio de Janeiro aumentou, exponencialmente, devido a uma epidemia que, ainda hoje, afeta seres humanos e animais domésticos<sup>1</sup>.

Em 2006, na região metropolitana do Rio de Janeiro, foram diagnosticados 44 cães com a doença, avaliados por um período de 5 anos. Atribuiu-se aos gatos contactantes a responsabilidade pela infecção deste elevado número de cães<sup>4</sup>.

A esporotricose é considerada a segunda dermatose mais frequente entre felinos domésticos atendidos em clínicas dermatológicas em São Paulo: 18 a 21 % de todas as dermatoses de gatos avaliados no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo - HOVET/FMVZ USP, entre 1986 e 2007. No mesmo período, entretanto, nenhum caso canino foi diagnosticado neste hospital<sup>6</sup>.

O método de referência para o diagnóstico dessa micose é o isolamento e identificação do fungo em cultura. Contudo, frequentemente o diagnóstico presuntivo é obtido por identificação histológica em bloco de parafina, particularmente quando a infecção fúngica não era suspeita no momento da biopsia<sup>2,3</sup>.

O presente caso refere-se a um cão da raça Yorkshire Terrier, fêmea, com 1 ano de idade, proveniente da cidade de Nova York, Estados Unidos, atendido em uma clínica veterinária na cidade de São Paulo. O animal foi encaminhado para atendimento veterinário com presença de lesão cutânea nodular circular e alopecica, medindo cerca de 2,5 cm de diâmetro, localizada em membro torácico direito, com tempo de evolução de 15 dias, segundo relato do tutor. Apresentava-se em bom estado geral, sem outra queixa. O quadro dermatológico teve início sete meses após a chegada do animal no Brasil, com crescimento lento durante 15 dias até o momento da consulta. A cadela vivia em regime domiciliado, em convívio com 4 animais da mesma raça, contactantes e assintomáticos. O animal realizava passeios monitorados pelo tutor, nunca havendo contato com gatos. Pelas características macroscópicas da lesão (Figura 1), inicialmente, a suspeita clínica foi de lesão bacteriana por provável causa traumática, corroborada pela alta incidência da mesma em cães residentes na área urbana de São Paulo.

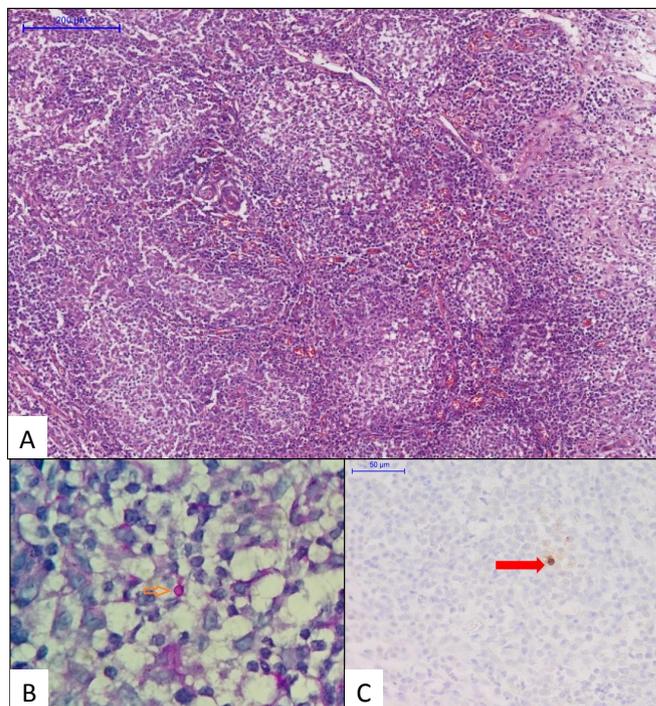


**Figura 1.** Lesão cutânea nodular arredondada em membro torácico direito de um cão da raça Yorkshire Terrier, fêmea, com 1 ano de idade

Duas aplicações de cefovecina sódica (8 mg/kg via subcutânea), em intervalo de 14 dias, foram administradas ao animal. Após 1 mês do início do tratamento, a lesão permaneceu inalterada.

Deste modo, optou-se pela realização de biópsia excisional da lesão e o fragmento obtido foi fixado em solução de formalina 10 % e encaminhado para análise histopatológica. Por não haver inicialmente suspeita de etiologia fúngica, não foi realizada coleta de material biológico para cultura. Nos cortes corados por hematoxilina e eosina, observou-se dermatite piogranulomatosa multifocal coalescente moderada a severa, sugerindo os principais diagnósticos diferenciais de síndrome do piogranuloma estéril, ou dermatite piogranulomatosa associada a agentes infecciosos (Figura 2A). Para esclarecimento etiológico, procedeu-se colorações de ácido periódico de Schiff (PAS) e Grocott-Gomori. Foram, então, evidenciadas, ao centro dos piogranulomas, raras estruturas arredondadas diminutas compatíveis com leveduras, sendo a principal suspeita de esporotricose (Figura 2B). Para confirmação, o material foi encaminhado ao Instituto Adolfo Lutz para exame imuno-histoquímico para investigação de dermatozoonoses. Para isto, foram procedidos novos cortes histológicos em lâminas silanizadas a 3 µm, recuperação antigênica em panela de pressão (pH 6,0), bloqueio de peroxidase endógena e incubação com anticorpos primário anti-*Sporothrix* spp. (policlonal), anti-*Cryptococcus* spp. e anti-*Histoplasma* spp. (policlonal). Posteriormente, incubou-se com anticorpo secundário ligado a polímero e procedeu-se revelação com 3,3'-diaminobenzidina e contra-coloração com hematoxilina. Não foi observada imunomarcagem para *Cryptococcus* spp. e *Histoplasma* spp., no entanto, notou-se marcação acastanhada de estruturas arredondadas no centro dos piogranulomas compatíveis com *Sporothrix* spp. (Figura 2C).

Com o estabelecimento do diagnóstico, foi instituída terapia medicamentosa com itraconazol (10 mg/kg/dia via oral, por 120 dias). O animal respondeu bem à terapia, sem aparecimento de novas lesões, mesmo após 11 meses do início do tratamento.



**Figura 2.** Fotomicrografia de pele de cão. (A) Reação piogranulomatosa em derme profunda. Aumento de 20 x, coloração por H&E. (B) Coloração histoquímica evidencia presença de estruturas arredondadas positivas (seta). Aumento de 1000 x, coloração de ácido periódico de Schiff (PAS). (C) Imuno-histoquímica positiva para presença de antígenos anti-*Sporothrix* spp. (seta). Aumento de 40 x, contra-coloração com hematoxilina

O presente relato difere da casuística observada no Brasil, por acometer animal oriundo de uma área não considerada endêmica para esporotricose (Zona Oeste de São Paulo); por ser da espécie canina e não ter tido relato de contato com gatos, considerados a principal fonte de infecção para a esporotricose<sup>1</sup>. Em cães a localização mais frequentemente observada da esporotricose é o focinho, provavelmente, em decorrência do hábito destes animais em farejar o ambiente<sup>1</sup>. Testículos, cavidade bucal e mucosa conjuntiva<sup>5</sup>, também são descritas como áreas em que o fungo é encontrado.

Outra via de transmissão da esporotricose inclui a inoculação do agente do solo ou vegetal contaminado<sup>7</sup>. À parte tem sido relatada, em outros Estados, como uma doença ocupacional, contraída por profissionais de jardinagem ou floricultura, em contato com material vegetal e

solo contaminado<sup>7</sup>. De fato, no presente caso canino, esta parece ser uma hipótese mais provável, já que não foi observado contato do animal com felinos. Embora o cão fosse mantido em regime domiciliado, era submetido a eventuais passeios em ambiente externo, sempre supervisionado de seus tutores. Não é possível descartar a possibilidade de inoculação por meio de contato com solo ou vegetal contaminado em parques, praças ou jardins.

O presente caso exibiu lesão dérmica, com infiltrado predominantemente piogranulomatoso, exibindo raras células fúngicas. Esta observação, vai de acordo com o relatado por Miranda et al<sup>8</sup> que, em estudo de 86 cães com esporotricose no Rio de Janeiro, observaram 89,5 % dos casos com infiltrado piogranulomatoso, com presença de poucas leveduras, recomendando a realização de cortes seriados nos casos suspeitos<sup>3</sup>. Uma vez que não se obteve amostra biológica sem fixador, não foi possível isolamento fúngico e determinação da espécie. Recentemente, houve mudança na classificação taxonômica do *Sporothrix*. A esporotricose sempre foi atribuída ao fungo *Sporothrix schenckii*, única espécie considerada patogênica para homem e animal, mas com análises fenotípicas e genotípicas, atualmente passam a ser pertencentes ao complexo *Sporothrix schenckii*, 6 espécies crípticas<sup>8</sup>.

Apesar do itraconazol ser o medicamento de primeira escolha<sup>9</sup>, terapias alternativas são sugeridas para o tratamento da esporotricose. Larsson et al<sup>6</sup> sugerem, para os casos de esporotricose em cães, a administração de iodeto de sódio ou potássio a 20 % (40 mg/kg a cada 8 horas, via oral, enquanto houver lesão, e após a remissão da mesma, por mais 30 dias).

Souza et al<sup>10</sup> relataram um caso de esporotricose canina, cuja terapia instituída foi a administração do itraconazol. O animal por esse grupo relatado não apresentou efeitos adversos ao uso do medicamento<sup>10</sup>.

A esporotricose não é doença de notificação compulsória; entretanto, é importante conscientizar profissionais veterinários quanto ao potencial zoonótico da doença, e quanto às características clínicas da doença, que podem ser, como no presente caso, sutis e semelhantes

a outras dermatopatias comuns. O diagnóstico correto da etiologia permite a conduta clínica adequada, com administração de antifúngicos, além do alerta para os contactantes, humanos e animais, para evitar a exposição ao agente. Por ser uma zoonose com número crescente de casos relatados no Rio de Janeiro, os casos suspeitos de esporotricose devem ser investigados e reportados.

## REFERÊNCIAS

1. Schechtman RC. Sporotrichosis: Part II. *Skinmed*. 2010;8(5):275–80.
2. Miranda LH, Quintella LP, Menezes RC, dos Santos IB, Oliveira RVC, Figueiredo FB, et al. Evaluation of immunohistochemistry for the diagnosis of sporotrichosis in dogs. *Vet J*. 2011;190(3):408–11. [DOI:10.1016/j.tvjl.2010.12.004].
3. Miranda LHM, Quintella LP, dos Santos IB, Menezes RC, Figueiredo FB, Gremião IDF, et al. Histopathology of canine sporotrichosis: A morphological study of 86 cases from Rio de Janeiro (2001–2007). *Mycopathologia*. 2009;168(2):79–87. [DOI: 10.1007/S11046-009-9198-4].
4. Schubach TMP, Schubach AO, Okamoto T, Barros MBL, Figueiredo FB, Cuzzi T, et al. Canine sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: clinical presentation, laboratory diagnosis and therapeutic response in 44 cases (1998–2003). *Med Mycol*. 2006;44(1):87–92.
5. Madrid IM, Mattei AS, Fernandes CG, de Oliveira Nobre M, Meireles MC. Epidemiological findings and laboratory evaluation of sporotrichosis: a description of 103 cases in cats and dogs in southern Brazil. *Mycopathologia*. 2012;173(4):265–73. [DOI: 10.1007/s11046-011-9509-4].
6. Larsson CE. Esporotricose. *Braz J Vet Res Anim Sci*. São Paulo. 2011;48(3):250–9.
7. Lopes JO, Alves SH, Mari CR, Brum LM, Westphalen JB, Altermann MJ, et al. Epidemiologia da esporotricose na região central do Rio Grande do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1999; 32(5):541-5. [DOI: 10.1590/S0037-86821999000500012].

8. Cruz LCH. Complexo *Sporothrix schenckii*. Revisão de parte da literatura e considerações sobre o diagnóstico e a epidemiologia. *Vet Zootec*. 2013; 20 (Edição Comemorativa): 08-28.
9. Center for Disease Control and Prevention CDC. U.S.A Department of Health & Human Service (acesso 2016 Maio 16). Disponível em: [<http://www.cdc.gov/fungal/diseases/sporotrichosis/>].
10. Souza NT, Nascimento ACBM, Souza JOT, Santos FCGCA, Castro RB. Esporotricose canina: relato de caso. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2009; 61(3): 572-6. [DOI:10.1590/SO102.09352009000300008].

## Avaliação de diferentes vias de imunização com novo adjuvante para *Neisseria meningitidis* em diferentes linhagens de camundongos

Evaluation of different immunization routes with new adjuvant for *Neisseria meningitidis* in different strains of mouse

RIALA6/1682

Brito LT. **Avaliação de diferentes vias de imunização com novo adjuvante para *Neisseria meningitidis* em diferentes linhagens de camundongos.** São Paulo 2015. 110 p. [Dissertação de Mestrado – Biotecnologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, USP]. Orientador: Elizabeth Natal De Gaspari.

Na primeira parte do estudo camundongos Swiss foram imunizados por diferentes vias de imunização com OMVs de *Neisseria meningitidis* com DDA-BF ou HA como adjuvantes. Os adjuvantes e diferentes vias foram comparados quanto às respostas imunes por meio de ELISA, *Immunoblot*, HTT e análise histopatológica. Os animais imunizados apenas com adjuvantes não produziram títulos de anticorpos. Após única dose e decorridos 15 dias, a imunização com HA e antígeno apresentou títulos de IgG mais altos em relação ao DDA-BF nas vias subcutânea, intraperitoneal e intramuscular. Após 2 doses e 66 dias, todas as vias exibiram títulos de IgG, sendo as que receberam o HA com OMVs produziram títulos discretamente mais altos e ainda altos índices de avidéz. O perfil da resposta imune quanto ao padrão Th 1/Th 2 foi avaliado. Ambos adjuvantes promoveram a produção de IgG2a, as respostas variaram de acordo com as vias de imunização utilizada. Enquanto as vias subcutânea e intramuscular induziram títulos semelhantes de IgG2a para ambos adjuvantes, a via intraperitoneal com DDA teve título mais alto. A produção de IgG1 foi modulada apenas por HA, sendo mais robusta na via subcutânea, seguida pela intramuscular com valores muito próximos aos da intraperitoneal. Camundongos isogênicos Balb/c H2<sup>d</sup> e C57Bl/6J H2<sup>b</sup> foram imunizados pela via subcutânea. Foram avaliadas as produções de anticorpos do tipo IgG, IgG1 e IgG2a, bem como o índice de avidéz de IgG. De modo geral, os grupos de OMVs HA induziram maior produção de anticorpos que OMVs DDA ou apenas OMVs, enquanto os controles HA, DDA e salina não apresentaram níveis de anticorpos. Pelas técnicas utilizadas no estudo não observamos uma diferença significativa entre os dois adjuvantes utilizados independente da via e da linhagem de camundongos utilizados.

**Palavras-chave.** *Neisseria meningitidis* B, vesículas de membrana externa, DDA-BF, adjuvantes, linhagens isogênicas, análise histopatológica

Tese disponível em: <http://www.teses.usp.br>

E-mail: [egaspari@ial.sp.gov.br](mailto:egaspari@ial.sp.gov.br)

## Imunogenicidade de antígenos de vesículas de membrana externa (OMVs) de *Neisseria meningitidis* B associado a lípide catiônico (DDA-BF)

Immunogenicity of *Neisseria meningitidis* B outer membrane vesicles (OMVs) associated with cationic lipid (DDA-BF)

RIALA6/1683

Rinaldi FM. **Imunogenicidade de antígenos de vesículas de membrana externa (OMVs) de *Neisseria meningitidis* B associado a lípide catiônico (DDA-BF).** São Paulo 2014. 130 p. [Dissertação de Mestrado - Biotecnologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo – USP]. Orientador: Elizabeth Natal De Gaspari.

*Neisseria meningitidis* é um diplococo Gram-negativo, aeróbio e encapsulado, causador mais comum de meningite e septicemia. Este agente é o principal causador de infecções bacterianas invasivas no mundo. Apesar de existirem 13 sorogrupos de *N. meningitidis*, apenas 6 são capazes de causar infecção: A, B, C, W135, X e Y. O sorogrupo B difere dos outros sorogrupos patogênicos por sua cápsula polissacáride ter composição idêntica ao ácido poliacrílico, presente em muitas glicoproteínas humanas, particularmente encontrados no tecido cerebral fetal, e bioquimicamente homóloga com a estrutura molecular de adesão do neurônio. Sendo assim, a cápsula polissacáride não pode ser usada em vacinas conjugadas, pois pode causar autoimunidade, sendo pouco imunogênica. Doenças meningocócicas causadas pelos sorogrupos A, C, Y e W135 podem ser prevenidas pelas vacinas que contêm polissacarídeos capsulares específicos conjugados. Para que uma vacina seja eficaz contra o sorogrupo B, é importante que esta abranja todos os sorotipos e seja capaz de promover imunidade duradoura, principalmente em crianças abaixo de dois anos, as mais acometidas. Vacinas baseadas em vesículas de membrana externa (OMVs, do inglês *Outer Membrane Vesicles*) de *N. meningitidis* B são amplamente estudadas. No presente estudo, OMVs de meningococo B (B:4:P1.9) foram associadas a um lípido catiônico, o dioctadecildimetilamônio (DDA-BF) em preparação antigênica testada em camundongos fêmeas não isogênicos, e comparamos os títulos de anticorpos IgG, IgG1, IgG2a e IgG2b com os anticorpos produzidos por camundongos imunizados com a mesma OMVs associada ao hidróxido de alumínio, por ELISA. As análises foram realizadas com soros de cada animal colhidos individualmente, após 60 dias de imunização. A avidéz dos anticorpos também foi analisada por ELISA. *Immunoblot* e *dot*-ELISA avaliaram a reação específica entre a cepa homóloga usada na imunização e a reação a antígenos cruzados com outras cepas de meningococo. A hipersensibilidade tardia (HTT) foi comparada entre os dois grupos experimentais, após o desafio com cepa homóloga em uma das patas, depois de 24 horas da injeção, após 14 dias da primeira dose de imunização.

**Palavras-chave.** *Neisseria meningitidis* B, vesículas de membrana externa, DDA-BF, adjuvante, vacinas meningocócicas, avidéz.

Tese disponível em: <http://www.teses.usp.br>

E-mail: [egaspari@ial.sp.gov.br](mailto:egaspari@ial.sp.gov.br)

## COLABORADORES

## Agradecimento aos relatores

O Corpo Editorial agradece a todos os relatores abaixo relacionados que, com seu trabalho voluntário e anônimo ao longo de 2015 contribuíram para o bom andamento das atividades e elevação do nível dos artigos publicados pela Revista.

- **Adriano Gomes da Cruz** Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Tecnologia de Alimentos. Campinas, SP
- **Alceu Afonso Jordão Junior** Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Clínica Médica. Ribeirão Preto, SP
- **Alcina Maria Liserre** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Alimentos, Núcleo de Microbiologia. São Paulo, SP
- **Alexandre Ribeiro Bello** Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas, Laboratório de Biologia Molecular. Rio de Janeiro, RJ
- **Alexandre Tourino Mendonça** Universidade Vale do Rio Verde. Três Corações, MG
- **Alicia de Francisco** Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos. Florianópolis, SC
- **Aline Martins de Carvalho** Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública. São Paulo, SP
- **Aline Sobreira Bezerra** Universidade Federal de Santa Maria. Palmeira das Missões, RS
- **Amanda Bagolin do Nascimento** Universidade Federal de Santa Catarina, Núcleo de Pesquisa de Nutrição em Produção de Refeições. Florianópolis, SC
- **Ana Carolina Maisonnave Arisi** Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Florianópolis, SC
- **Ana Flávia Santos Coelho** Fundação Universidade Federal do Tocantins, Engenharia de Alimentos, Laboratório de Microbiologia de Alimentos. Palmas, TO
- **Ana Lucia Frugis Yu** Secretaria de Estado da Saúde do Estado de São Paulo, Coordenadoria de Controle de Doenças, Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”, Divisão de Doenças de Transmissão Respiratória. São Paulo, SP
- **Ana Maria Centola Vidal Martins** Centro Universitário de Rio Preto. São José do Rio Preto, SP
- **Ana Marta Ribeiro Machado** Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, SP
- **Ana Paula Guedes Frazzon** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Departamento de Microbiologia. Porto Alegre, RS
- **Bruno Carius Garrido** Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, Diretoria de Metrologia Científica e Industrial, Divisão de Metrologia Química, Laboratório de Análise Inorgânica. Duque de Caxias, RJ
- **Carla da Silva Carneiro** Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Farmácia, Departamento de Produtos Naturais e Alimentos. Rio de Janeiro, RJ

- **Carla Léa de Camargo Vianna Cruz** Instituto de Tecnologia de Alimentos, Cereal/Chocotec. Campinas, SP
- **Carlos Cordeiro** Universidade Federal do Pará, Faculdade de Engenharia de Pesca, Laboratório de Tecnologia do Pescado. Bragança, PA
- **Cássia Aldrin de Mello** Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia. Cuiabá, MT
- **Cátia Regina Storck** Centro Universitário Franciscano. Santa Maria, RS
- **Cecilia Cristina Marques dos Santos** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Laboratórios Regionais de São José do Rio Preto, Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas. São José do Rio Preto, 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
- **Christian Mauricio Barreto** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada. Porto Alegre, RS
- **Christiane Soares Pereira** Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Departamento de Bacteriologia. 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
- **Cyntia Maria Telles Fadel-Picheth** Universidade Federal do Paraná, Departamento de Patologia Médica, Setor de Ciências da Saúde. Curitiba, PR
- **Daiana Novello** Universidade Estadual do Centro-Oeste do Paraná, Departamento de Nutrição. Guarapuava, PR
- **Daisy Pontes Netto** Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva. Londrina, PR
- **Daniel Granato** Wageningen University, Institute of Food Safety. Wageningen, Holanda
- **Daniele Leal** Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, SP
- **Delvio Sandri** Universidade de Brasília. Brasília, DF
- **Dennis Armando Bertolini** Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas. Maringá, PR
- **Diana Kolberg** Instituto de Tecnologia de Pernambuco, Laboratório de Análises de Resíduos de Agrotóxicos e de Produtos Alcoólicos – LabTox. Recife, PE
- **Edimir Andrade Pereira** Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, PR

- **Elayse Maria Hachich** Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. São Paulo, SP
- **Eliana Fortes Gris** Universidade de Brasília. Brasília, DF
- **Eliane Gil Rodrigues de Castro** Universidade de São Paulo, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina, Instituto da Criança, Centro de Assistência Toxicológica. São Paulo, SP
- **Eliete Caló Romero** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Bacteriologia, Núcleo de Doenças Entéricas e Infecções por Patógenos Especiais. São Paulo, SP
- **Elisangela Elena Nunes Carvalho** Universidade Federal de Lavras, Departamento de Ciências dos Alimentos. Lavras, MG
- **Elizabeth A. Accioly** Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição “Josué de Castro”, Departamento de Nutrição e Dietética. Rio de Janeiro, RJ
- **Elton Nunes Britto** Centro Universitário Nilton Lins. Manaus, AM
- **Elza Kimura Grimshaw** Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Farmácia e Farmacologia. Maringá, PR
- **Erika Madeira Moreira da Silva** Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde. Vitória, ES
- **Fabio Cristiano Brod** Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Laboratório de Biologia Molecular. Florianópolis, SC
- **Fernanda Barbosa dos Reis** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Ribeirão Preto, SP
- **Fernanda Fidelis Gonsales** Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. São Paulo, SP
- **Fernando Mauro Pereira Soares** Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Saúde e Biotecnologia. Coari, AM
- **Geraldo Arraes Maia** Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, CE
- **Giselle Nobre Costa** Universidade do Oeste do Paraná. Londrina, PR
- **Gladis Aver Ribeiro** Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia. Capão do Leão, RS
- **Graça Maria de Castro Viana** Universidade Federal do Maranhão, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Patologia. São Luís, MA
- **Graciele da Silva Campelo Borges** Universidade Federal da Paraíba, Centro de Tecnologia. João Pessoa, PB
- **Heitor Franco de Andrade Jr** Universidade de São Paulo, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Laboratório de Protozoologia. São Paulo, SP
- **Helena Keico Sato** Secretaria de Estado da Saúde do Estado de São Paulo, Coordenadoria de Controle de Doenças, Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. São Paulo, SP

- **Herminia Yohko Kanamura** Universidade Federal de Alfenas, Departamento Patologia e Parasitologia. Alfenas, MG
- **Ilana Teruszkin Balassiano** Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Zoonoses Bacterianas, Serviço de Referência em Leptospirose. Rio de Janeiro, RJ
- **Ingrid Cabral Machado** Instituto de Pesca, Centro Avançado da Pesquisa Tecnológica do Agronegócio do Pescado Marinho. Santos, SP
- **Ismael Rockenbach de Miranda** Universidade Federal da Paraíba, Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional, Departamento de Tecnologia de Alimentos. João Pessoa, PB
- **Jacinto da Costa Silva Neto** Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Histologia e Embriologia. Recife, PE
- **Jane Martha Graton Mikcha** Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas. Maringá, PR
- **João Vicente Neto** Escola Agrotécnica Federal de Cáceres. Cáceres, MT
- **Jorge Luiz Fortuna** Universidade do Estado da Bahia, Departamento de Educação, Laboratório de Microbiologia. Teixeira de Freitas, BA
- **José Aires Ventura** Instituto Capixaba de Pesquisa Assistência Técnica e Extensão Rural. Vitória, ES
- **José Ângelo Wenceslau Góes** Universidade Federal da Bahia, Escola de Nutrição. Salvador, BA
- **José Raniere Mazile Vidal Bezerra** Universidade Estadual do Centro-Oeste do Paraná, Departamento de Engenharia de Alimentos. Guarapuava, PR
- **Josefa Bezerra da Silva** Instituto Butantan, Centro de Biotecnologia, Laboratório de Biotecnologia Molecular I. São Paulo, SP
- **Juliana Mariotti Guerra** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Patologia, Núcleo de Patologia Quantitativa. São Paulo, SP
- **Leyva Cecília Vieira de Melo** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Parasitologia e Micologia, Núcleo de Enteroparasitas. São Paulo, SP
- **Lilian Viana Teixeira** Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Departamento de Tecnologia e Inspeção. Belo Horizonte, MG
- **Lívia de Lacerda de Oliveira Pineli** Universidade de Brasília. Brasília, DF
- **Lizziane Kretli Winkelströter** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Ribeirão Preto, SP
- **Lourdes Rehder de Andrade Vaz de Lima** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Imunologia. São Paulo, SP
- **Lúcia Maria Lopes de Almeida Guedes Diefenbach** Laboratório Central de Saúde Pública do Rio Grande do Sul, Divisão de Análise de Produtos, Seção de Microscopia e Triagem. Porto Alegre, RS

- **Lúcia Rosa de Carvalho** Universidade Federal Fluminense, Centro de Ciências Médicas, Faculdade de Nutrição. Niterói, RJ
- **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
- **Luciano José Quintão Teixeira** Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Engenharia Rural. Alegre, ES
- **Luciléia Granhen Tavares Colares** Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição “Josué de Castro”, Departamento de Nutrição e Dietética, Laboratório de Pesquisa e Extensão em Sustentabilidade na Produção de Refeições. Rio de Janeiro, RJ
- **Lucilene Granuzzio Camossi** Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Piracicaba, SP
- **Luisa Patrícia Fogarolli de Carvalho** Universidade José do Rosário Vellano, Faculdade de Ciências Médicas, Hospital Universitário Alzira Velano. Alfenas, MG
- **Luiz Simeão do Carmo** Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia. Belo Horizonte, MG
- **Marcelo Fabiano Gomes Boriollo** Universidade José do Rosário Vellano. Alfenas, MG
- **Márcia Bittar Atui** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Alimentos, Núcleo de Morfologia e Microscopia. São Paulo, SP
- **Márcia de Aguiar Ferreira** Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Brasília, DF
- **Marcia de Souza Carvalho Melhem** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Laboratórios Regionais de Rio Claro, Núcleo de Ciências Biomédicas. Rio Claro, SP
- **Marcia Helena de Rizzo Matta** Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Departamento de Química. Campo Grande, MT
- **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
- **Marcondes Viana da Silva** Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Departamento de Estudos Básicos e Instrumentais, Núcleo de Estudos em Ciência de Alimentos. Itapetinga, BA
- **Marcone Augusto Leal de Oliveira** Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química. Juiz de Fora, MG
- **Maria Auxiliadora de Brito Rodas** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Alimentos, Núcleo de Química, Física e Sensorial. São Paulo, SP

- **Maria Claudia Dantas Porfirio Borges** Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Departamento de Microbiologia. Goiânia, GO
- **Maria da P. Spinola Miranda** Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Departamento de Análises Bromatológicas. Salvador, BA
- **Maria das Graças Xavier de Carvalho** Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, Laboratório de Tecnologia e Inspeção de Leite. Patos, PB
- **Maria de Fátima Costa Pires** Secretaria de Estado da Saúde do Estado de São Paulo, Coordenadoria de Controle de Doenças, Programa de Pós Graduação em Ciências. São Paulo, SP
- **Maria Fernanda Rios Grassi** Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. Salvador BA
- **Maria Helena Wohlers Morelli Cardoso** Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Departamento de Química, Laboratório de Alimentos e Contaminantes. Rio de Janeiro, RJ
- **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 Margareth Veloso Naves** Universidade Federal de Goiás. Goiânia, GO
- **Maria Regina Branquinho** Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Departamento de Microbiologia, Setor de Biologia Molecular. Rio de Janeiro, RJ
- **Maria Regina Reis Amendoeira** Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Toxoplasmose. Rio de Janeiro, RJ
- **Maria Teresa de Alvarenga Freire** Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia de Alimentos. Pirassununga, SP
- **Mauro Batista de Moraes** Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Pediatria. São Paulo, SP
- **Monica Beatriz Alvarado Soares** Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Departamento de Tecnologia de Alimentos. Erechim, RS
- **Myrian Morato Duarte** Fundação Ezequiel Dias, Laboratório de Biologia Molecular. Belo Horizonte, MG
- **Nancy da Rós** Instituto Butantan, Divisão de Desenvolvimento Tecnológico e Produção. São Paulo, SP
- **Natália Coelho Couto de Azevedo** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Patologia, Núcleo de Anatomia Patológica. São Paulo, SP
- **Natalia Paroul** Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Departamento de Química. Erechim, RS
- **Nilcimelly Rodrigues Donato** Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Educação e Saúde. Cuité, PB
- **Patrícia Carla B. Trevizam Moraes** Universidade Metodista de Piracicaba. Piracicaba, SP
- **Patrícia Yoshida Faccioli Martins** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Caprinos e Ovinos, Área de Sanidade Animal. Sobral, CE

- **Paula Dias Bevilacqua** Universidade Federal de Viçosa, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Veterinária. Viçosa, MG
- **Paulo Afonso Lopes** Instituto Militar de Engenharia, Seção de Engenharia de Construção. Rio de Janeiro, RJ
- **Pedro Ysmael Cornejo Mujica** Universidade Federal do Tocantins, Laboratório de Tecnologia de Carnes, Pescados e Derivados. Palmas, TO
- **Priscila Cristina Bizam Vianna** Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Instituto de Ciências Tecnológicas e Exatas, Departamento de Engenharia dos Alimentos. Uberaba, MG
- **Rafael Silva Cadena** Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Laboratório de Análise Sensorial. Campinas, SP
- **Raquel Gouvêa** Universidade Federal Fluminense, Centro de Ciências Médicas, Departamento de Tecnologia de Alimentos. Niterói, RJ
- **Regina Célia Rodrigues de Miranda Milagres** Universidade Federal de Viçosa, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Nutrição e Saúde. Viçosa, MG
- **Renata Alexandra Moreira das Neves** Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Saúde Coletiva e Nutrição. Natal, RN
- **Renata Golin Bueno Costa** Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Centro Tecnológico Instituto de Laticínios Cândido Tostes. Juiz de Fora, MG
- **Renato Souza Cruz** Universidade Estadual de Feira de Santana, Departamento de Tecnologia. Feira de Santana, BA
- **Ricardo Ishak** Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biomédicas, Laboratório de Virologia. Belém, PA
- **Ricardo Targino Moreira** Universidade Federal da Paraíba, Centro de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Química e de Alimentos. João Pessoa, PB
- **Rinaldini Coralini PhilppoTancredi** Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Escola de Nutrição. Rio de Janeiro, RJ
- **Rita de Cássia Coelho de Almeida Akutsu** Universidade de Brasília, Departamento de Nutrição. Brasília, DF
- **Roberto Carlos Fernandes Barsotti** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Laboratórios Regionais de Santos, Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas. Santos, SP
- **Roberto Christ Vianna Santos** Centro Universitário Franciscano, Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Clínica. Santa Maria, RS
- **Rodrigo Caciano de Sena** Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, Diretoria de Metrologia Científica e Industrial, Divisão de Metrologia Química, Laboratório de Análise Inorgânica. Duque de Caxias, RJ
- **Rodrigo Costa da Silva** Mississippi State University, College of Veterinary Medicine, Pathobiology and Population Medicine, Comparative Platelet Investigation Laboratory and Molecular Diagnosis Laboratory. Mississippi, USA
- **Ruth Estela Gravato Rowlands** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Alimentos, Núcleo de Microbiologia. São Paulo, SP

- Rósea de Cássia Vieira Cardoso** Universidade Federal da Bahia, Escola de Nutrição, Departamento de Ciência dos Alimentos. Salvador, BA
- **Sabrina Neves Casarott** Universidade Estadual Paulista, Campus de São José do Rio Preto. São José do Rio Preto, SP
  - **Sheila Araujo Teles** Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Enfermagem e Nutrição, Departamento de Enfermagem. Goiânia, GO
  - **Sidney Augusto Vieira Filho** Universidade Federal de Ouro Preto, Escola de Farmácia, Departamento de Farmácia. Ouro Preto, MG
  - **Silvana Gonçalves Brito de Arruda** Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, Núcleo de Nutrição. Vitória de Santo Antão, PE
  - **Silvia Helena Govoni Brondi** Centro de Desenvolvimento de Indústrias Nascentes. São Carlos, SP
  - **Simone Baldini Lucheis** Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Gabinete da Coordenadoria, Departamento de Descentralização do Desenvolvimento. Bauru, SP
  - **Soraia Vilela Borges** Universidade Federal de Lavras, Departamento de Ciência dos Alimentos. Lavras, MG
  - **Sueli Blanes Damy** Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Departamento de Cirurgia, Disciplina de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental. São Paulo, SP
  - **Tiane Martin de Moura** Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Nutrição. Pelotas, RS
  - **Valéria Adriana Pereira Martins** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes, Núcleo de Ensaios Físicos e Químicos em Medicamentos. São Paulo, SP
  - **Vanda de Sá Lirio** Coordenação de Vigilância em Saúde, Subgerência de Laboratório de Controle de Qualidade em Saúde, Seção Técnica de Microscopia Alimentar. São Paulo, SP
  - **Vanessa Aparecida Marcolino** Instituto Federal do Paraná. Paranavaí, PR
  - **Vera Lúcia Arroxelas Galvão de Lima** Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Ciências Domésticas. Recife, PE
  - **Victor Eduardo Arrúa Arias** Centro de Referência da Saúde da Mulher Hospital Pérola Byington, Núcleo de Patologia. São Paulo, SP
  - **Vivianne Montarroyos Padilha** Universidade Federal de Pernambuco. Recife, PE
  - **Wagner Wollinger** Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, Divisão de Metrologia Química. Duque de Caxias, RJ

#### **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 da 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 N° 12, N° 13 e N° 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: 01246-000**

**Ou por meio eletrônico em [rial@saude.sp.gov.br](mailto:rial@saude.sp.gov.br)**

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

### 1. Categoria De Artigos

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

#### Informações Complementares:

- Devem ter até 20 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 05 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.
- As referências bibliográficas, limitadas a 40, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.
- Os resumos em português e em inglês (abstract) devem ter até 200 palavras, com a indicação de 3 a 6 palavras-chave (keywords).

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

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

#### Informações complementares:

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

- As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 03 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.
- As referências bibliográficas, limitadas a 50, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.
- Os resumos em português e em inglês (abstract) devem ter até 200 palavras, com a indicação de 3 a 6 palavras-chave (keywords).

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

**Informações complementares:**

- Devem ter até 10 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 02 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.
- As referências bibliográficas, limitadas a 15, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.
- Os resumos em português e em inglês (abstract) devem ter até 200 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (keywords).
- Sua apresentação deve acompanhar as mesmas normas exigidas para artigos originais.

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

**Informações complementares:**

- Devem ter até 06 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 02 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.
- As referências bibliográficas, limitadas a 10, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.
- Os resumos em português e em inglês (abstract) devem ter até 200 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (keywords).
- Sua apresentação deve acompanhar as mesmas normas exigidas para artigos originais, porém na forma de texto único.

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

**Informações complementares:**

- Devem ter até 03 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 02 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.
- As referências bibliográficas, limitadas a 10, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.
- Os resumos em português e em inglês (abstract) devem ter até 200 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (keywords).
- Devem apresentar Introdução, Relato de caso, Discussão e Conclusão, na forma de texto único.

**1.6 Resumos de Teses e Dissertações:** São aceitos resumos de teses e dissertações até um ano após a defesa.

**Informações complementares:**

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

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

**2.1 Página de Identificação:** Deve constar:

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

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

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

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

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

## 2.2 Preparo do manuscrito:

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

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

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

### Estrutura do texto:

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

**B) Material e Métodos:** Os procedimentos adotados devem ser descritos claramente, bem como as variáveis analisadas, com a respectiva definição, quando necessária, e a hipótese a ser testada. Devem ser descritas a população e a amostra, instrumentos de medida, com a apresentação, se possível, de medidas de validade e conter informações sobre a coleta e processamento de dados. Deve ser incluída a devida referência para os métodos e técnicas empregados, inclusive os métodos estatísticos; métodos novos ou substancialmente modificados devem ser descritos, justificando as razões para seu uso e mencionando suas limitações. Os critérios éticos da pesquisa devem ser respeitados; os autores devem explicitar que a pesquisa foi conduzida dentro de padrões éticos e foi aprovada por comitê de ética, indicando o nome do comitê de ética, número e data do registro.

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

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

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

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

**Exemplos:** Nos Estados Unidos e Canadá, a obrigatoriedade da declaração dos nutrientes no rótulo do alimento é mais antiga e foram desenvolvidos métodos hidrolíticos, como o AOAC 996.06<sup>1</sup>, de extração e determinação da GT por cálculo a partir dos AG obtidos por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC/DIC)<sup>2,3</sup>. Segundo Chang et al<sup>31</sup>, o aumento do tamanho das partículas resulta numa redução da área de superfície conferindo uma melhora na retenção e estabilidade das mesmas.

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

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

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

#### Exemplos:

##### Artigos de periódicos:

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

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

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

##### Livros:

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

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

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

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

##### Capítulos de livro:

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

### Dissertações, teses e monografias:

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

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

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

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

### Dados eletrônicos:

Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo – SABESP. O que fazemos/Qualidade da água. [acesso 2008 Set 17]. Disponível em: [<http://www.sabesp.com.br/CalandraWeb/CalandraRedirect/?temp=4&proj=sabesp&pub=T&db=&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] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1, nº 7-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](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 <a href="#">Agradecimentos</a>	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 mais 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.





Instituto Adolfo Lutz



SECRETARIA  
DA SAÚDE



ISSN 0073-9855

