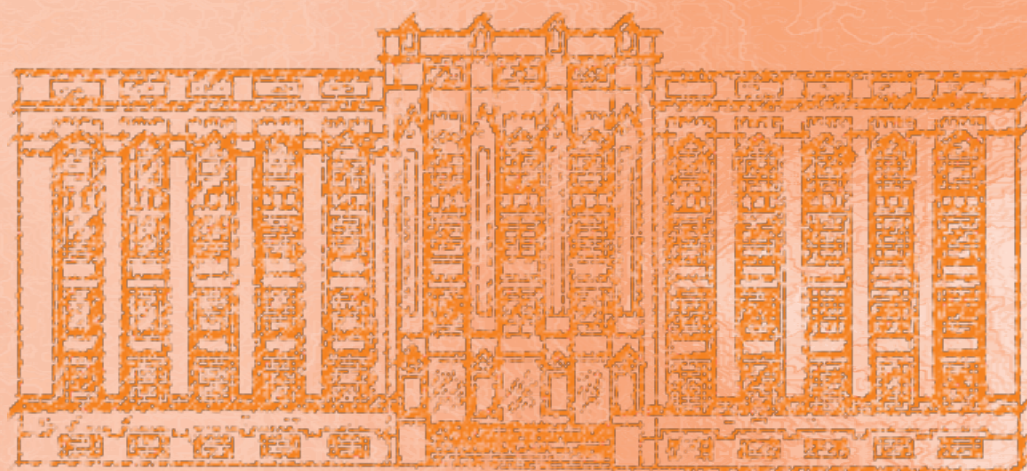


ISSN: 1983-3814 (*on-line*)  
RIALA6

# REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ



**Volume 75 número único, 2016**







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

# REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Volume 75, 2016

---



## Diretor Geral do Instituto Adolfo Lutz

Hélio Hehl Caiaffa Filho

### Editores Assistentes

Adriana Aparecida Buzzo Almodovar  
Aurea Silveira da Cruz Garçon  
Elaine Marra de Azevedo Mazon  
Iracema de Albuquerque Kimura  
Lílian Nunes Schiavon  
Márcia Liane Buzzo  
Maria de Fátima Costa Pires  
Marilena Oshiro  
Mirthes Ueda  
Paula Ordonhez Rigato  
Rosemeire Cobo Zanella Ramos  
Ruth Estela Gravato Rowlands  
Sérgio Dovidauskas  
Simone Alves da Silva

### 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.  
Lígia Bicudo de Almeida Muradian, São Paulo, Brasil.

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

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

1941  
2016, 75

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)



■ ARTIGO DE REVISÃO/ REVIEW ARTICLE

- 1684 Lipocalina associada à gelatinase neutrofílica (NGAL) como um biomarcador de lesão renal: uma revisão**  
Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker of kidney damage: a review  
Matheus Wagner LAGO, Rafael Noal MORESCO, Guilherme Vargas BOCHI
- 1710 Diagnóstico do câncer anal na coinfeção pelo papiloma vírus humano (HPV) e pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV)**  
Anal cancer diagnosis in patients with human papillomavirus (HPV) and human immunodeficiency virus (HIV) coinfection  
Bruna Fischer DUARTE, Michelli Aparecida Bertolazzo da SILVA, Sandro GERMANO, Maria Suely Soares LEONART

■ ARTIGO ORIGINAL/ORIGINAL ARTICLE

- 1685 Avaliação do conhecimento da população sobre leishmaniose visceral**  
Assessment of the population knowledge on the visceral leishmaniasis  
Laís ANVERSA, Roberto José Daré MONTANHOLI, Débora Libonato SABINO
- 1686 Avaliação do exame imuno-histoquímico para o diagnóstico de *Leishmania* spp. em amostras de tecidos caninos**  
Evaluation of immunohistochemical technique for the diagnosis of *Leishmania* spp. in canine tissues samples  
Juliana Mariotti GUERRA, Natália Coelho Couto de Azevedo FERNANDES, Lidia Midori KIMURA, Neuza Kasumi SHIRATA, Jéssica Abatzoglou MAGNO, Marília Ferreira ABRANTES, Karolina Rosa FERNANDES, Maiara Maria Romaneli SILVA, José Eduardo de Raefray BARBOSA, Helena Hilomi TANIGUCHI, Roberto Mitsuyoshi HIRAMOTO, Suely NONOGAKI, José Eduardo TOLEZANO
- 1687 Tuberculose pulmonar paucibacilar em Centros de Detenção Provisória**  
Paucibacillary pulmonary tuberculosis in Provisional Detention Centers  
Maria Cecilia CERGOLE-NOVELLA, Andréia Moreira dos Santos CARMO, Alexandra Alves dos Anjos REDONDARO, Valéria dos Santos CANDIDO, Mara Cristina de Souza BUZON, Ana Paula da Cunha GONÇALVES, Érica CHIMARA, Regina Ruivo Ferro e SILVA
- 1688 Implantação de um método para determinação da atividade da transcetolase eritrocitária para avaliação indireta da tiamina**  
Implementation of a method for determining the erythrocyte transketolase activity for indirect evaluation of thiamin  
Marilena OSHIRO, Karen MIGUITA

- 
- 1689 Validação e aplicação de métodos cromatográficos para determinação de vitaminas em suplementos**  
Validation and application of chromatographic methods for determination of vitamins in supplements  
Lucile Tiemi ABE-MATSUMOTO, Geni Rodrigues SAMPAIO, Deborah Helena Markowicz BASTOS
- 1690 Pesquisa, identificação e perfil de suscetibilidade antimicrobiana de *Cronobacter* spp. em produtos destinados à alimentação infantil**  
Detection, identification and antimicrobial susceptibility profile of *Cronobacter* spp. in products for infant feeding  
Gisele Olivieri Soares MEIER, Marcelo Luiz Lima BRANDÃO, Valéria de Mello MEDEIROS, Carla de Oliveira ROSAS, Débora Alves Ferreira da SILVA, Carla Trece CARVALHO, Cátia Cardoso da SILVA, Natália Scudeller UMEDA, Silvia Maria dos Reis LOPES
- 1691 Microbiological quality of Brazilian artisanal cheese and fermented sausages**  
Qualidade microbiológica de queijos e salames artesanais brasileiros  
Elisa Hizuru Uemura YAMANAKA, Laura Lucia COGO, Patrícia do Rocio DALZOTO, Ida Chapaval PIMENTEL
- 1692 Elaboração de biscoito *cream cracker* adicionado de farinha de linhaça e com teor reduzido de sódio: avaliação físico-química e sensorial**  
Physical-chemical and sensorial evaluation of the linseed flour added-cream cracker biscuit and with reduced sodium contents  
Ana Raíssa ORLOSKI, José Ranieri Mazile Vidal BEZERRA, Mirelly Marques ROMEIRO, Camila Jordão CANDIDO, Elisvânia Freitas dos SANTOS, Daiana NOVELLO
- 1693 Efeitos da modificação por ácidos orgânicos e do processo de secagem sobre as propriedades de expansão do amido de mandioca**  
Effects of modification by organic acids and the drying process on the expansion properties of cassava starch  
Vanessa Maria GERVIN, Ana Carolina Moura de Sena AQUINO, Edna Regina AMANTE
- 1694 Chemical monitoring of canola, corn, olive, soybean and sunflower oils after thermal treatment at conventional temperatures in domestic stoves**  
Monitoramento químico dos óleos de canola, milho, oliva, soja e girassol após tratamento térmico em temperaturas alcançadas por fogões domésticos  
Brenda Lee Simas PORTO, Thiago de Oliveira MENDES, Douglas Faza FRANCO, William da Silva MARTINI, Maria José Valenzuela BELL, Marcone Augusto Leal de OLIVEIRA
- 1702 Prevalência e perfil de sensibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de hemoculturas realizadas em hospitais particulares**  
Prevalence and profile of antimicrobial sensitivity of bacteria isolated from blood culture performed at private hospitals  
Teline Scheffer DALLACORTE, Denise Michelle INDRAS, Jorge Juarez Vieira TEIXEIRA, Leyde Daiane de PEDER, Claudinei Mesquita da SILVA
- 1703 Qualidade de suplementos proteicos: avaliação da composição e rotulagem**  
Quality of protein supplements: evaluation of composition and labeling  
Lizandra Vasconcellos SILVA, Scheilla Vitorino Carvalho de SOUZA
- 1704 Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in bovine milk samples consumed in different regions of Brazil**  
Ocorrência de aflatoxina M<sub>1</sub> em amostras de leite bovino consumido em diferentes regiões do Brasil  
Luzia SHUNDO, Adriana Palma de ALMEIDA, Janete ALABURDA, Leda Conceição Antonia LAMARDO, Sandra Aparecida NAVAS, Valter RUVIERI, Myrna SABINO
- 1705 Avaliação da estabilidade da capacidade antioxidante e de parâmetros físico-químicos de néctares de frutas caseiros**  
Assessment of the antioxidant capacity and of the physicalchemicals parameters stability in homemade fruit nectars  
Bárbara Pereira da SILVA, Karla Pereira BALBINO, Leandro de Moraes CARDOSO, Priscila Peixoto AQUINO, Helena Maria PINHEIRO-SANT'ANA, Sônia Machado Rocha RIBEIRO



- 
- 1706 Validation of PCR method for mycoplasma detection in the Yellow Fever-vaccine quality control**  
Validação de método de PCR para detecção de micoplasmas no controle de qualidade da vacina de Febre Amarela  
Rafael LAWSON-FERREIRA, João Pedro Sousa SANTOS, Danilo PARMERA, Rosane Cuber GUIMARÃES, Joyce Brito de Carvalho COELHO, Simone Cascardo FROTA, Josiane Machado Vieira MATTOSO, Carina Cantelli Pacheco de OLIVEIRA, Darcy Akemi HOKAMA, Ivano de FILIPPIS, Elmiro Rosendo do NASCIMENTO, Elena Cristina CARIDE
- 1711 Conhecimentos de escolares e funcionários da Rede Pública de Ensino sobre as parasitoses intestinais**  
Knowledge of students and employees of Public School System on the intestinal parasites  
Mayara Perlingeiro de SIQUEIRA, Eduarda Peixoto AZEVEDO, Élda Mateus de ALMEIDA, Juliana da Silva MATOS, Andreza Ramos RODRIGUES, Stephanie Colino SCARABELLI, Thiago Pimentel PILOTTO, Juliana Torres de FREITAS, Alynne da Silva BARBOSA, Danuza Pinheiro Bastos Garcia de MATTOS, Otilio Machado Pereira BASTOS, Claudia Maria Antunes UCHÔA
- **COMUNICAÇÃO BREVE/ BRIEF COMMUNICATION**
- 1695 Avaliação do desempenho da PCR em tempo real para o diagnóstico de meningite por *Enterovirus***  
Evaluation of a real-time PCR assay performance for the diagnosis of enteroviral meningitis  
Bráulio Caetano MACHADO, Heloísa Rosa VIEIRA, Mayara Rhaissa de Moraes ALVES, Rita de Cássia Compagnoli CARMONA
- 1696 Avaliação de anticorpos monoclonais como marcadores diferenciais de meningites bacterianas e virais por meio de técnica imuno-histoquímica**  
Investigation on the monoclonal antibodies as differential markers for viral and bacterial meningitis by means of immunohistochemistry technique  
Thaís Regina Brienza LATARO, Cristina Takami KANAMURA, Cinthya dos Santos CIRQUEIRA, Silvia D'Andretta IGLEZIAS, Elizabeth De GASPARI
- 1697 Identificação de *Cronobacter* spp. em queijos e perfil de suscetibilidade antimicrobiana**  
Identification of *Cronobacter* spp. in cheeses and the antimicrobial susceptibility profile  
Marcelo Luiz Lima BRANDÃO, Gisele Olivieri Soares MEIER, Carla Trece CARVALHO, Débora Alves Ferreira da SILVA, Natália Scudeller UMEDA, Valéria de Mello MEDEIROS, Carla de Oliveira ROSAS, Silvia Maria dos Reis LOPES
- 1698 Occurrence of fungi and aflatoxins B in nuts and products marketed the Brazilian northeastern regions**  
Ocorrência de fungos e aflatoxinas do tipo B em castanhas e produtos comercializados no Nordeste brasileiro  
Mariana de Freitas MOREIRA, Tatiane Rodrigues de OLIVEIRA, Ícaro Gusmão Pinto VIEIRA, Francisco das Chagas Oliveira FREIRE, Sabrina César da SILVA, Luzara de Matos RIBEIRO, Maria Izabel Florindo GUEDES
- 1699 Diagnóstico e adequação das Boas Práticas em área de alimentos e bebidas de hotéis: aspectos relacionados à higiene pessoal e ambiental**  
Diagnostic and adequacy of the Best Practices in the area of hotel foods and beverages: factors related to the personal and environmental hygiene  
Bruna Noga dos SANTOS, Ana Lúcia SERAFIM, Laissa Benites MEDEIROS, Caroline dos Santos PEIXOTO, Náina LOPES, Lize STANGARLIN-FIORI
- 1700 Qualidade higiênico-sanitária de saladas de frutas vendidas em quiosques de praias em Florianópolis - SC durante a temporada de verão de 2015**  
Hygienic and sanitary qualities of fruit salads sold at beach kiosks in Florianópolis - SC during the 2015 summer season  
Maria Luiza Silva FARIAS, Daiane BOBERMIN, Deise Helena Baggio RIBEIRO
- 1701 Determinação do teor de proteínas e carboidratos totais em suplementos tipo *Whey Protein***  
Determination of proteins and total carbohydrates in *Whey Protein* supplements  
Renata Cristina SCARLATO, Nara Godinho Motta MIRANDA, Rafaelle Silva da COSTA, Karla Mayara Arguelles SIMÕES, Ingrid Kelle da Silva VIDAL, Eliane Cristina Pires do REGO

---

**1708 Caracterização físico-química de pães do tipo francês, bolacha e de cachorro quente**

Physicochemical characterization of French-type, biscuit and hot-dog breads

Niana Ozorio MARTINI, Thomas Duzac ESCOBAR, Tiago André KAMINSKI

**1709 Avaliação higiênico-sanitária de estabelecimentos comerciais e análise de micro-organismos indicadores em amostras de carne bovina (coxão mole) in natura comercializadas em mercados públicos**

Sanitary inspection of commercial establishments and analysis of the microorganism indicators in the bovine pad topside meat samples sold in public markets

Josyane Brasil da SILVA, Alan Reis dos PRAZERES, Andrey Carlos do Sacramento de OLIVEIRA, Vanderson Vasconcelos DANTAS, Marçal Cavalcanti de Souza BARROS, Flávio da SILVA, Isis ABEL, Talita Bandeira ROOS, Carina Martins de MORAES

■ **NOTA CIENTÍFICA/ SCIENTIFIC NOTE**

**1712 Mumps virus genotypes identified during disease outbreaks in the state of São Paulo, Brazil: 2011 – 2016**

Genótipos dos vírus da caxumba identificados durante surtos da doença no estado de São Paulo, Brasil: 2011 - 2016

Daniela Bernardes Borges da SILVA, Cecília Luiza Simões SANTOS, Katia Corrêa de Oliveira SANTOS, Márcia THEOBALDO, Renato de Sousa PAULINO, Norio Augusto Sasaki, Margarete Aparecida BENEÇA, Terezinha Maria de PAIVA

■ **RESUMOS DE TESES E DISSERTAÇÕES**

**1707 Óleos vegetais extraídos a frio comercializados na cidade de São Paulo: avaliação das características de identidade e qualidade e da ocorrência de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos**

Cold-pressed vegetable oils sold in São Paulo city: characteristics of identity and quality evaluation and polycyclic aromatic hydrocarbons occurrence

Silva SA.

**1713 Resíduos de pesticidas e compostos perfluorados em águas: avaliação da exposição da população através do consumo**

Residues of pesticides and perfluorinated compounds in waters: population exposure assessment through consumption

Schwanz TG.

**1714 Resíduos de fungicidas em vinhos de diferentes propriedades vitivinícolas do Rio Grande do Sul, Brasil, frente ao uso da tecnologia *thermal pest control* a campo**

Fungicide pesticides residues in wines of wine properties of Rio Grande do Sul, Brazil, regarding the use of thermal pest control technology in the fields

Mozzaquatro JO.

**1715 Agrotóxicos em doces de frutas em pasta: determinação de resíduos por  $\mu$ LC-QTRAP-MS/MS e estudo de estabilidade**

Pesticides in fruit jams: residues determination by  $\mu$ LC-QTRAP-MS/MS and stability study

Reichert B.

■ **COLABORADORES**

■ **INSTRUÇÕES AOS AUTORES**



# Lipocalina associada à gelatinase neutrofílica (NGAL) como um biomarcador de lesão renal: uma revisão

## Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker of kidney damage: a review

RIALA6/1684

Matheus Wagner LAGO, Rafael Noal MORESCO, Guilherme Vargas BOCHI\*

\*Endereço para correspondência: Laboratório de Pesquisa em Bioquímica Clínica, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria. Avenida Roraima 1000, Prédio 26, 1401, Camobi, Santa Maria, RS, Brasil. CEP: 97105-900. Tel: 55 3220 8941. Fax: 55 3220 8018. E-mail: bochiguilherme@gmail.com

Recebido: 28.10.2015 - Aceito para publicação: 28.01.2016

### RESUMO

Lipocalina associada à gelatinase neutrofílica (NGAL) é uma molécula proteica predominantemente expressa na parte distal do néfron após a ocorrência de lesão renal. Diferentemente da creatinina sérica e da taxa de filtração glomerular, que são marcadores de função renal, os níveis aumentados de NGAL, tanto no soro quanto na urina, estão intimamente ligados a lesões estruturais do néfron. Os estudos clínicos indicam que poucas horas após a ocorrência da lesão renal aguda os níveis séricos e urinários de NGAL já se apresentam significativamente elevados, enquanto os níveis séricos de creatinina e a sua depuração renal apenas sofrem alterações significativas entre 24-48h após a lesão. Assim, a utilização de marcadores de função renal, usualmente avaliados na prática clínica, pode apresentar algumas limitações além de dificultar a aplicação de medidas precoces que visam a proteção renal. Esta revisão da literatura tem por objetivo analisar os aspectos biológicos e as aplicações da mensuração de NGAL em algumas condições clínicas, incluindo injúria renal, nefropatias e isquemia renal.

**Palavras-chave.** NGAL, doença renal, prognóstico, biomarcador.

### ABSTRACT

Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is a protein molecule predominantly expressed in the distal nephron after the occurrence of renal injury. Unlike the serum creatinine and the glomerular filtration rate, which are the renal function markers, the increased levels of NGAL, both in serum and urine, are closely linked to the structural injury to the nephron. Clinical studies indicate that a few hours after the occurrence of acute renal injury, the serum and urinary levels of NGAL are already significantly elevated, while the serum creatinine levels and renal clearance only undergo significant changes between 24-48h after injury. Thus, the use of renal function markers, usually assessed in the clinical practice, they may have some limitations also hindering the implementation of early measures aimed at protecting the kidneys. This literature review aims at examining the biological aspects and the applications of NGAL measurement in some clinical conditions, including kidney failure, kidney diseases and renal ischemia.

**Keywords.** NGAL, kidney disease, prognosis, biomarker.

## INTRODUÇÃO

A lipocalina associada à gelatinase neutrofílica (NGAL), também conhecida como lipocalina-2, siderocalina, 24p3, ou LCN2, é uma pequena molécula proteica com peso molecular aproximado de 25 kDa e foi primeiramente descrita em grânulos de neutrófilos humanos<sup>1</sup>. Além de ser componente dos grânulos de neutrófilos<sup>2</sup>, o NGAL também é expresso em células epiteliais renais em resposta ao processo inflamatório e em células tumorais durante o desenvolvimento de neoplasias<sup>3</sup>, bem como em outros tecidos, como pulmão, traqueia, estômago e colón<sup>4</sup>. Esta proteína tem como principal ligante os grupos sideróforos, que são pequenas moléculas não peptídicas carreadoras de ferro produzidas por bactérias, plantas e provavelmente em mamíferos, envolvidas no crescimento e na sobrevivência celular, sendo responsáveis pelo suprimento de ferro<sup>5</sup>.

Estudos *in vitro* indicam que o NGAL pode desempenhar uma importante função sobre o desenvolvimento renal<sup>6</sup>. Segundo Rubinstein et al<sup>7</sup>, o NGAL apresenta dois papéis principais: ligar-se a grupos sideróforos presentes na circulação sanguínea, e formar o complexo Holo-NGAL que é transportado para o meio intracelular a fim de nutrir as células, e atuar nos mecanismos de crescimento e diferenciação celular. O NGAL também atua como indutor de apoptose, pois quando está no meio intracelular sob a forma de Apo-NGAL, livre de qualquer ligante, é capaz de transportar o ferro para o meio extracelular, que provoca deficiência de ferro no meio intracelular, e sinaliza a célula a iniciar o processo apoptótico. Além disso, faz parte do sistema imune inato em resposta contra agentes infecciosos, a partir da depleção das reservas de ferro do agente infeccioso<sup>7</sup>.

O NGAL, além de ser uma proteína envolvida nos processos fisiológicos celulares, atua como um biomarcador em várias condições patológicas, e seus níveis estão elevados em certos tipos de neoplasias, inflamação grave,

aterosclerose e doença de Kawasaki<sup>7</sup>. Além disso, a mensuração dos níveis de NGAL, tanto no soro quanto na urina, é considerada como excelente ferramenta na identificação precoce de lesão renal<sup>5,8,9</sup>. Foi demonstrado que em situações fisiológicas normais há pequena secreção de NGAL<sup>10</sup>. Porém, poucas horas após um estímulo danoso à estrutura renal, como os processos de isquemia e inflamação, há aumento da produção deste biomarcador. Tem sido sugerido que este aumento pode ocorrer devido ao seu envolvimento nos processos de bacteriostase e proliferação de túbulos renais, que constituem possíveis vias para a proteção mediada pelo NGAL ao tecido renal<sup>11</sup>.

Atualmente, a investigação de lesão renal é baseada nos níveis de creatinina sérica e taxa de filtração glomerular, que são marcadores usualmente empregados para avaliar a função renal<sup>11</sup>, bem como nos níveis de albumina urinária<sup>12</sup>. No entanto, um vasto número de condições renais agudas pode existir sem induzir aumento significativo nos níveis de creatinina sérica. Já foi evidenciado que é necessário que ocorra prejuízo de 50 % na função renal para que possa ser identificado o aumento da creatinina sérica<sup>13</sup>. De maneira semelhante, há estudos que indicam que a albuminúria, mesmo sendo considerada como padrão ouro na avaliação de lesão renal, apresenta-se inalterada mesmo após o acometimento à estrutura glomerular<sup>14</sup>.

Em contrapartida, já foi demonstrado que o NGAL é considerado como marcador sensível e específico para detectar a lesão renal em vários distúrbios renais, como injúria renal agudo (IRA), nefropatia diabética (ND), nefropatia mediada por IgA (NIgA) e nefrite lúpica (NL). Neste contexto, a avaliação dos níveis de NGAL mostra-se como bom indicador de lesão renal em estágios iniciais antes que haja o comprometimento total do rim, e pode ser empregado como marcador precoce. Embora exista uma série de estudos científicos publicados em periódicos internacionais que avaliam os níveis de NGAL em doenças

renais, não há conhecimento de trabalho de revisão em periódico nacional referente ao envolvimento deste biomarcador em doenças renais agudas e crônicas; tampouco, há evidências científicas da acurácia do teste diagnóstico do NGAL. Baseado nestes aspectos, o objetivo principal deste estudo é realizar a revisão sistemática atual da literatura sobre o papel do NGAL como biomarcador diagnóstico e prognóstico de lesão renal, bem como sua associação com outras doenças renais.

## METODOLOGIA

Para efetuar a revisão da literatura foram consultadas as bases *PubMed* e *ScienceDirect*, e a pesquisa foi realizada com a utilização dos seguintes MeSH termos e suas associações: “Neutrophil gelatinase associated lipocalin”, “NGAL”, “Kidney injury”, “Acute kidney injury”, “IgA”, “Lupus”, “Diabetic nephropathy” e “Renal scemia”. Após definir os limites (artigos publicados nos últimos 10 anos), foram obtidos 1.926 artigos quando o MeSH termo “Neutrophil gelatinase associated lipocalin” foi consultado na base *ScienceDirect* e 1.659 artigos quando consultado na base *PubMed*.

Os critérios de relevância para a seleção dos trabalhos utilizados de base neste artigo de revisão foram fundamentados no ano de publicação dos estudos, na relevância científica, a frequência em que estes estudos têm sido citados na literatura internacional. Foram excluídos os trabalhos cuja qualidade de evidência tenha sido classificada como baixa ou muito baixa quando avaliados pelo sistema GRADE (*Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation*). Os estudos de maior relevância clínica sobre o NGAL foram classificados de acordo com o delineamento do estudo e qualidade de evidência baseados no sistema GRADE, que estão apresentados na **Tabela 1**. Os artigos publicados há mais de 10 anos que constam na presente revisão foram selecionados em função de sua importância científica sobre o tema.

**Tabela 1.** Relação dos trabalhos de acordo com o delineamento do estudo e classificação pelo sistema GRADE

Autor	Delineamento do estudo	Classificação GRADE
Mishra et al <sup>9</sup>	Coorte prospectivo	Alta
Bennett et al <sup>23</sup>	Coorte prospectivo	Alta
Kim et al <sup>25</sup>	Coorte prospectivo	Moderada
Dói et al <sup>27</sup>	Coorte prospectivo	Moderada
Moon et al <sup>28</sup>	Coorte prospectivo	Alta
Rostami et al <sup>29</sup>	Coorte prospectivo	Alta
Ding et al <sup>31</sup>	Coorte prospectivo	Moderada
Peters et al <sup>32</sup>	Coorte retrospectivo	Moderada
Yang et al <sup>34</sup>	Coorte prospectivo	Moderada
Brunner et al <sup>35</sup>	Coorte prospectivo	Moderada
Fanning et al <sup>38</sup>	Coorte prospectivo	Alta
Nielsen et al <sup>45</sup>	Cross-sectional	Alta
Carvalho et al <sup>47</sup>	Coorte prospectivo	Alta

GRADE = *Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation*

## Biologia do NGAL

A lipocalina associada à gelatinase de neutrófilo, também conhecida como NGAL, é uma pequena molécula de aproximadamente 25 kDa resistente a proteases que pertence à família das lipocalinas. As lipocalinas constituem um grupo diverso e amplo de proteínas que apresentam variabilidade tanto funcional quanto estrutural. Os membros desta família compreendem as proteínas tipicamente pequenas, secretadas em diferentes processos caracterizados pelo reconhecimento celular, tais como a habilidade de ligação com pequenas moléculas, principalmente hidrofóbicas, ligação com receptores específicos de superfície celular e formação de complexos macromoleculares. Entre alguns papéis fisiológicos desempenhados por proteínas desta superfamília, incluem o

transporte de retinol, transporte de sideróforos, síntese enzimática de prostaglandinas, regulação da resposta imune e homeostase celular<sup>15</sup>.

Goetz et al<sup>16</sup>, descreveram as principais características do NGAL e demonstraram que seus ligantes de maior importância são os sideróforos. Sideróforos são pequenas moléculas não peptídicas que contêm ferro e que são produzidas por uma grande quantidade de seres vivos, como bactérias, plantas e possivelmente mamíferos. Estas moléculas carreadoras de ferro estão envolvidas no crescimento e diferenciação celular por meio de transporte e suprimento de ferro. Quando complexado com algum sideróforo, o NGAL apresenta coloração vermelha característica e exerce suas principais funções biológicas<sup>5</sup>.

O NGAL se apresenta sob duas formas, o Holo-NGAL e o Apo-NGAL, que são respectivamente a proteína ligada a algum grupo sideróforo e a proteína livre de qualquer ligante<sup>5</sup>. As atividades do NGAL são mediadas pela sua interação com receptores de superfície específicos tais como o 24p3R, que é um transportador de cátions orgânicos, e o complexo megalina-scavenger, que é um ligante proteico não específico encontrado principalmente na borda em escova das células do túbulo renal<sup>4</sup>. Sugere-se que estes dois receptores desempenham um papel fundamental na endocitose e na movimentação do NGAL no meio intracelular. Além disso, o NGAL também pode interagir com outros receptores e ligantes, como o fator de crescimento hepático, gelatinase B e proteínas quinases extracelulares<sup>2</sup>.

A ação deste biomarcador pode ser descrita na seguinte forma: o NGAL presente no plasma interage com receptores específicos (24p3R ou megalina) e é internalizado na célula como um complexo com sideróforos (Holo-NGAL) ou sozinho (Apo-NGAL). Depois da internalização, o Holo-NGAL é capaz de liberar o ferro em que estava ligado no citoplasma, e levar ao acúmulo de ferro intracelular e regular os caminhos genéticos específicos dependentes de ferro. O NGAL pode então ser degradado no interior da célula ou reciclado e ser enviado para o meio extracelular como Apo-NGAL. A maioria dos

efeitos protetores atribuídos a esta proteína, provavelmente, é realizada por meio desse mecanismo. Inversamente, Apo-NGAL pode capturar os sideróforos intracelulares e transportá-los para o espaço extracelular, que priva a célula de suas reservas de ferro. Isso provavelmente representa a forma pela qual o NGAL exerce fortes propriedades antibacterianas e sob condições particulares podem promover a apoptose celular<sup>5</sup>.

O NGAL é expresso em pequenas concentrações em múltiplas células. Deste modo, em indivíduos saudáveis, os baixos níveis de NGAL são detectáveis na circulação sistêmica. Os níveis deste biomarcador no organismo dependem do gênero, idade, função hepática e da sua correlação com parâmetros inflamatórios. Tomonaga et al<sup>17</sup>, demonstraram que níveis urinários elevados deste biomarcador foram encontrados em 6,5 % de pacientes que não possuíam IRA, baseada nos critérios convencionais<sup>17</sup>. No rim, o NGAL é filtrado pelo glomérulo e então reabsorvido no túbulo proximal pela via dependente de megalina<sup>4,18</sup>. Imediatamente após a lesão renal aguda, o NGAL é produzido massivamente na parte distal do néfron, o que causa aumento nos níveis plasmáticos e urinários, e a excreção urinária pode ser potencializada pela diminuição da reabsorção desse biomarcador em virtude de lesão tubular proximal<sup>18</sup>. Dessa maneira, as células tubulares renais são consideradas uma importante fonte de NGAL em resposta ao processo inflamatório ou lesão tecidual<sup>19</sup>.

Estudos *in vitro* indicam que o NGAL pode desempenhar um importante papel no desenvolvimento renal. Neste contexto, após a incubação de NGAL purificado com células progenitoras epiteliais renais, foi observado que esta proteína induziu um efeito proliferativo sobre estas células, seguido de processo de diferenciação destas com a subsequente formação de estruturas semelhantes a néfrons, com a expressão de marcadores de superfície celular indicativos de células glomerulares e tubulares<sup>6</sup>. Entretanto, este mecanismo não parece ser essencial para induzir a diferenciação celular e o desenvolvimento renal *in vivo*, pois foi

demonstrado que a inativação genética da expressão de NGAL não levou ao bloqueio da maturação renal, provavelmente pela existência de vias alternativas envolvidas nestes processos de maturação<sup>20</sup>.

## ASPECTOS CLÍNICOS: NGAL E PATOLOGIAS

### Injúria renal aguda

A injúria renal aguda (IRA) é uma síndrome complexa que ocorre em uma ampla variedade de situações, com manifestações clínicas desde as mínimas elevações da creatinina até a falência renal anúrica<sup>8</sup>. Esta condição é diagnosticada principalmente quando há elevação dos níveis séricos de creatinina, o que indica a perda da função excretora renal<sup>8</sup>. Esta doença pode afetar de 20 % a 30 % dos pacientes hospitalizados, o que representa o alto custo financeiro e a direta correlação com o aumento de morbidade e mortalidade<sup>21</sup>.

Vários estudos clínicos têm sugerido que os níveis de NGAL na urina podem servir como marcador precoce de IRA. Mishra et al<sup>22</sup> observaram aumento da expressão de NGAL nos túbulos renais pouco tempo após a ocorrência de lesão tecidual, o que sugere que o aumento deste marcador ocorre de maneira precoce na IRA<sup>22</sup>. Além disso, outra característica deste biomarcador é a correlação com a gravidade e duração da lesão, sendo possível observar o aumento dos seus níveis tanto no soro quanto na urina<sup>22,23</sup>.

Em uma meta-análise que avaliou 19 estudos, envolvendo-se um total de 2.538 pacientes, foi demonstrado que os níveis aumentados de NGAL precederam o diagnóstico de IRA<sup>24</sup>. Além disso, Haase et al<sup>8</sup> também investigaram o papel diagnóstico e prognóstico de NGAL em amostras de urina e de plasma. Neste estudo, foi demonstrado que os níveis aumentados de NGAL e taxas normais de creatinina sérica identificaram 40 % a mais de pacientes com IRA, quando comparados com aqueles que apresentaram apenas os níveis séricos de creatinina elevados. Além disso, foi evidenciado que níveis aumentados de creatinina sérica e níveis normais de NGAL indicavam apenas o decréscimo da função renal, sem

apresentar lesão tubular. Foi também demonstrado que níveis elevados de NGAL na IRA, com ou sem aumento de níveis de creatinina, estavam associados com maior risco de morte e necessidade de terapia de substituição renal. Assim, o aumento da concentração de NGAL indica a ocorrência de lesão tubular que precede a diminuição da função renal, o que sugere que este é um biomarcador precoce no diagnóstico de IRA, e como uma importante ferramenta no prognóstico de desfechos negativos<sup>8</sup>.

Kim et al<sup>25</sup> conduziram um estudo em que analisaram indivíduos em estado crítico e com suspeita de sepse; e do total de 231 pacientes, 18 desenvolveram IRA e 98 tiveram sepse confirmada. A relação entre sepse e IRA ainda não é totalmente compreendida, mas considera-se que esta esteja associada com hipoperfusão, frequente trombose de microvasos, infiltração de células do sistema imune e apoptose, o que sugere o significativo papel da sepse na toxicidade imune renal<sup>26</sup>. Neste estudo foi observado que os pacientes que desenvolveram IRA apresentaram níveis mais elevados de NGAL. No entanto, não foi encontrada diferença estatística nos níveis de NGAL quando foram comparados os pacientes com sepse e que desenvolveram IRA e os pacientes com apenas sepse. Este resultado sugere que aumento na produção de NGAL extrarrenal pode ter ocorrido em resposta a sepse<sup>25</sup>.

Doi et al<sup>27</sup> analisaram pacientes adultos que seriam submetidos à cirurgia cardíaca; e do total de 146 pacientes, 68 receberam diagnóstico de doença renal crônica (DRC). E em até três dias após o procedimento operatório, a IRA foi diagnosticada em 53 pacientes. Os níveis plasmáticos de NGAL e de creatinina foram significativamente elevados em amostras coletadas de pacientes antes da cirurgia cardíaca, e que posteriormente desenvolveram IRA, quando comparados ao grupo de indivíduos que não desenvolveu a doença. Além disso, o aparecimento de IRA foi maior no grupo que previamente apresentava DRC. Os níveis desse biomarcador foram também mensurados em amostras de plasma coletado em 2, 4, 12, 24 e 36 horas após o procedimento cirúrgico; e os níveis de NGAL estavam significativamente elevados em todos

os pontos de tempo no grupo que desenvolveu IRA. Foi também evidenciado que o aumento de NGAL foi mais expressivo em pacientes que desenvolveram IRA moderada e grave, o que indica que os níveis plasmáticos desse biomarcador podem estar associada à gravidade da doença. A mensuração dos níveis plasmáticos de NGAL em portadores de DRC na fase pré-operatória pode identificar um grupo de alto risco para doença renal em estágio final e morte. Ademais, este pode ser indicador precoce de IRA quando comparado com os níveis plasmáticos de creatinina ou taxa de filtração glomerular<sup>27</sup>.

Moon et al<sup>28</sup> avaliaram o valor preditivo dos níveis urinários de NGAL para a recuperação após IRA, em comparação com outros marcadores como creatinina sérica e cistatina C urinária. Participaram do estudo 66 pacientes, dos quais 33 pertenciam ao grupo em que houve recuperação, que foi definida pela diminuição de 50 % dos níveis séricos de creatinina em relação ao nível de pico de cada paciente; e os demais 33 pertenciam ao grupo em que não houve recuperação da IRA. As causas mais comuns de IRA foram sepse ou infecção (50,0 %), isquemia (27,3 %) e nefrotoxinas (19,7 %). Foi observado que o NGAL urinário era o preditor de mau prognóstico para recuperação de IRA e que baixos níveis deste marcador estavam associados à maior probabilidade de recuperação. Porém, os níveis de creatinina sérica e cistatina C urinária apenas mostraram-se significativamente diferentes após o 4º dia, sugerindo-se que estas são marcadores menos precoces do que NGAL. Os autores concluíram que os níveis de NGAL urinário estão associados com a possibilidade de haver ou não recuperação após IRA, tornando-se possível efetuar a escolha do tratamento com o melhor potencial terapêutico para cada paciente<sup>28</sup>.

A fim de avaliar o potencial prognóstico de NGAL, Rostami et al<sup>29</sup> analisaram 64 pacientes submetidos ao transplante renal, dos quais 31 desenvolveram IRA após o transplante. Houve aumento dos níveis de NGAL urinário nas primeiras horas após o transplante renal nos pacientes que desenvolveram IRA, o que demonstra que esse biomarcador é um bom preditor de IRA após a cirurgia de substituição

renal<sup>29</sup>. Os principais achados dos estudos referentes à IRA, bem como a avaliação dos níveis de NGAL nas condições patológicas subsequentes estão descritos na **Tabela 2**.

### **Nefropatia mediada por IgA**

A nefropatia mediada por IgA (NIgA) é a forma mais comum de glomerulonefrite<sup>30</sup>, causada pelo acúmulo de IgA nos rins, que por sua vez leva à lesão glomerular. Ding et al<sup>31</sup> quantificaram os níveis urinários de NGAL em pacientes portadores de NIgA, que apresentavam elevada proteinúria, e demonstraram o aumento significativo nos níveis de NGAL em pacientes portadores desta doença. Após 6 meses de tratamento com varfarina sódica, benazepril e tripterygium, em 21 pacientes que responderam bem ao tratamento houve diminuição na proteinúria e nos níveis de NGAL, o que evidencia que esse biomarcador além de ser usado para identificar a lesão renal decorrente de NIgA, também pode ser utilizado para monitorar o tratamento do paciente. Os níveis de NGAL também estão associados com o grau de lesão histológica renal<sup>31</sup>.

Recentemente, Peters et al<sup>32</sup> quantificaram o NGAL urinário em 65 pacientes portadores de NIgA e 65 voluntários saudáveis como grupo controle. Os níveis de NGAL estavam aumentados no grupo de pacientes quando comparado com o grupo controle. Os níveis desse biomarcador foram também associados com o desenvolvimento de doença renal em estágio final<sup>32</sup>.

### **Nefrite lúpica**

A nefrite lúpica (NL) é decorrente de lúpus eritematosos sistêmicos (LES), que é uma doença autoimune inflamatória que atinge diversos órgãos. Nos rins, a lesão ocorre pelo depósito de imunoglobulinas e complementos, que se não for tratado evoluirá para falência renal. Rubinstein et al<sup>7</sup> sugeriram que este biomarcador poderia ser uma boa ferramenta para efetuar a detecção de NL, uma vez que seus níveis apresentavam-se significativamente aumentados em pacientes portadores de LES<sup>7</sup>. Os níveis de NGAL aumentam em resposta à inflamação causada pela NL e diminuem ao longo do tratamento<sup>33</sup>.

Yang et al<sup>34</sup> demonstraram a ocorrência



**Tabela 2.** Alguns estudos que associam NGAL com doenças renais

Autor	População	Achados chave
Mishra et al <sup>9</sup>	71 crianças submetidas à cirurgia corretiva cardíaca com circulação extracorpórea	O NGAL apresentou elevado potencial diagnóstico precoce de IRA. Utilizando-se o <i>cut-off</i> de 50µg/L foram obtidas sensibilidade de 100 % e especificidade de 98 %
Bennett et al <sup>23</sup>	196 crianças submetidas à cirurgia corretiva cardíaca com circulação extracorpórea	Os níveis urinários de NGAL foram associados à duração e à gravidade do IRA. Por meio de análise da curva ROC, foram obtidas sensibilidade de 95 % e especificidade de 82 % considerando-se o <i>cut-off</i> de 100 ng/mL
Kim et al <sup>25</sup>	231 pacientes em estado crítico com suspeita de sepsé	O desenvolvimento de IRA foi associado aos níveis elevados de NGAL plasmático. O <i>cut-off</i> para tomada de decisão terapêutica para o NGAL foi de 150 ng/mL.
Dói et al <sup>27</sup>	146 pacientes adultos submetidos à cirurgia cardíaca	A dosagem de níveis plasmáticos de NGAL em portadores de DRC na fase pré-operatória identificou um grupo de alto risco para doença renal em estágio final e mortalidade. NGAL mostrou ser indicador precoce de ocorrência de IRA quando comparado com os níveis plasmáticos de creatinina ou taxa de filtração glomerular. Considerando-se o valor de <i>cut-off</i> de 220 ng/mL, a sensibilidade foi de 89 % e a especificidade de 75 % para identificar IRA
Moon et al <sup>28</sup>	66 pacientes com IRA	O NGAL urinário foi o marcador de mau prognóstico para recuperação de IRA; e baixos níveis deste marcador foram associados à maior probabilidade de recuperação em pacientes diagnosticados com IRA. O <i>cut-off</i> de NGAL urinário para recuperação de IRA foi de 348,2 ng/mL com sensibilidade de 84 % e especificidade de 68,7 %
Rostami et al <sup>29</sup>	64 pacientes submetidos à substituição renal	Níveis elevados de NGAL urinário identificaram precocemente o desenvolvimento de IRA após a cirurgia de transplante renal. Considerando-se o <i>cut-off</i> de 204 ng/mL, foram obtidas sensibilidade de 72 % e especificidade de 67 %
Ding et al <sup>31</sup>	70 pacientes com NIgA	O NGAL apresentou-se elevado em pacientes com NIgA quando comparados com indivíduos saudáveis. Após seis meses de tratamento da nefropatia foi observada a diminuição na proteinúria e nos níveis de NGAL. Considerando-se o <i>cut-off</i> de 20,5 µg/L, foram obtidas a sensibilidade de 90,2 % e especificidade de 67,9 % para identificar pacientes com NIgA
Peters et al <sup>32</sup>	65 pacientes com NIgA	O NGAL apresentou-se elevado em pacientes com NIgA quando comparados com indivíduos saudáveis. Os níveis deste biomarcador foram associados ao desenvolvimento de doença renal em estágio final
Yang et al <sup>34</sup>	42 pacientes com NL	Os níveis urinários de NGAL foram elevados em pacientes portadores de NL e em indivíduos portadores de LES que apresentavam proteinúria quando comparados com indivíduos saudáveis. Considerando-se o <i>cut-off</i> de 31 mg/dia, foram obtidas sensibilidade de 70,8 % e especificidade de 84,5 %
Brunner et al <sup>35</sup>	76 pacientes com NL	Apesar da capacidade de prever a ocorrência de lesão renal proveniente de NL e ser um método pouco invasivo, o NGAL não conseguiu discriminar as diferentes classes histológicas de NL
Fanning et al <sup>38</sup>	50 pacientes submetidos à cirurgia cardíaca	O NGAL urinário mostrou ser um bom preditor para IRA associada à cirurgia cardíaca. A avaliação dos níveis séricos e urinários absolutos de NGAL demonstrou bom valor preditivo para IRA associada à cirurgia cardíaca
Nielsen et al <sup>45</sup>	148 pacientes com diabetes mellitus tipo 1	Os níveis de NGAL foram elevados em pacientes diabéticos quando comparados com indivíduos saudáveis. O aumento de NGAL foi também detectado em pacientes diabéticos normoalbuminúricos, o que indica lesão tubular em estágio inicial
Carvalho et al <sup>47</sup>	117 pacientes com diabetes mellitus tipo 2	Os níveis de NGAL urinário apresentam associação positiva com a albuminúria. O aumento de NGAL foi também detectado em pacientes diabéticos normoalbuminúricos, o que indica ND em estágio inicial

NGAL = lipocalina associada à gelatinase neutrofilica; IRA = injúria renal aguda; ROC = *receiver operator characteristic*; DRC = doença renal crônica; NIgA = nefropatia mediada por IgA; NL = nefrite lúpica; LES = lúpus eritematoso sistêmico; ND = nefrite diabética

de aumento dos níveis urinários de NGAL em pacientes portadores de NL e em pacientes portadores de LES que apresentavam proteinúria. Os níveis desse marcador não estavam alterados em pessoas portadoras de outras doenças autoimunes avaliadas nesse estudo, como síndrome de Sjögren, síndrome antifosfolípide, vasculite, anemia hemolítica autoimune, artrite reumatoide com sobreposição de esclerose sistêmica, polimiosite, doença de Still com início na idade adulta, pênfigo e urticária aguda, e em indivíduos portadores de LES mas sem comprometimento renal<sup>34</sup>.

Brunner et al<sup>35</sup> associaram os níveis urinários de NGAL com os achados histológicos em 76 pacientes portadores de NL, identificados por meio de biópsia renal. Das 76 amostras de urina, 38 foram obtidas no dia anterior ou no dia da realização da biópsia, e as outras 38 foram coletadas, em média no intervalo de 3,5 dias, após a realização da biópsia. Os 38 pacientes que realizaram a biópsia antes da coleta de amostra de urina, estavam submetidos ao intenso tratamento para NL. Considerando-se apenas os 38 pacientes que realizaram a biópsia após a coleta da urina, houve uma correlação entre os níveis mais baixos de NGAL concomitante com a presença de crescimentos celulares. Este é importante achado histopatológico indicativo da proliferação da NL, o que indica a ocorrência de possível falha na proteção do rim frente às mudanças estruturais causadas pela NL<sup>35</sup>. Apesar da capacidade de prever o surgimento de lesão renal proveniente de NL e de ser um método pouco invasivo, o NGAL não consegue discriminar as diferentes classes histológicas de NL, e não há possibilidade de substituir a biópsia renal, que é atualmente o padrão ouro no diagnóstico de NL<sup>36</sup>.

### Isquemia renal

Acredita-se que o rim seja altamente suscetível à lesão causada por isquemia como resultado de vasoconstrição, lesão endotelial ou pela ativação de respostas inflamatórias imunes. Esta suscetibilidade ocorre, em parte, pela associação entre o suprimento sanguíneo na medula renal externa, em que as células tubulares são mais vulneráveis à isquemia e pela resposta

funcional do néfron, que podem levar à toxicidade celular<sup>37</sup>.

Fanning et al<sup>38</sup> buscaram identificar o ponto no tempo, dentro do período perioperatório, em que os níveis séricos e urinários de NGAL teriam o maior poder preditivo para o desenvolvimento de IRA. Estes pesquisadores investigaram também se a mudança dos níveis de NGAL a partir de um valor basal seria melhor marcador prognóstico de IRA do que o valor absoluto desse biomarcador. O NGAL urinário mostrou ser o melhor preditor para IRA associada à cirurgia cardíaca, principalmente quando mensurado no período de 4 e 24 horas após o início da circulação extracorpórea. A avaliação dos níveis absolutos de NGAL tanto urinário quanto sérico mostrou ser o melhor preditor de IRA associada à cirurgia cardíaca em relação à avaliação do nível basal desse biomarcador<sup>38</sup>.

Os níveis séricos de creatinina levam de um a três dias para evidenciar a IRA após a cirurgia cardíaca, ao passo que NGAL leva até três horas para demonstrar níveis urinários e séricos significativamente elevados<sup>39</sup>. Um recente estudo mostrou que mesmo quando os níveis de creatinina não estão clinicamente elevados, a dosagem do NGAL tem a capacidade de detectar IRA subclínica, que pode evoluir para situações mais graves<sup>8</sup>.

Em crianças de até três anos de idade e portadoras de doença cardíaca congênita, o NGAL mostrou ser um excelente biomarcador de IRA quando determinado no período de 4 a 6 horas após a cirurgia cardíaca<sup>9,23</sup>. No entanto, nos adultos os níveis de NGAL têm menor valor preditivo para IRA<sup>40</sup>. Mishra et al<sup>9</sup> obtiveram sensibilidade de 100 % e especificidade de 98 % na predição de IRA em duas horas após a cirurgia cardíaca pediátrica, ao avaliar os níveis de NGAL sérico e urinário<sup>9</sup>. Bennett et al<sup>23</sup> fizeram associação dos níveis urinários de NGAL em duas horas após a cirurgia cardíaca com a duração e gravidade do IRA, a necessidade de medidas de suporte, como hemodiálise, diálise peritoneal e transplante renal, tempo de estada no hospital e risco de morte<sup>23</sup>. Além disso, os níveis elevados de NGAL urinário estão associados à prolongada ventilação mecânica e permanência mais longa

em unidade de tratamento intensivo<sup>41</sup>.

### Nefropatia diabética

Nefropatia diabética é uma complicação grave que se desenvolve em 30-40 % dos pacientes diabéticos, e o monitoramento da albuminúria e intervenções que visam à proteção do rim são essenciais<sup>42</sup>. A albuminúria ocorre pela excreção de albumina na urina e é primariamente o resultado de lesão glomerular, mas também pela falta de reabsorção tubular da albumina<sup>43</sup>. Mesmo que a excreção de albumina ocorra nas regiões glomerular e tubular, as lesões que ocorrem nesses dois locais nem sempre estão associadas<sup>44</sup>, e um marcador mais específico para lesão tubular se faz necessário.

Nielsen et al<sup>45</sup> demonstraram que mesmo em pacientes portadores de diabetes tipo 1, que apresentavam valores de albuminúria dentro dos valores de referência, os níveis de NGAL urinário foram elevados quando comparados com os indivíduos saudáveis não diabéticos. Além disso, foi detectada a correlação entre os níveis mais elevados de albuminúria com os níveis mais altos de NGAL<sup>45</sup>. Resultados similares foram achados em estudo feito com pacientes portadores de diabetes tipo 2, em que os valores mais elevados de albuminúria estavam também associados com os níveis aumentados de NGAL<sup>46</sup>.

Em estudo mais recente, Carvalho et al<sup>47</sup> investigaram se os níveis urinários de NGAL estariam elevados em pacientes diagnosticados com diabetes mellitus tipo 2 e com níveis normais ou pouco elevados de albuminúria. Estes pacientes foram divididos em três grupos de acordo com o valor obtido da razão entre os níveis urinários de albumina e de creatinina (uACR). Em um dos grupos foram incluídos os pacientes com níveis normais de albuminúria (uACR < 10 mg/g de creatinina). Os pacientes com níveis pouco elevados de albuminúria (uACR 10-30 mg/g de creatinina) constituíram o segundo grupo e o terceiro grupo foi compreendido por pacientes com níveis moderadamente ou excessivamente elevados de albuminúria (uACR > 30 mg/g de creatinina). Os níveis de NGAL urinário aumentaram progressivamente entre os grupos, e estes dados mostraram a existência de correlação

positiva entre albuminúria e NGAL urinário<sup>47</sup>.

### ASPECTOS LABORATORIAIS DO NGAL

A dosagem dos níveis de NGAL pode ser realizada em amostras de plasma e soro, livres de hemólise e, também, em urina que é a amostra geralmente utilizada. A análise dos níveis deste biomarcador é realizada por meio de técnicas de imunoensaio como ensaio de imun absorção ligada à enzima (ELISA) e mais recentemente por meio de imun quimioluminescência<sup>48</sup>. Grenier et al<sup>48</sup> avaliaram diferentes aspectos pré-analíticos sobre os níveis de NGAL, como os interferentes analíticos e a estabilidade a curto e longo prazo das amostras. Neste estudo foi investigada a estabilidade de 95 amostras de urina, que foram mantidas refrigeradas a 4 °C para avaliar a estabilidade em curto prazo, e a -20 °C e -75 °C para avaliar a estabilidade de longo prazo. Houve uma queda menor do que 2 % nos níveis de NGAL nas amostras de urina estocadas a 4 °C durante o período de até 22 dias, e queda de 7,8 % e 12,0 % em média nas amostras estocadas a -75 °C e -20 °C, respectivamente, em um período de até 13 meses. Por conseguinte, é recomendado que as amostras a serem empregadas na mensuração dos níveis de NGAL não de imediato, sejam estocadas à temperatura de -75 °C para garantir a preservação dessa proteína<sup>48</sup>.

Em estudos mais recentes, Vrie et al<sup>49</sup> investigaram a estabilidade do NGAL em amostras de urina armazenadas em diferentes temperaturas (4 °C e -80 °C) e com a presença ou ausência de inibidor de protease. Os níveis de NGAL se mantiveram estáveis durante o período de 48h para as amostras armazenadas a 4 °C e por um período de seis meses para as amostras armazenadas a -80 °C, independentemente da adição de inibidor de protease<sup>49</sup>.

A adição de alguns interferentes pré-analíticos, como acetona (100 mg/dL), ácido ascórbico (1 g/dL), albumina (1 g/dL), bilirrubina (2 mg/dL), creatinina (1 g/dL), etanol (200 mg/dL), glicose (2 g/dL), hemoglobina (1 g/dL), NaCl (6 g/dL), ácido oxálico (100 mg/dL), riboflavina (7,5 mg/dL) e ureia (12 g/dL) nas amostras de urina de voluntários saudáveis não induziram alterações

significativas nos valores de NGAL<sup>48</sup>.

## CONCLUSÃO

A IRA e outras condições em que há o envolvimento de lesão renal, como DRC, nefropatia mediada por IgA, nefrite lúpica, isquemia renal e nefropatia diabética, que são doenças que atingem pacientes em estado crítico, faz com que ocorra o aumento considerável da necessidade de terapia de substituição renal e risco de morte. O diagnóstico e o prognóstico destas patologias estão baseados na avaliação de biomarcadores de função e de lesão renal. Os marcadores atualmente utilizados na detecção da perda de função renal, como a creatinina sérica e a taxa de filtração glomerular, muitas vezes apresentam aplicação limitada na prática clínica. Neste contexto, é necessária que ocorra uma perda considerável na função renal para induzir alteração detectável desses parâmetros. Além disso, a albuminúria que é o marcador padrão ouro na avaliação de lesão renal, pode também apresentar-se inalterada em situações nas quais já há lesão renal instalada.

Tendo em vista estas limitações, o NGAL tem sido amplamente estudado considerando-se o seu papel na ocorrência de lesão renal, com destaque para IRA, bem como pela viabilidade de se tornar um biomarcador sensível e preciso que pode ser utilizado na prática clínica para identificar a ocorrência desta doença em seu estágio inicial. Conforme representada na Tabela 2, a avaliação dos níveis séricos e urinários de NGAL mostra o bom potencial diagnóstico de IRA, e possui a capacidade de prever os desfechos clínicos e de ser utilizado no monitoramento da doença. Em virtude de precocidade de ser detectada em doenças renais, sua correlação com a progressão da doença e o fato da possibilidade de ser mensurado em amostras de urina, cuja coleta é feita por meio de procedimento não invasivo, fazem do NGAL um importante marcador de lesão renal. De fato, a avaliação de marcadores de dano tubular em doenças renais, incluindo-se o NGAL, tem ganhado destaque pelo fato destes apresentarem boa sensibilidade e especificidade em detectar a lesão. Particularmente, o NGAL apresenta-se como um marcador promissor de dano renal em uma série

de doenças renais, como IRA, DRC e nefropatias. No entanto, a albuminúria ainda é o padrão ouro no diagnóstico de lesão renal, e a avaliação da função renal é realizada por meio de avaliação da creatinina sérica e sua depuração renal. Portanto, a avaliação do NGAL, nas amostras de urina e de plasma, parece ser potencial ferramenta a ser implementada na prática clínica para complementar os parâmetros tradicionais de diagnóstico, prognóstico e de monitoramento das doenças renais. Além disso, novos estudos devem ser realizados para estabelecer o verdadeiro papel do NGAL, seja como parâmetro diagnóstico ou como um marcador de monitoramento. Neste sentido, ainda não há condições de afirmar de que o NGAL possa substituir os marcadores que atualmente são utilizados no diagnóstico das doenças renais, mas sim de sugerir que a mensuração dos seus níveis pode refletir em um diagnóstico precoce e exato em pacientes de grupos de risco para doenças renais, quando acompanhado da análise de marcadores bem estabelecidos na prática clínica.

## REFERÊNCIAS

1. Fernández CA, Yan L, Louis G, Yang J, Kutok JL, Moses MA. The matrix metalloproteinase-9/neutrophil gelatinase-associated lipocalin complex plays a role in breast tumor growth and is present in the urine of breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2005;11(15):5390-5. [DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-2391].
2. Kjeldsen L, Bainton DF, Sengelov H, Borregaard N. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel matrix protein of specific granules in human neutrophils. *Blood*. 1994;83(3):799-807.
3. Nielsen BS, Borregaard N, Bundgaard JR, Timshel S, Sehested M, Kjeldsen L. Induction of NGAL synthesis in epithelial cells of human colorectal neoplasia and inflammatory bowel diseases. *Gut*. 1996;38(3):414-20.
4. Hvidberg V, Jacobsen C, Strong RK, Cowland JB, Moestrup SK, Borregaard N. The endocytic receptor megalin binds the iron transporting neutrophil-gelatinase-associated lipocalin with high affinity and mediates its cellular uptake. *FEBS Lett*. 2005;579(3):773-7. [DOI: 10.1016/j.febslet.2004.12.031].

5. Bolignano D, Donato V, Coppolino G, Campo S, Buemi A, Lacquaniti A, et al. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) as a Marker of Kidney Damage. *Am J Kidney Dis*. 2008;52(3):595-605. [DOI: 10.1053/j.ajkd.2008.01.020].
6. Yang J, Goetz D, Li JY, Wang W, Mori K, Setlik D, et al. An iron delivery pathway mediated by a lipocalin. *Mol Cell*. 2002;10(5):1045-56. [DOI: 10.1016/S1097-2765(02)00710-4].
7. Rubinstein T, Pitashny M, Putterman C. The novel role of neutrophil gelatinase-B associated lipocalin (NGAL)/Lipocalin-2 as a biomarker for lupus nephritis. *Autoimmun Rev*. 2008;7(3):229-34. [DOI: 10.1016/j.autrev.2007.11.013].
8. Haase M, Devarajan P, Haase-Fielitz A, Bellomo R, Cruz DN, Wagener G, et al. The outcome of neutrophil gelatinase-associated lipocalin-positive subclinical acute kidney injury: A multicenter pooled analysis of prospective studies. *J Am Coll Cardiol*. 2011;57(17):1752-61. [DOI: 10.1016/j.jacc.2010.11.051].
9. Mishra J, Dent C, Tarabishi R, Mitsnefes MM, Ma Q, Kelly C, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet*. 2005;365(9466):1231-8. [DOI: 10.1016/S0140-6736(05)74811-x].
10. Fjaertoft G, Foucard T, Xu S, Venge P. Human neutrophil lipocalin (HNL) as a diagnostic tool in children with acute infections: A study of the kinetics. *Acta Paediatr*. 2005;94(6):661-6. [DOI:10.1080/08035250510031610].
11. Singer E, Markó L, Paragas N, Barasch J, Dragun D, Müller DN, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: pathophysiology and clinical applications. *Acta Physiol (Oxf)*. 2013;207(4):663-72. [DOI: 10.1111/apha.12054].
12. Glasscock RJ. Prevention of microalbuminuria in type 2 diabetes: millimeters or milligrams. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(12):3276-8. [DOI: 10.1681/ASN.2006101131].
13. Devarajan, P. Review: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a troponin-like biomarker for human acute kidney injury. *Nephrology (Carlton)*. 2010;15(4):419-28. [DOI: 10.1111/j.1440-1797.2010.01317.x].
14. Matheson A, Willcox MD, Flanagan J, Walsh BJ. Urinary biomarkers involved in type 2 diabetes: a review. *Diabetes Metab Res Rev*. 2010;26(3):150-71. [DOI: 10.1002/dmrr.1068].
15. Flower DR. The lipocalin protein family: Structure and function. *Biochem J*. 1996;318(1):1-14. [DOI: 10.1042/bj3180001].
16. Goetz DH, Willie ST, Armen RS, Bratt T, Borregaard N, Strong RK. Ligand preference inferred from the structure of neutrophil gelatinase associated lipocalin. *Biochemistry*. 2000;39(8):1935-41. [DOI:10.1021/bi992215v].
17. Tomonaga Y, Szucs T, Ambühl P, Nock S, Risch M, Risch L. Insights on urinary NGAL obtained in a primary care setting. *Clin Chim Acta*. 2012;413(7-8):733-9. [DOI: 10.1016/j.cca.2012.01.001].
18. Mori K, Lee HT, Rapoport D, Drexler IR, Foster K, Yang J, et al. Endocytic delivery of lipocalin-siderophoreiron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest*. 2005;115(3):610-21. [DOI: 10.1172/JCI200523056].
19. Mahdavi-Mazdeh M, Abdollahi A, Nozary HB, Sobhani Z. Comparison of serum and urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) with serum creatinine in prediction of kidney suitability for transplantation. *Nephrourol Mon*. 2013;5(1):679-82. [DOI: 10.5812/numonthly.5002].
20. Flo TH, Smith KD, Sato S, Rodriguez DJ, Holmes MA, Strong RK, et al. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature*. 2004;432(7019):917-21. [DOI:10.1038/nature03104].
21. Lassnigg A, Schmid ER, Hiesmayr M, Falk C, Druml W, Bauer P, et al. Impact of minimal increases in serum creatinine on outcome in patients after cardiothoracic surgery: do we have to revise current definitions of acute renal failure? *Crit Care Med*. 2008;36(4):1129-37. [DOI: 10.1097/CCM.0b013e318169181a].
22. Mishra J, Ma Q, Prada A, Mitsnefes M, Zahedi K, Yang J, et al. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(10):2534-43. [DOI:10.1097/01.ASN.0000088027.54400.C6].

23. Bennett M, Dent CL, Ma Q, Dastrala S, Grenier F, Workman R, et al. Urine NGAL predicts severity of acute kidney injury after cardiac surgery: a prospective study. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3(3):665-673. [DOI: 10.2215/CJN.04010907].
24. Haase M, Bellomo R, Devarajan P, Schlattmann P, Haase-Fielitz A, NGAL Meta-analysis Investigator Group. Accuracy of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) in Diagnosis and Prognosis in Acute Kidney Injury: A Systematic Review and Meta-analysis. *Am J Kidney Dis*. 2009;54(6):1012-24. [DOI: 10.1053/j.ajkd.2009.07.020].
25. Kim H, Hur M, Cruz DN, Moon HW, Yun YM. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker for acute kidney injury in critically ill patients with suspected sepsis. *Clin Biochem*. 2013;46(15):1414-8. [DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2013.05.069].
26. Payen D, Lukaszewicz AC, Legrand M, Gayat E, Faivre V, Megarbane B, et al. A multicentre study of acute kidney injury in severe sepsis and septic shock: association with inflammatory phenotype and HLA genotype. *PLoS One*. 2012;7(6):e35838. [DOI: 10.1371/journal.pone.0035838].
27. Doi K, Urata M, Katagiri D, Inamori M, Murata S, Hisagi M, et al. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin in acute kidney injury superimposed on chronic kidney disease after cardiac surgery: a multicenter prospective study. *Crit Care*. 2013;17(6):R270. [DOI: 10.1186/cc13104].
28. Moon SJ, Park HB, Yoon SY, Lee SC. Urinary biomarkers for early detection of recovery in patients with acute kidney injury. *J Korean Med Sci*. 2013;28(8):1181-6. [DOI: 10.3346/jkms.2013.28.8.1181. Epub 2013 Jul 31].
29. Rostami Z, Nikpoor M, Einollahi B. Urinary neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) for early diagnosis of acute kidney injury in renal transplant recipients. *Nephrourol Mon*. 2013;5(2):745-52. [DOI: 10.5812/numonthly.9385].
30. Ibels LS, Gyory AZ, Catterson RJ, Pollock CA, Mahony JE, Waugh DA, et al. Primary IgA nephropathy: natural history and factors of importance in the progression of renal impairment. *Kidney Int Suppl*. 1997;61:S67-S70.
31. Ding H, He Y, Li K, Yang J, Li X, Lu R, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is an early biomarker for renal tubulointerstitial injury in IgA nephropathy. *Clin Immunol*. 2007;123(2):227-34. [DOI: 10.1016/j.clim.2007.01.010].
32. Peters HP, Waanders F, Meijer E, van den Brand J, Steenbergen EJ, van Goor H, et al. High urinary excretion of kidney injury molecule-1 is an independent predictor of end-stage renal disease in patients with IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2011;26(11):1-8. [DOI: 10.1093/ndt/gfr135].
33. Hinze CH, Suzuki M, Klein-Gitelman M, Passo MH, Olson J, Singer NG, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a predictor of the course of global and renal childhood-onset systemic lupus erythematosus disease activity. *Arthritis Rheum*. 2009;60(9):2772-81. [DOI: 10.1002/art.24751].
34. Yang CC, Hsieh SC, Li KJ, Wu CH, Lu MC, Tsai CY, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a potential biomarker for renal damage in patients with systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:759313. [DOI: 10.1155/2012/759313].
35. Brunner HI, Bennett MR, Mina R, Suzuki M, Petri M, Kiani AN, et al. Association of noninvasively measured renal protein biomarkers with histologic features of lupus nephritis. *Arthritis Rheum*. 2012;64(8):2687-97. [DOI: 10.1002/art.34426].
36. Yilmaz A, Sevetoglu E, Gedikbasi A, Karyagar S, Kiyak A, Mulazimoglu M, et al. Early prediction of urinary tract infection with urinary neutrophil gelatinase associated lipocalin. *Pediatr Nephrol*. 2009;24(12):2387-92. [DOI: 10.1007/s00467-009-1279-6].
37. Bagshaw SM, Bellomo R, Devarajan P, Johnson C, Karvellas CJ, Kutsiogiannis DJ, et al. Review article: acute kidney injury in critical illness. *Can J Anaesth*. 2010;57(11):985-98. [DOI: 10.1007/s12630-010-9375-4].
38. Fanning N, Galvin S, Parke R, Gilroy J, Bellomo R, McGuinness S. A prospective study of the timing and accuracy of neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels in predicting acute kidney injury in high-risk cardiac surgery patients. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2016;30(1):76-81. [DOI: 10.1053/j.jvca.2015.07.034]. [Epub 2015 Jul 30].

39. Wyckoff T, Augoustides JG. Advances in acute kidney injury associated with cardiac surgery: the unfolding revolution in early detection. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2012;26(2):340-5. [DOI: 10.1053/j.jvca.2012.01.001].
40. Wagener G, Jan M, Kim M, Mori K, Barasch JM, Sladen RN, et al. Association between increases in urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin and acute renal dysfunction after adult cardiac surgery. *Anesthesiology*. 2006;105(3):485-91.
41. Parikh CR, Devarajan P, Zappitelli M, Sint K, Thiessen-Philbrook H, Li S, et al. Postoperative biomarkers predict acute kidney injury and poor outcomes after pediatric cardiac surgery. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(9):1737-47. [DOI: 10.1681/ASN.2010111163].
42. Parving HH, Mauer M, Ritz E. In: Brenner & Rector's *The Kidney*. 8<sup>a</sup> ed. Boston (WB):Saunders; 2008.
43. Birn H, Christensen EI. Renal albumin absorption in physiology and pathology. *Kidney Int*. 2006;69(3):440-9. [DOI: 10.1038/sj.ki.5000141].
44. Brocco E, Fioretto P, Mauer M, Saller A, Carraro A, Frigato F, et al. Renal structure and function in non-insulin dependent diabetic patients with microalbuminuria. *Kidney Int*. 1997;63:S40-4.
45. Nielsen SE, Schjoedt KJ, Astrup AS, Tarnow L, Lajer M, Hansen PR, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and kidney injury molecule 1 (KIM1) in patients with diabetic nephropathy: a cross-sectional study and the effects of lisinopril. *Diabet Med*. 2010;27(10):1144-50. [DOI: 10.1111/j.1464-5491.2010.03083.x].
46. Bolignano D, Lacquaniti A, Coppolino G, Donato V, Fazio MR, Nicocia G, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as an early biomarker of nephropathy in diabetic patients. *Kidney Blood Press Res*. 2009;32(2):91-8. [DOI: 10.1159/000209379].
47. Carvalho JAM, Tatsch E, Hausen BS, Bollick YS, Moretto MB, Duarte T, et al. Urinary kidney injury molecule-1 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin as indicators of tubular damage in normoalbuminuric patients with type 2 diabetes. *Clin Biochem*. 2016;49(3):232-6. [DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2015.10.016]. [Epub 2015 Oct 27].
48. Grenier FC, Ali S, Syed H, Workman R, Martens F, Liao M, et al. Evaluation of the ARCHITECT urine NGAL assay: assay performance, specimen handling requirements and biological variability. *Clin Biochem*. 2010;43(6):615-20. [DOI:10.1016/j.clinbiochem.2009.12.008].
49. van de Vrie M, Deegens JK, van der Vlag J, Hilbrands LB. Effect of long-term storage of urine samples on measurement of kidney injury molecule 1 (KIM-1) and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). *Am J Kidney Dis*. 2014;63(4):573-6. [DOI:10.1053/j.ajkd.2013.10.010].



# Avaliação do conhecimento da população sobre leishmaniose visceral

## Assessment of the population knowledge on the visceral leishmaniasis

RIALA6/1685

Laís ANVERSA<sup>1\*</sup>, Roberto José Daré MONTANHOLI<sup>2</sup>, Débora Libonato SABINO<sup>2</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Centro de Laboratórios Regionais de Bauru, Instituto Adolfo Lutz. Rua Rubens Arruda, Quadra 6, Centro, Bauru, SP. CEP: 17015-110. Tel: 14 3223 1175 Ramal 212. E-mail: lanversa@ial.sp.gov.br

<sup>2</sup>Anhanguera Educacional. Bauru, SP, Brasil

Recebido: 28.09.2015 - Aceito para publicação: 08.01.2016

### RESUMO

A leishmaniose visceral encontra-se amplamente distribuída no mundo, e em virtude de sua elevada ocorrência e alto grau de letalidade, assume grande importância em saúde coletiva. Neste estudo foi avaliado o conhecimento sobre a leishmaniose visceral em um grupo da população no município de Bauru (SP), por meio de questionário aplicado em diferentes bairros da cidade. Do total de 280 pessoas entrevistadas, 99,3 % afirmaram já terem ouvido falar da doença, 77,1 % conheciam o modo de transmissão, 87,1 % reconheciam o papel do cão como reservatório doméstico, 59,6 % sabiam sobre os sinais clínicos nos humanos, 86,1 % conheciam os sinais clínicos em cães, 59,6 % reconheciam as medidas preventivas, 58,6 % compreendiam a necessidade da eutanásia canina, e 27,1 % tinham conhecimento sobre o principal período do dia em que o inseto vetor atua. Variações significativas no nível de instrução dos participantes foram evidenciadas em relação a alguns bairros e ao grau de escolaridade, mas não quanto à renda familiar. No geral, o nível de conhecimento da população estudada revelou-se bom, porém, com carência de informações em alguns aspectos, principalmente quanto ao período de atuação dos flebotomíneos, ressaltando-se a necessidade de melhorias na divulgação de particularidades da parasitose.

**Palavras-chave.** leishmaniose visceral, inquérito, conhecimento, questionário.

### ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is a widespread disease in the world, and due to its high incidence and high mortality, it is of great importance in public health. This study aimed at evaluating the knowledge on visceral leishmaniasis in a group of population in the city of Bauru (SP), through a questionnaire applied in different districts of the city. Of 280 participant persons, 99.3 % stated they had heard about the disease, 77.1 % knew the mode of transmission, 87.1 % recognized the role of dogs as domestic reservoirs, 59.6 % knew on the clinical signs in human, 86.1 % knew the clinical signs in dogs, 59.6 % recognized the preventive measures, 58.6 % understood the need of canine euthanasia and 27.1 % had knowledge on the main day time in which the insect acts. Significant variance in the participants education degrees were shown in relation to some districts and to the educational level, but not regarding to the family income. Overall, the knowledge degree of the evaluated population proved to be good, however, lack of information in some aspects was observed, especially regarding to the period of sandflies activity, emphasizing the need for improving the disclosure of the parasite particulars.

**Keywords.** visceral leishmaniasis, survey, knowledge, questionnaire.



## INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral, ou calazar, é uma parasitose amplamente distribuída no mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais da Ásia, Oriente Médio, África, América Central e América do Sul<sup>1</sup>. Aproximadamente 300 mil novos casos ocorrem todos os anos, com 20.000 a 40.000 mortes anuais<sup>2</sup>.

No Brasil, a doença é causada pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) infantum* e transmitida pela picada de insetos vetores – *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* – infectados, conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquiras, birigui, entre outros<sup>3</sup>. Além do homem, que representa um hospedeiro acidental da doença por entrar em contato com o ciclo de transmissão, esta parasitose acomete várias outras espécies de animais, como roedores, marsupiais, edentados e canídeos<sup>4</sup>.

A leishmaniose visceral humana é uma doença sistêmica e crônica, com período de incubação bastante variável (podendo chegar a dois anos) e, quando não tratada, evolui para o óbito em mais de 90 % dos casos<sup>5</sup>. As principais manifestações clínicas são febre alta, hepatoesplenomegalia, pancitopenia, hipergamaglobulinemia, perda de peso e anemia<sup>6</sup>.

Em virtude do significativo aumento na sua incidência, nos últimos anos tem ocorrido um crescente interesse nesta parasitose. Além de relato de epidemias recentes em áreas endêmicas, há evidências de disseminação para áreas anteriormente não endêmicas<sup>7</sup>. Tais situações podem ser explicadas em parte pela melhoria do diagnóstico e notificação dos casos, mas também são resultados de fatores associados ao aumento da migração da população, ao aumento da detecção associada às infecções oportunistas (HIV/AIDS), ao surgimento de resistência a drogas utilizadas no tratamento e à adaptação dos ciclos de transmissão aos ambientes peridomiciliares, decorrente da urbanização e do desmatamento<sup>8</sup>. Dessa forma, embora seja uma doença predominantemente rural, os registros têm revelado seu processo de urbanização<sup>9</sup>.

No Brasil, a leishmaniose visceral está registrada em 21 das 27 Unidades da Federação,

e aproximadamente 1.600 municípios apresentam transmissão autóctone<sup>9</sup>.

Vale ressaltar que em áreas urbanas, o cão (*Canis familiaris*) é considerado o principal reservatório doméstico da doença e, conseqüentemente, a principal fonte de infecção humana<sup>10</sup>.

Classicamente, os cães enfermos apresentam alterações cutâneas (alopecia, eczema furfuráceo, úlceras e hiperqueratose), onicogrifose, emagrecimento, cerato-conjuntivite e paresia dos membros posteriores<sup>11,12</sup>. Entretanto, a maioria dos cães infectados permanece sem sinais clínicos por um longo período de tempo, o que dificulta o diagnóstico e favorece a transmissão da infecção<sup>13</sup>.

As estratégias de controle da leishmaniose visceral fundamentam-se em três medidas: (1) diagnóstico e tratamento de pacientes humanos, (2) inquérito sorológico canino e eutanásia de cães soropositivos e (3) redução da população de vetores em áreas endêmicas<sup>9</sup>. Contudo, essas medidas, muitas vezes realizadas de forma isolada, não apresentaram efetividade para a redução da incidência da doença<sup>14</sup>.

É consenso que em doenças endêmicas o conhecimento da população em relação à epidemiologia, às formas de transmissão e à prevenção traz contribuições relevantes para o controle da enfermidade<sup>15</sup>. Além disso, a investigação do comportamento e das crenças da população pode também orientar as práticas de prevenção, tornando-as mais efetivas<sup>16</sup>.

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar o conhecimento da população sobre leishmaniose visceral no município de Bauru, uma das cidades mais afetadas pela doença no Estado de São Paulo. Os objetivos específicos incluíram: (1) identificar as particularidades da parasitose que necessitam de maiores esclarecimentos; (2) correlacionar os aspectos socioeconômicos da população com o grau de conhecimento sobre a doença.

## MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada em Bauru, no ano de 2013, por meio de um estudo transversal de base populacional.

Bauru está localizado no interior do Estado de São Paulo, na região noroeste da capital, distando-se aproximadamente 326 km da cidade de São Paulo. O município ocupa uma área de 673,488 km<sup>2</sup>, sendo que 68,9769 km<sup>2</sup> estão em perímetro urbano e os 604,51 km<sup>2</sup> restantes constituem a zona rural. Em 2010, sua população foi estimada pelo IBGE em 346.076 habitantes, com 98,5 % da população na zona urbana.

A avaliação do conhecimento da população sobre leishmaniose visceral foi realizada por meio da aplicação de um questionário pré-estruturado, fechado, contendo: (A) seis questões de múltipla escolha (com cinco alternativas e uma única resposta correta – valendo 1,0 ponto cada questão) elaboradas com ênfase no conhecimento básico sobre transmissão, sinais clínicos da doença e eutanásia canina; (B) uma questão dicotômica (sim/não) (com seis itens – valendo 1,0 ponto – 0,17 cada item) associadas às medidas profiláticas. Além das questões específicas, alguns aspectos socioeconômicos, como escolaridade e renda familiar mensal, também foram abordados.

O questionário foi aplicado em várias regiões da cidade, representadas por 14 bairros (escolhidos aleatoriamente, distribuídos na zona norte, sul, leste e oeste): Centro, Parque Santa Edwiges, Jardim Bela Vista, Vila Cardia, Vila Pacífico, Vila Souto, Vila Independência, Jardim Dona Sarah, Jardim Terra Branca, Parque Jardim Europa, Novo Jardim Pagani, Núcleo Habitacional Mary Dota, Tangarás e Núcleo Residencial Presidente Geisel (**Figura 1**).

A população residente em cada bairro foi convidada a participar da pesquisa por meio de visitas domiciliares, sendo o preenchimento do questionário voluntário e sem identificação pessoal.

A seleção das residências a serem visitadas foi realizada de maneira sistemática, da seguinte forma: primeiro foi escolhido um ponto de partida de forma aleatória e depois efetuado um pulo de nove domicílios, sendo o décimo o próximo a ser visitado. E assim consecutivamente, até ser visitado um total de 20 domicílios. É importante ressaltar que ao final de cada quadra, a direção a ser seguida foi escolhida aleatoriamente, de forma que o questionário não



**Figura 1.** Bairros do município de Bauru\* incluídos na avaliação do conhecimento sobre leishmaniose visceral

\*Dados catastróficos ©2013 Google.MapLink

foi aplicado sempre na mesma rua. Em casos de recusa na participação da pesquisa ou ausência de moradores nos domicílios selecionados, a visita foi realizada na residência vizinha, seguindo-se a direção previamente escolhida.

Por conseguinte, participou da pesquisa um total de 280 moradores de Bauru, sendo 20 moradores de cada bairro.

Os critérios de inclusão dos participantes selecionaram pessoas com idade superior a 18 anos, residentes em Bauru e moradoras do bairro visitado. Nos casos de indivíduos analfabetos ou com qualquer outra dificuldade para responder o questionário, as perguntas foram feitas verbalmente.

Para a interpretação final dos resultados, quanto à porcentagem dos entrevistados que conheciam os vários aspectos da doença ou quanto ao número de acertos das questões propostas, no total de 7,0 pontos, respectivamente, adotou-se o seguinte critério: 0 – 20 % ou 0 – 1,4 = conhecimento ausente ou muito limitado; 21 – 40 % ou 1,5 – 2,8 = limitado; 41 – 60 % ou 2,9 – 4,2 = razoável; 61 – 80 % ou 4,3 – 5,6 = bom; 81 – 100 % ou 5,7 – 7,0 = ótimo.

A análise estatística foi realizada por meio de programa *Statistica - version 10 (StatSoft)* e considerou-se diferença significativa quando  $p < 0,05$ .

O estudo foi elaborado e executado seguindo-se as diretrizes e normas que regem as pesquisas envolvendo seres humanos (Resolução nº 196/1996 do Conselho Nacional de Saúde, posteriormente revogada pela Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012), e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Anhanguera Educacional (CEP/Aesa) sob o Parecer nº 232.195/2013.

## RESULTADOS

Dos 280 moradores da cidade de Bauru que participaram da pesquisa, 59,6 % (167) eram mulheres e 40,4 % (113) eram homens. A média de idade foi de 44,3 anos, variando entre 20 e 62 anos.

De todos os entrevistados, 99,3 % (278) afirmaram já terem ouvido falar sobre a leishmaniose visceral e atribuíram a divulgação

dessa informação por meio de programas de TV (61,2 %), agentes de saúde (10,4 %), folhetos informativos (9,4 %), programas de rádio (3,6 %), amigos (3,6 %), médicos (1,8 %), escola (1,4 %) e outros meios (8,6 %).

Quando questionados quanto à transmissão da parasitose, 77,1 % (216) dos participantes responderam que a infecção ocorre por picada de flebotomíneos (mosquito palha, tatuquiras, birigui), 13,6 % (38) por mordida de cão infectado, 3,9 % (11) por urina e fezes de gato infectado, 0,4 % (1) por contato direto de pessoa a pessoa e 5 % (14) afirmaram desconhecer.

A grande maioria dos entrevistados, 87,1 % (244), reconheceu que dentre os animais domésticos, o cão é considerado o principal reservatório da doença e a principal fonte de infecção humana. Outros animais assinalados foram o caramujo, 3,9 % (11), o morcego, 2,5 % (7), e o gato, 0,7 % (2); e 5,7 % (16) dos participantes admitiram não ter conhecimento.

Ficou evidente neste estudo que, em relação à doença em seus mais variados aspectos, a informação que a população mais desconhece refere-se ao momento do dia em que o inseto vetor mais atua, pois 45,7 % (128) das pessoas responderam durante o dia, 27,1 % (76) relataram não saber, e apenas 27,1 % (76) indicaram ser durante o crepúsculo e à noite e acertaram essa questão.

Considerando-se os sinais clínicos mais comuns apresentados por um indivíduo com leishmaniose visceral, 59,6 % (167) dos entrevistados mencionaram febre e aumento do diâmetro abdominal, com aumento do baço e do fígado, 11,4 % (32) diarreia e vômito, 4,3 % (12) manchas roxas pelo corpo, 2,1 % (6) inchaço nas pernas e, uma boa parte, 22,5 % (63) afirmaram ignorar a resposta. Com referência aos sinais clínicos caninos, emagrecimento, queda dos pêlos, úlceras na pele e crescimento exagerado das unhas foram reconhecidos por 86,1 % (241) dos participantes. Outros sintomas assinalados foram a falta de coordenação motora e os tremores musculares: 5,7 % (16), diarreia e vômito: 1,4 % (4), excesso de pêlo e irritabilidade: 1,4 % (4), e 5,4 % (15) das pessoas admitiram não conhecer.

Como medidas preventivas para a leishmaniose visceral, 71,4 % (200) dos entrevistados consideraram boas práticas de higiene das mãos, 67,9 % (190) incluíram lavar bem os alimentos e ferver a água antes de consumi-la, 42,1 % (118) marcaram evitar comer carne malpassada, 80,7 % (226) consideraram o uso de mosquiteiro e telagem de portas e janelas, 98,6 % (276) enfatizaram a limpeza de quintais, terrenos e praças públicas e 58,9 % (165) indicaram a não permanência de animais domésticos dentro de casa.

De acordo com a população estudada, a medida recomendada para o cão diagnosticado com a doença é a eutanásia para 58,6 % (164) das pessoas, tratamento com medicamentos para 27,5 % (77), isolamento temporário para 5 % (14), banhos frequentes para 1,1 % (3) e 7,9 % (22) dos participantes responderam desconhecer.

De forma resumida, a Figura 2 ilustra o resultado geral da avaliação do conhecimento dos moradores de Bauru entrevistados sobre os vários aspectos da doença.

Considerando-se as sete questões abordadas na pesquisa (no total de 7,0 pontos), a média geral de acertos da população estudada foi de  $4,54 \pm 1,34$

(desvio padrão), sendo a mínima de 0,5 (n=1) e a máxima de 7,0 (n=4).

Os bairros que apresentaram maior conhecimento da população quanto aos vários aspectos da doença foram Parque Jardim Europa ( $4,99 \pm 1,31$ ), Novo Jardim Pagani ( $4,88 \pm 1,36$ ) e Tangarás ( $4,87 \pm 1,12$ ). Os bairros que revelaram menor esclarecimento foram Vila Cardia ( $3,93 \pm 1,52$ ), Jardim Bela Vista ( $4,09 \pm 1,63$ ) e Núcleo Habitacional Mary Dota ( $4,30 \pm 1,16$ ) (Figura 3).

Diferenças significativas foram observadas na média de acertos quanto à escolaridade dos participantes. A média de acertos de quem nunca frequentou a escola foi de  $3,31 \pm 1,82$  (n=7), sendo significativamente menor quando comparada a quem possui 2º grau incompleto ( $4,71 \pm 1,41$ ; n=25), 2º grau completo ( $4,67 \pm 1,26$ ; n=89) e 3º grau completo ( $4,79 \pm 1,40$ ; n=66). Diferença significativa também foi encontrada entre os indivíduos que possuem 1º grau incompleto ( $4,06 \pm 1,30$ ; n=28) e 2º e 3º graus completos (Figura 4).

Não foram observadas diferenças significativas na média de acertos da população estudada em relação à renda familiar (Figura 5).

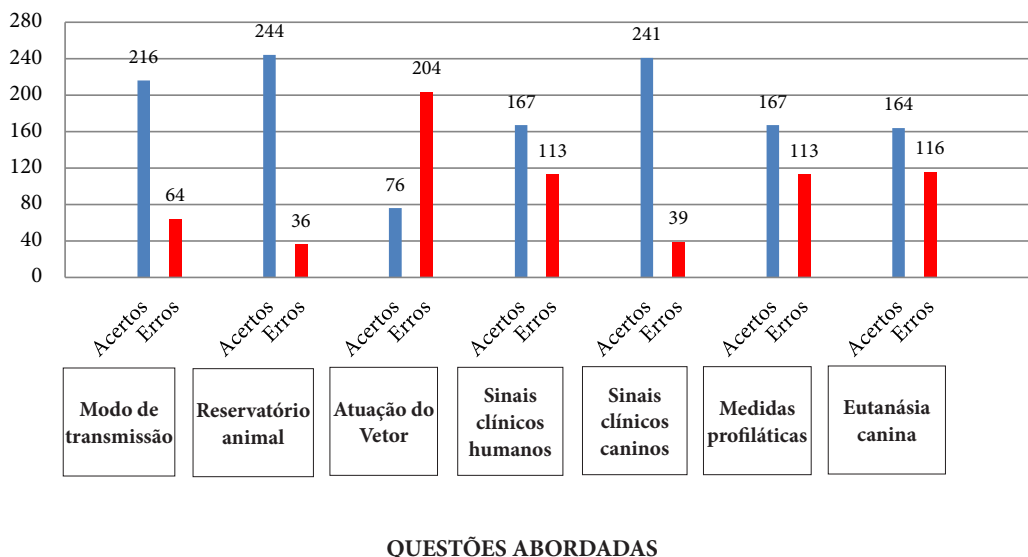


Figura 2. Resultado geral da avaliação do conhecimento dos 280 moradores de Bauru entrevistados em relação a vários aspectos da leishmaniose visceral, segundo acertos e erros

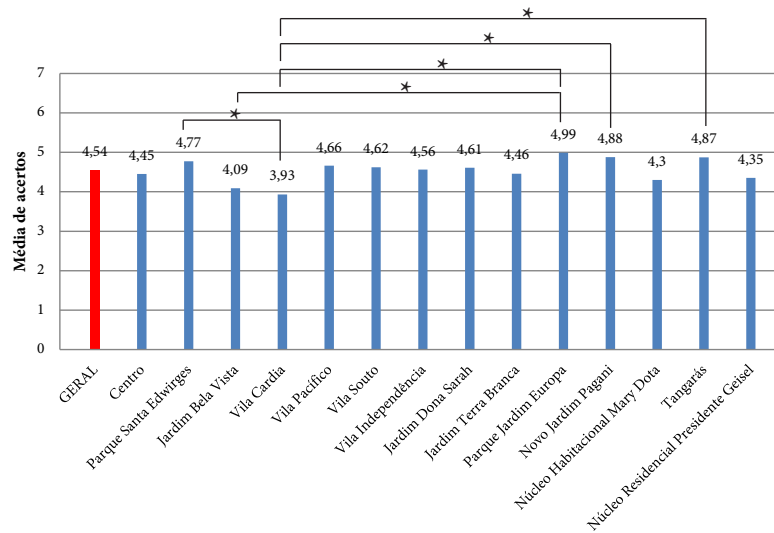


Figura 3. Média de acertos das sete questões propostas no questionário, por bairro \* $p < 0,05$

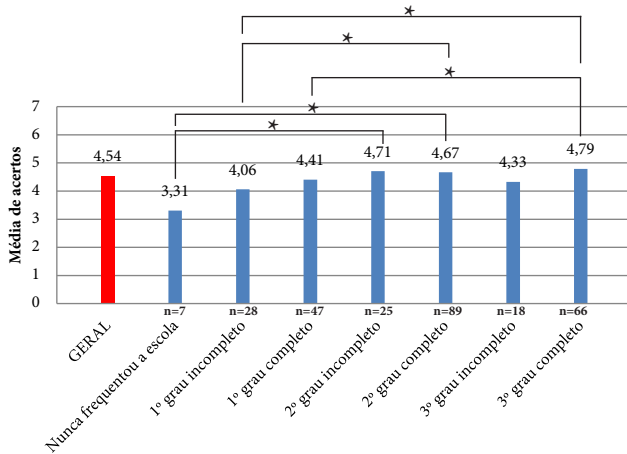


Figura 4. Média de acertos das sete questões propostas no questionário, segundo a escolaridade \* $p < 0,05$

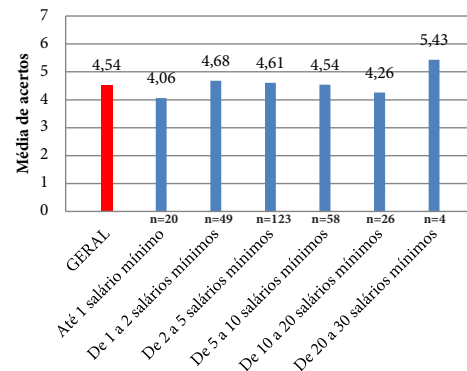


Figura 5. Média de acertos das sete questões propostas no questionário, segundo a renda familiar

## DISCUSSÃO

Diferentemente ao estudo realizado em Belo Horizonte (MG)<sup>16</sup>, no qual apenas 40,2 % da população estudada já tinham ouvido a respeito da doença e pouco conhecia sua associação com o cão e sobre os sintomas da leishmaniose visceral, na presente avaliação feita em Bauru, de forma geral os entrevistados demonstraram conhecimento, ao menos razoável, sobre os principais aspectos da parasitose.

No Estado de São Paulo, a leishmaniose visceral canina ocorre em 95 cidades, enquanto a forma humana está presente em 66 centros urbanos<sup>17</sup>. O município de Bauru é uma das cidades mais afetadas do Estado, com 381 novos casos humanos confirmados entre 2004 e 2012<sup>18</sup>. Este fato justifica a razão da população não ignorar a doença, principalmente, pela ampla divulgação e/ou pelo contato prévio com pessoas ou animais próximos infectados.

Segundo Dias<sup>19</sup>, o êxito das estratégias contra

as doenças endêmicas depende basicamente da disponibilidade de recursos econômicos e, necessariamente, do conhecimento das competências e atitudes da população diante dos problemas mórbidos, relevantes para a aceitação e participação efetivas nas ações profiláticas. Borges et al<sup>16</sup> ressaltaram ainda que qualquer conhecimento sobre a leishmaniose visceral pode ser considerado fator de proteção, capaz de minimizar o risco de ocorrência da enfermidade. No entanto, para o controle efetivo da doença, apenas o conhecimento não é suficiente, deve haver coerência entre conhecimentos e atitudes.

Vale enfatizar que em relação às medidas preventivas, boa parte dos entrevistados não destaca apenas ações específicas para a leishmaniose visceral, mas sim as medidas gerais de boas práticas de higiene que não interferem no ecossistema infectivo. Este dado sugere que a prática de ações preventivas para a leishmaniose visceral ainda necessita de melhor divulgação e de incentivo por parte do governo e da própria sociedade.

## CONCLUSÃO

De forma geral, o nível de conhecimento dos moradores de Bauru entrevistados, em relação à leishmaniose visceral, revelou ser bom, pois boa parte do grupo estudado demonstrou conhecer algumas noções básicas da doença, destacando-se a importância da informação transmitida pelos programas de TV.

No entanto, alguns aspectos sobre a parasitose, como sinais clínicos humanos, medidas preventivas, eutanásia canina e, especialmente, quanto ao principal período de atuação dos insetos vetores ainda necessitam de maior divulgação para a comunidade em geral.

Diferenças significativas não foram observadas com referência ao nível de instrução e à renda familiar, porém o grau de escolaridade demonstrou estar significativamente associado ao maior esclarecimento sobre a doença.

Por fim, ressalta-se a necessidade de se manter as medidas de controle já realizadas e com um diferencial, a busca da excelência em educação em saúde.

## REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Essential leishmaniasis maps. [acesso 2013 Jul 02]. Disponível em: [http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis\_maps/en/index.html].
2. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE*. 2012;7(5):e35671. [DOI: 10.1371/journal.pone.0035671].
3. Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100(8):811-27. [DOI:10.1590/S0074-02762005000800001].
4. Carreira JC, Da Silva AV, Pita Pereira D, Brazil RP. Natural infection of *Didelphis aurita* (*Mammalia: Marsupialia*) with *Leishmania infantum* in Brazil. *Parasit Vectors*. 2012;5(11):1-5. [DOI:10.1186/1756-3305-5-111].
5. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet*. 2005;366(9496):1561-77. [DOI:10.1016/S0140-6736(05)67629-5].
6. Bern C, Maguire JH, Alvar J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008;2(10):e313. [DOI:10.1371/journal.pntd.0000313].
7. Palatnik-de-Sousa CB, Day MJ. One Health: The global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. *Parasites e Vector*. 2011;4(197):1-10. [DOI:10.1186/1756-3305-4-197].
8. Pavli A, Maltezos HC. Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. *Int J Infect Dis*. 2010;14(12):e1032-9. [DOI:10.1016/j.ijid.2010.06.019].
9. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, 2014.
10. Dantas-Torres F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet Parasitol*. 2007;149(3-4):139-46. [DOI:10.1016/j.vetpar.2007.07.007].

11. Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol*. 2004;57:1-88. [DOI: 10.1016/S0065-308X(04)57001-X].
12. Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol*. 2009;165(1-2):1-18. [DOI:10.1016/j.vetpar.2009.05.022].
13. Dantas-Torres F. Canine leishmaniasis in South America. *Parasit Vectors*. 2009; 2(suppl I):S1. [DOI: 10.1186/1756-3305-2-S1-S1].
14. Romero GAS, Boelaert M. Control of Visceral Leishmaniasis in Latin America - A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(1):e584. [DOI:10.1371/journal.pntd.0000584].
15. Luz ZMP, Schall V, Rabello A. Evaluation of a pamphlet on visceral leishmaniasis as a tool for providing disease information to healthcare professionals and laypersons. *Cad Saúde Pública*. 2005;21(2):606-21. [DOI:10.1590/S0102-311X2005000200028].
16. Borges BKA, Silva JA, Haddad JPA, Moreira EC, Magalhães DF, Ribeiro LML et al. Avaliação do nível de conhecimento e de atitudes preventivas da população sobre a leishmaniose visceral em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. *Cad Saúde Pública*. 2008;24(4):777-84. [DOI:10.1590/S0102-311X2008000400007].
17. Comitê de Leishmaniose Visceral Americana da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, SP, Brasil. Classificação epidemiológica dos municípios segundo o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo, atualizado em novembro de 2011. BEPA, *Bol Epidemiol Paul [On-line]*. 2011; 8(96):32-36. Disponível em: [<http://periodicos.ses.sp.bvs.br/pdf/bepa/v8n96/v8n96a03.pdf>].
18. Ortiz RC, Anversa L. Epidemiologia da leishmaniose visceral em Bauru, São Paulo, no período de 2004 a 2012: um estudo descritivo. *Epidemiol Serv Saúde*. 2015; 24(1): 97-104. [DOI: 10.5123/S1679-49742015000100011].
19. Dias JCP. Problemas e possibilidades de participação comunitária no controle das grandes endemias do Brasil. *Cad Saúde Pública*. 1998; 14(Suppl 2): 19-37. [DOI:10.1590/S0102-311X1998000600003].



# Avaliação do exame imuno-histoquímico para o diagnóstico de *Leishmania* spp. em amostras de tecidos caninos

## Evaluation of immunohistochemical technique for the diagnosis of *Leishmania* spp. in canine tissues samples

RIALA6/1686

Juliana Mariotti GUERRA<sup>1\*</sup>, Natália Coelho Couto de Azevedo FERNANDES<sup>1</sup>, Lidia Midori KIMURA<sup>1</sup>, Neuza Kasumi SHIRATA<sup>1</sup>, Jéssica Abatzoglou MAGNO<sup>1</sup>, Marília Ferreira ABRANTES<sup>1</sup>, Karolina Rosa FERNANDES<sup>1</sup>, Maiara Maria Romanelli SILVA<sup>1</sup>, José Eduardo de Raeffray BARBOSA<sup>2</sup>, Helena Hilomi TANIGUCHI<sup>3</sup>, Roberto Mitsuyoshi HIRAMOTO<sup>3</sup>, Suely NONOGAKI<sup>1</sup>, José Eduardo TOLEZANO<sup>3</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Centro de Patologia, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 351, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 01246-000. Tel: 11 3068 2874. E-mail: julianamariotti@ial.sp.gov.br, jumariotti.vet@gmail.com

<sup>2</sup>Centro de Procedimentos Interdisciplinares, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil

<sup>3</sup>Centro de Parasitologia e Micologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil

Recebido: 17.09.2015 - Aceito para publicação: 23.02.2016

### RESUMO

No Brasil, as leishmanioses representam um importante problema de saúde pública pela sua elevada incidência, ampla distribuição geográfica e marcante aumento na transmissão associados à urbanização da doença. Cães são considerados os principais reservatórios da leishmaniose visceral (LV) no ambiente urbano, tornando-se fundamental o aprimoramento do diagnóstico da doença nessa espécie. Este estudo objetivou a avaliação da técnica de imuno-histoquímica (IHQ) para o diagnóstico de *Leishmania* spp. em amostras de diferentes tecidos de cães recebidas no Núcleo de Patologia Quantitativa do Instituto Adolfo Lutz (NPQ-IAL). Amostras de tecidos coletadas de 134 cães, provenientes de municípios do Estado de São Paulo, positivos para LV por teste rápido (TR DPP<sup>®</sup>-Bio-Manguinhos), ensaio imunoenzimático-EIE/Elisa (Bio-Manguinhos) e pela reação em cadeia de polimerase, foram submetidas a uma marcação IHQ específica, em duplicata. A reação de IHQ apresentou sensibilidade de 98,51 %, especificidade de 100,00 % e acurácia de 98,61 %. A maior positividade foi detectada nas amostras de baço. O índice *Kappa* foi de 0,84 entre os resultados da análise dos tecidos em duplicata. A técnica de IHQ pode ser utilizada como uma técnica rotineira para o diagnóstico das leishmanioses caninas, sendo padronizada e implantada no NPQ-IAL.

**Palavras-chave.** leishmaniose visceral, cães, imuno-histoquímica, patologia.

### ABSTRACT

In Brazil, leishmaniasis represents a major public health problem due to its high incidence, wide distribution and remarkable increase in transmission associated with the disease urbanization. Dogs are considered as the main reservoirs of visceral leishmaniasis (VL) in the urban environment and diagnosis improvement was fundamental in this species. This study aimed at evaluating the immunohistochemical technique (IHC) for diagnosing *Leishmania* spp. in different tissues samples collected from dogs. This investigation was performed at the Quantitative Pathology Center of the Institute Adolfo Lutz (NPQ-IAL). Tissue samples collected from 134 dogs, derived from municipalities of São Paulo State, positive for VL by rapid testing (TR DPP<sup>®</sup> - Bio-Manguinhos), enzyme-linked immunosorbent assay (EIA/ELISA - Bio-Manguinhos), and polymerase chain reaction, were analyzed by specific IHC in duplicate. These dogs were previously diagnosed as VL. IHC showed sensitivity of 98.51 %, specificity of 100.00 %, positive predictive value of 100.00 %, negative predictive value of 83.33 % and accuracy of 98.61 %. The major positivity was detected in spleen samples. Kappa index between the tissues duplicate results was of 0.84. IHC technique, standardized and implemented at NPQ-IAL, showed to be suitable to be used as routine test for diagnosing canine leishmaniasis effectively.

**Keywords.** visceral leishmaniasis, dogs, immunohistochemistry, pathology.



## INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral é uma doença de curso crônico, de caráter antroponótico e de envolvimento sistêmico, que quando não tratada resulta em morte em 90,00 % dos pacientes. Na América, o agente etiológico da doença é a *Leishmania infantum chagasi*<sup>1</sup>. A leishmaniose visceral americana é transmitida por um vetor pertencente à família *Psychodidae* e gênero *Lutzomyia*, e no Brasil o principal vetor é *Lu longipalpis*<sup>1,2</sup>. Atualmente, essa doença atinge vários estados brasileiros, com média anual de 3.553 casos no período de 2004 a 2013 e incidência de 1,90 casos por 100.000 habitantes<sup>3</sup>.

Do ponto de vista epidemiológico, o cão é considerado o mais importante entre os animais identificados como reservatórios do parasita, até o presente momento<sup>4,5</sup>. Este destaque baseia-se nos seguintes fatos: a leishmaniose é mais prevalente na população canina do que na humana, e a doença humana é normalmente precedida pela infecção canina. Além disso, a infecção dos vetores é favorecida pela maior quantidade de parasitas que os cães apresentam na pele, comparativamente aos humanos<sup>6-9</sup>. A prevalência da leishmaniose visceral em cães de áreas endêmicas pode atingir 20,00 a 40,00 % da população<sup>4,7</sup>. Acredita-se que em áreas com alta infecção na espécie canina, a incidência na população humana varie de 1,00 a 2,00 %<sup>7,10</sup>.

O primeiro caso de leishmaniose visceral canina (LVC) no Estado de São Paulo foi diagnosticado em 1998 no município de Araçatuba, região noroeste do estado. A partir de então, o número de casos na região tem aumentado consideravelmente. De acordo com os dados da Direção Regional de Saúde, 41 municípios já apresentaram casos confirmados da doença, que está se disseminando para outras regiões do Estado com casos autóctones identificados na região metropolitana da cidade de São Paulo a partir do ano de 2005<sup>11,12</sup>.

Em virtude da variedade de sintomas da doença, o diagnóstico clínico da LVC é difícil, pois os achados clínicos são inespecíficos e sugestivos de outras enfermidades. Dessa forma, torna-se necessária a utilização de exames

laboratoriais para seu diagnóstico<sup>13,14</sup>.

A histopatologia pode ser utilizada para o diagnóstico da leishmaniose visceral através da detecção microscópica do parasita e caracterização de lesões teciduais decorrentes da presença do patógeno. No entanto, esta técnica apresenta algumas limitações, como a demora operacional e dificuldade de reconhecimento do parasita<sup>15</sup>. A técnica de imunohistoquímica (IHQ) baseia-se na detecção de antígenos in situ por meio da utilização de um anticorpo (policlonal ou monoclonal) primário, relativamente específico, e de um sistema de enzima e substrato cromógeno que se deposita no local da reação antígeno-anticorpo. O diagnóstico das leishmanioses depende do achado de estruturas coradas pelo cromógeno, de forma e de tamanho compatíveis com amastigotas<sup>16-20</sup>. Esta metodologia aumenta a possibilidade de detecção do parasita nos tecidos, principalmente quando a carga parasitária é baixa, e é plausível de ser implantada na rotina de diagnóstico laboratorial<sup>18-20</sup>.

O material para análise pode ser obtido por meio de excisão do fragmento tecidual por biópsia incisiva ou excisional ou, ainda, durante a necropsia do animal. Os tecidos mais comumente utilizados para realizar o diagnóstico de LVC em cães por meio de técnica de IHQ são o linfonodo poplíteo e a pele pela facilidade de efetuar a coleta de amostra in vivo. A pesquisa dos demais órgãos é importante, porém tratando-se de diagnóstico na rotina veterinária a biópsia representa uma técnica invasiva para órgãos internos como baço e fígado<sup>21</sup>.

Contudo, esta técnica apresenta vantagens como a possibilidade de realizar estudos retrospectivos com a amostra incluída em blocos de parafina, e a facilidade de manipulação do material a ser submetido ao exame, visto que este ao ser colocado em fixador adequado, pode-se dispensar os cuidados especiais como refrigeração (que é necessária para efetuar o isolamento em cultura). A aplicação dessa técnica facilita a busca ativa de cães, mesmo em áreas remotas, em que as amostras podem demorar a chegar ao laboratório. No entanto, o resultado do exame IHQ também é influenciado por diversos fatores pré- e pós-analíticos, como

na etapa inicial pela qualidade de fixação do espécime, na fase intermediária pela escolha dos anticorpos e pelas reações propriamente ditas, e na etapa final na interpretação de leitura das lâminas<sup>22-27</sup>. A produção de anticorpos anti-*Leishmania* spp. é uma etapa fundamental para realizar sua aplicação em técnicas imunológicas de diagnóstico. Outros autores já utilizaram soro hiperimune de coelho e de cão como anticorpo primário anti-*Leishmania* spp.<sup>14</sup> que pode influenciar nos parâmetros de sensibilidade e especificidade do teste. A IHQ é considerada complementar à histopatologia, pois apresenta boa especificidade e sensibilidade, de cerca de 60 a 70 %<sup>14,21</sup>.

Atualmente, o Ministério da Saúde inclui a IHQ como exame de referência para o diagnóstico de casos autóctones de LVC, sendo esta técnica parte do fluxograma de ações de controle e vigilância da enfermidade<sup>28</sup>. Desta maneira, é fundamental que os profissionais veterinários estejam atentos para casos suspeitos, e os laboratórios tenham seus protocolos padronizados e controlados em todas as etapas a fim de minimizar erros de interpretação<sup>16</sup>.

Este estudo tem como objetivo avaliar os resultados obtidos pela reação de IHQ para o diagnóstico de *Leishmania* spp. em amostras coletadas de cães.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram examinados 134 cães oriundos dos municípios de Votuporanga, Fernandópolis, Santa Fé do Sul, Valentim Gentil, Araçatuba, Bauru, Marília e Espírito Santo do Pinhal, em diferentes regiões do Estado de São Paulo, Brasil. Todos os animais foram sorologicamente positivos para leishmaniose visceral canina (LVC) pelo teste rápido TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina e Ensaio Imunoenzimático (EIE/Elisa) (Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), confirmados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e cultura para o diagnóstico de leishmaniose visceral conforme os protocolos padronizadas no Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz<sup>29</sup>. Todos os animais foram classificados como sintomáticos

para LVC segundo os critérios estabelecidos por Mancianti et al, 1988<sup>30</sup>.

Os cães foram eutanasiados conforme as recomendações do Guia Brasileiro de Boas Práticas para Eutanásia em Animais (CFMV, 2012), utilizando-se anestésico barbitúrico e, posteriormente, cloreto de potássio, ambos intravenosos em animais previamente sedados.

Os animais foram submetidos ao exame necroscópico no período de 2012 a 2015; e foram colhidos fragmentos de no máximo quatro cm<sup>3</sup> (2 cm x 2 cm x 1 cm) representativos dos seguintes órgãos: linfonodo, pulmão, coração, fígado, baço, rim, estômago, intestino, pâncreas, adrenal e pele com e sem lesão e bexiga urinária, no total de 1.164 amostras.

Os fragmentos teciduais foram imediatamente fixados em formalina a 10,00 % em solução tamponada de fosfato e, então, submetidos ao processamento histológico, inclusão em parafina e microtomia, para obtenção de três secções histológicas com espessura de 3 µm. Um corte de cada tecido foi corado com hematoxilina e eosina (HE). Outros dois cortes por lâmina foram submetidos à reação de IHQ, sendo um para efetuar a imunomarcagem e outro para controle negativo, seguindo-se o protocolo do Núcleo de Patologia Quantitativa do Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz. Destas amostras, 351 foram também processadas e analisadas em duplicadas com dois blocos distintos por órgão; e além das amostras citadas anteriormente foram incluídos ovário, testículo, útero, medula óssea e pele de dobra ungueal, a fim de avaliar a concordância e a representatividade necessária de fragmentos para obtenção dos resultados.

Para executar a reação de IHQ, os cortes histológicos foram desparafinizados, hidratados e submetidos à recuperação antigênica por meio de calor úmido sob pressão em tampão citrato 10 mM, pH 6,0 por três minutos. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com solução de peróxido de hidrogênio a 6,00 %. As lâminas foram incubadas, *overnight* a 4 °C, com anticorpo policlonal anti-*Leishmania* produzido em camundongo no Laboratório de Investigações Médicas (LIM-50/Faculdade de Medicina da

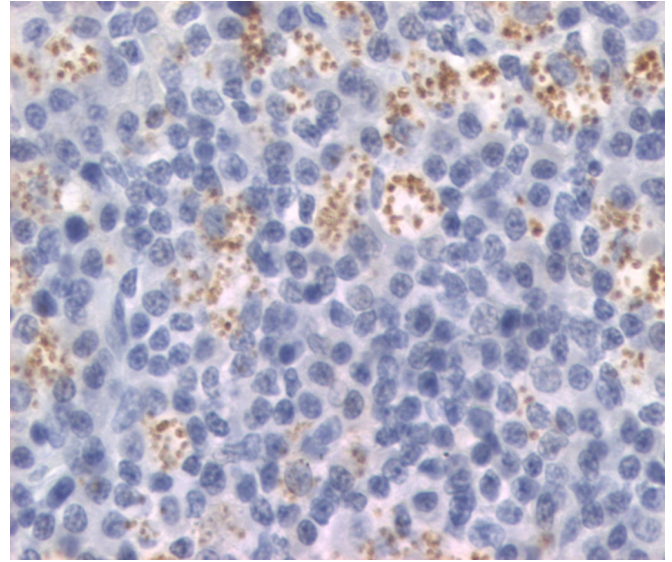
Universidade de São Paulo), e então lavadas com tampão PBS pH 7,4. Para estabelecer o título adequado do anticorpo primário a ser empregado no teste, foi realizada a titulação deste reagente. As diluições 1:2000, 1:3000 e 1:4000 do anticorpo primário foram testadas utilizando-se duas amostras de linfonodos caninos incluídos no trabalho, com resultados previamente confirmados por meio de sorologia e PCR para *Leishmania* spp. A melhor diluição desse anticorpo para ser empregado no teste de IHQ foi de 1:3000. Posteriormente, as lâminas foram incubadas com polímero de terceira geração marcada com imunoglobulinas e enzima peroxidase (SuperPicture, Life Technology®) durante 60 min a 37 °C. A revelação foi feita com diaminobenzidina (DAB) (Sigma®) em substrato cromogênico e contra-coloração com hematoxilina de Harris. Todas as lâminas foram analisadas por dois profissionais por meio de microscópio óptico Olympus CX22LED no aumento de 400x. A reação foi considerada positiva, quando se visualizou a imunomarcacão castanho-dourada de amastigotas teciduais, pela leitura feita em consenso pelos profissionais, ou negativa quando não foram observadas tais marcações (Figura 1). Como controle positivo foi empregada a mesma amostra da padronização do anticorpo. O controle negativo da reação foi realizado omitindo-se a adição de anticorpo primário em todas as amostras de linfonodo. Além disso, foram incluídos 10 amostras de linfonodos de cães com diagnóstico de linfoma, oriundas do município de São Paulo, e negativas para *Leishmania* spp. na sorologia e/ou PCR.

Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de animais do Instituto Adolfo Lutz (CEUA-IAL nº 03/2014).

Este trabalho teve o suporte financeiro da FAPESP sob nº 12/51267-4 e Chamamento Público –nº 20/2013 SVS/MS.

#### Análise estatística

As análises estatísticas e a elaboração de gráficos foram realizadas no *software* R ([www.rproject.org/](http://www.rproject.org/)) e *Excel* (Microsoft). As frequências absolutas e relativas foram calculadas e analisadas para todas as variáveis.



**Figura 1.** Fotomicrografia de linfonodo poplíteo de cão. Imunomarcacão para *Leishmania* spp. em tecido histológico, revelado com DAB e contra-corado com hematoxilina. Aumento de 400x

Foram realizados cálculos de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia, intervalo de confiança 95 %, efetuando-se análise comparativa entre o padrão de referência (testes sorológicos e PCR) e reação de IHQ. Para efetuar a comparação entre as frequências absolutas de positividade em cada tecido analisado entre os diferentes municípios foi utilizado o teste de Fisher com nível de significância de 5 %. Para avaliar a concordância entre as duplicatas de amostras, calculou-se o índice *Kappa* ( $\kappa$ ). O grau de concordância é considerado baixo quando o valor do *Kappa* é de 0 a 0,2; razoável de 0,21 a 0,4; moderado de 0,41 a 0,6; bom de 0,61 a 0,8; e muito bom de 0,8 a 1.

#### RESULTADOS

Por meio de reação de IHQ, 132 (98,51 %) dos 134 cães foram positivos para *Leishmania* spp. em pelo menos um dos órgãos estudados. Das 1.164 amostras, 573 (49,23 %) foram positivas na reação de IHQ (Figura 1). Nenhum dos dez cães com diagnóstico de linfoma demonstrou imunomarcacão positiva para *Leishmania* spp. A sensibilidade do teste IHQ foi de 98,51 %

(IC 95 % = 94,72; 99,59), a especificidade de 100,00 % (IC95 % = 97,17; 100), o valor preditivo positivo de 100,00 % (IC95 % = 97,17; 100), o valor preditivo negativo de 83,33 % (IC95 % = 55,20; 95,30) e a acurácia de 98,61 % (**Tabela 1**).

**Tabela 1.** Análise comparativa dos resultados obtidos da associação dos testes sorológico e parasitológico (PCR + cultura) com a reação de IHQ para o diagnóstico de leishmaniose visceral canina em amostras oriundas de diferentes tecidos

IHQ	Sorológico+PCR+cultura		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	132	0	132
Negativo	2	10	12
<b>Total</b>	134	10	144

Em relação às amostras de órgãos analisadas, 78,79 % das amostras de tecido esplênico analisadas exibiram imunomarcagem positiva, e este órgão apresentou a maior frequência de positividade entre os tecidos testados. No entanto, em amostras provenientes de quatro dos oito municípios analisados, o linfonodo poplíteo foi o tecido com maior taxa de positividade, variando de 50,00 a 100,00 %, porém com positividade total de 76,99 % (**Tabela 2**).

O terceiro órgão com maior positividade foi o fígado, (73,64 %) considerando todos os municípios, porém nas amostras provenientes dos municípios de Fernandópolis, Santa Fé do Sul Valentim Gentil, Araçatuba e Espírito Santo do Pinhal, esse órgão seguiu o baço em relação a frequência de positividade. A pele lesionada, com positividade de 65,45 %, foi o quarto tecido com maior taxa de positividade.

A adrenal, apesar de ser um tecido raramente analisado em cães com LVC, apresentou positividade em 49 (51,58 %) das 95 amostras. A pele macroscopicamente sadia foi o sexto órgão com maior representatividade, sendo positiva em 26 (45,61 %) das 57 amostras analisadas. Rim, pulmão, pâncreas, intestino, coração, bexiga urinária e estômago foram os

tecidos que apresentaram menor reatividade de 32,14 %, 25,25 %, 22,67 %, 37,21 %, 21,21 %, 10,53 % e 3,44 %, respectivamente.

A frequência relativa de resultados positivos no intestino exibiu diferença estatística ( $p=0,0045$ ) entre as amostras teciduais oriundas dos municípios estudados, com variação de resultados entre 10,00 % em Santa Fé do Sul e 51,14 % em Votuporanga. Nenhum outro tecido apresentou diferenças estatísticas quanto à positividade das amostras entre os diferentes municípios. Os achados no exame de IHQ estão apresentados na **Tabela 2**.

Em relação ao índice *Kappa* entre as duplicatas das amostras dos diferentes tecidos analisados, observou-se grau de concordância total muito bom; e as amostras de baço, fígado, pele em dobra ungueal e estômago apresentaram concordância de 1,000. Outros tecidos que apresentaram concordância muito boa foram o rim e o pâncreas. Linfonodo, pele, adrenal, pele sem lesão, pulmão e intestino revelaram índice *Kappa* menor do que 0,8, considerados bons. Apenas o coração exibiu índice *Kappa* de 0,402, e interpretado como moderado (**Tabela 3**).

**Tabela 3.** Valores de *Kappa* para avaliação da concordância entre os resultados detectados nas duplicatas de amostras na interpretação da reação de IHQ em diferentes amostras de tecidos coletadas de cães

Tecidos	Índice <i>Kappa</i> (IC95%)	Interpretação
Baço	1,000 (1,000-1,000)	Muito boa
Linfonodo	0,706 (0,315-1,000)	Boa
Fígado	1,000 (1,000-1,000)	Muito boa
Pele	0,667 (0,310-1,000)	Boa
Adrenal	0,723 (0,470-0,975)	Boa
Pele sem lesão	0,798 (0,532-1,000)	Boa
Rim	0,939 (0,820-1,000)	Muito boa
Pulmão	0,742 (0,463-1,000)	Boa
Pâncreas	0,901 (0,713-1,000)	Muito boa
Intestino	0,755 (0,502-1,000)	Boa
Coração	<b>0,402</b> (0,072-0,797)	Moderada
Pele em dobra ungueal	1,000 (1,000-1,000)	Muito boa
Estômago	1,000 (1,000-1,000)	Muito boa
<b>Total</b>	0,840 (0,793-0,897)	Muito boa

Legenda: IC= intervalo de confiança

\*Bexiga urinária, ovário, testículo, útero e medula óssea não foram calculados individualmente, devido à baixa representatividade amostral

**Tabela 2.** Distribuição da positividade na reação de IHQ para *Leishmania* spp. segundo a topografia tecidual em número absoluto (N), porcentagem (%) e valor de *p* nas amostras de tecidos de diferentes órgãos de cães provenientes de diferentes municípios do Estado de São Paulo

Tecidos	VOTU		FER		SF		VG		ATB		BRU		MAR		ESP		Total		Valor de <i>P</i>
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
Baço	40/48	83,33	12/19	63,19	15/19	78,94	3/4	75,00	1/3	33,33	11/13	84,62	14/14	100,00	8/12	66,67	104/132	78,79	0,06048
Linfonodo	32/41	78,05	11/15	73,33	6/12	50,00	3/3	100,00	3/5	60,00	10/12	83,33	13/14	92,86	9/11	81,82	87/113	76,99	0,2771
Fígado	35/46	76,09	15/21	71,43	10/15	66,67	4/5	80,00	2/5	40,00	9/12	75,00	12/14	85,71	8/11	72,73	95/129	73,64	0,6238
Pele com lesão	33/48	68,75	13/20	65,00	6/15	40,00	2/5	40,00	2/5	40,00	4/5	80,00	10/12	71,43	8/9	88,89	78/119	65,45	0,1088
Adrenal	24/44	54,55	10/19	52,63	4/11	36,36	2/2	100,00	2/5	40,00	---	---	7/14	50,00	---	---	49/95	51,58	0,7414
Pele sem lesão	17/34	50,00	7/13	53,85	0/5	0,00	---	---	2/5	40,00	---	---	---	---	---	---	26/57	45,61	0,1624
Rim	15/47	31,91	7/19	36,84	1/13	7,69	0/3	0,00	1/5	20,00	---	---	7/14	50,00	5/11	45,45	36/112	32,14	0,2069
Pulmão	14/47	29,79	2/18	11,11	4/15	26,67	---	---	1/5	20,00	---	---	4/14	28,57	---	---	25/99	25,25	0,6259
Pâncreas	7/27	25,93	3/16	18,75	2/14	14,29	---	---	1/4	25,00	---	---	4/14	28,57	---	---	17/75	22,67	0,8964
Intestino	24/42	57,14	4/15	23,53	1/10	10,00	---	---	1/5	20,00	---	---	2/14	14,29	---	---	32/86	37,21	<b>0,00455</b>
Coração	11/47	23,40	7/19	36,84	1/14	7,14	---	---	1/5	20,00	---	---	1/14	7,14	---	---	21/99	21,21	0,1935
Bexiga urinária	2/13	15,38	0/3	0,00	---	---	---	---	0/3	0,00	---	---	---	---	---	---	2/19	10,53	1,000
Estômago	0/8	0,00	0/4	0,00	0/1	0,00	---	---	0/2	0,00	---	---	1/14	7,14	---	---	1/29	3,44	1,000

Legenda: VOTU: Votuporanga; FER: Fermandópolis; SF: Santa Fé do Sul; VG: Valentim Gentil; ATB: Araçatuba; BRU: Bauru; MAR: Marília; ESP: Espírito Santo do Pinhal

## DISCUSSÃO

Neste estudo, a reação de IHQ apresentou boa sensibilidade (98,51 %), especificidade (100,00 %) e acurácia (98,61 %). Segundo Santos et al (2011)<sup>31</sup>, a IHQ mostra maior sensibilidade do que o exame histopatológico corado com HE e a citopatologia, provavelmente pela ocorrência de coloração amarronzada conferida pelo cromógeno empregado na técnica de IHQ. Esta característica possibilita a identificação da forma, localização e tamanho do parasita, e o alto grau de contraste que ocorre entre os parasitas e o tecido do hospedeiro torna o diagnóstico da LVC mais preciso<sup>17</sup>.

O baço exibiu a maior porcentagem de resultados positivos na IHQ, diferentemente dos dados descritos por outros autores na literatura que obtiveram taxas de 60,98 % e 69,57 %, respectivamente em cães com e sem sinais clínicos de LVC<sup>32</sup>, e de 75,00 % nos cães com LVC testados<sup>33</sup>, sendo que estas porcentagens ficam aquém dos resultados obtidos em linfonodos regionais nesses estudos. No entanto, amostras provenientes de quatro dos oito municípios estudados revelaram maior positividade em linfonodo poplíteo do que no baço, variando-se de 50,00 a 100,00 %. Os linfonodos têm sido apontados como órgãos de eleição para o diagnóstico de LVC por meio de IHQ; e há estudos que relatam boa sensibilidade de 65,85 % a 85,00 % na análise de animais sorologicamente positivos<sup>32-34</sup>.

O fígado tem revelado considerável variabilidade no diagnóstico de LVC, visto que Giunchetti et al.<sup>15</sup> obtiveram resultados de 25,00 a 65,00 % de positividade em cães sem e com manifestações clínicas, respectivamente. Moreira et al<sup>32</sup>, ao compararem os resultados da reação de IHQ na análise de amostras de fígado de cães com LVC, detectaram a positividade de somente 53,66 % em animais com sinais clínicos e de 56,52 % em aqueles sem sinais. Segundo Costardi<sup>33</sup>, a positividade foi de 60,00 % em animais assintomáticos e 75,00 % em sintomáticos. No presente trabalho, o fígado foi o tecido com terceira maior porcentagem de resultados positivos (73,64 %).

Em relação à pele, a positividade de 65,45 % nos tecidos com lesão e de 45,61 % em sem lesão na reação de IHQ, foi compatível com o percentual de 70,00 % detectado por Solano-Gallego et al<sup>19</sup>. Os dados também corroboram o achado de Queiroz et al<sup>35</sup>, que observaram reações positivas em 56,50 % de peles lesionadas e em 31,80 % de peles sadias.

Na glândula adrenal, 49 (51,58 %) dos 95 materiais analisados foram positivos para *Leishmania* spp. pela IHQ. A adrenal tem um papel essencial na resposta imune do organismo ao stress e a agentes infecciosos, uma vez que é praticamente a fonte exclusiva de corticosteróides<sup>36</sup>. Momo et al<sup>37</sup> demonstraram 17,78 % de positividade nas amostras estudadas, valores estes inferiores aos encontrados no presente estudo.

Os tecidos de rim, pulmão, pâncreas, intestino, coração, bexiga urinária e estômago revelaram baixa sensibilidade de 32,14 %, 25,25 %, 22,67 %, 37,21 %, 21,21 %, 10,53 % e 3,44 %, respectivamente. É interessante observar que houve diferença estatisticamente significativa entre a frequência relativa de positividade na IHQ nas amostras de intestino entre aquelas oriundas dos diferentes municípios estudados, sendo 10,00 % em Santa Fé do Sul e 51,14 % em Votuporanga. Estes achados ressaltam o amplo espectro de sinais e sintomas que a doença pode apresentar, e que implicam no seu diagnóstico.

Quanto ao índice *Kappa* para as duplicatas teciduais analisadas, notou-se o valor geral muito bom de 0,84. Os tecidos com maior índice de concordância foram de baço, fígado, rim e estômago; contudo, este último demonstrou baixa frequência de amostras positivas. O linfonodo e a pele revelaram grau de concordância bom, assim como adrenal, pulmão e intestino, apesar de alguns deles apresentarem baixa prevalência. Apenas o índice *Kappa* do coração foi interpretado como moderado, provavelmente pela baixa carga parasitária nos tecidos positivos, o que facilitaria a ocorrência de resultados falso-negativos na análise desse órgão. Estes valores indicam que apenas um fragmento representativo dos tecidos analisados seria suficiente para realizar o diagnóstico pela reação de IHQ, especialmente nos órgãos com elevada positividade, como baço e linfonodo.

## CONCLUSÃO

A reação de IHQ para o diagnóstico de *Leishmania* spp. foi padronizada e implantada com sucesso no Núcleo de Patologia Quantitativa do Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz. O baço e os linfonodos foram considerados os órgãos de eleição para realizar o procedimento analítico, sendo necessário apenas um único fragmento tecidual representativo da amostra a ser examinada.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo a Pesquisa (FAPESP) e ao Ministério da Saúde pelo suporte financeiro; aos colegas Carlos Roberto Elias, Edson Bueno dos Anjos, Élcio Sanches Esteves Júnior, Mileno Castro Tonissi, Fabiana Sisto Sandrin Giacometi, Vanessa Gusmon da Silva, Elaine Barbosa Oliveira pela colaboração.

## REFERÊNCIAS

1. Dantas-Torres F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the laws of nomenclature. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101:117-8. [DOI:10.1590/S0074-02762006000100024].
2. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2004;27:305-18. [DOI:10.1590/S0102-311X2008001200011].
3. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federativas, 1990 a 2011. 2012. [acesso 2015 Set. 15]. Disponível em: [http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/setembro/09/LV-Casos.pdf].
4. Slappendel RJ, Ferrer L. Leishmaniosis. *In*: Greene CE, editor. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Philadelphia: W.B. Saunders Co; 1990. p. 450- 8.
5. Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: desafios e perspectivas. *In*: Anais do I Congresso de Parasitologia Veterinária, Simpósio Latinoamericano de Rickettsioses. Ouro Preto, Minas Gerais; 2004.
6. Brasil. Ministério da Saúde. Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral (calazar). 2ª. ed. Brasília (DF): Fundação Nacional de Saúde; 1996.p.86.
7. Santa Rosa IC, Oliveira IC. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. *Clin Vet*. 1997;11:24-8.
8. Baneth G. Leishmaniasis. *In*: Greene CE, editor. *Infectious disease of dog and cat*. Georgia: Saunders Elsevier; 2006.p.685-98.
9. Scott WD, Miller WH, Griffin CE. Viral, rickettsial, and protozoal skin diseases. *In*: *Small Animal Dermatology*. Scott WD, Miller WH, Griffin CE, editors. WB Saunders, Philadelphia - PA: 2001. p. 522-4.
10. Campino LM. Canine reservoir and leishmaniasis: epidemiology and disease. *In*: Farrel JP. *Leishmania: world class parasites*. 2002, v.4, p.45-57.
11. Secretaria de Estado da Saúde (São Paulo – SP). Leishmaniose Visceral Americana: II Informe Técnico. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde, 2003. 48p.
12. Reichman MLAB. Leishmaniose visceral canina: uma zoonose reemergente. *In*: 1º Fórum sobre Leishmaniose visceral canina, Jaboticabal, SP; 2006.
13. Feitosa MM, Ikeda FA, Luvizotto MCR, Perri SH. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). *Clin Vet*. 2000;5(28);36-44.
14. Tafuri WL, Santos RL, Arantes RM, Gonçalves R, Melo MN, Michalick MSM. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *J Immunol Methods*. 2004;292:17-23. [DOI:10.1016/j.jim.2004.05.009].

15. Giunchetti RC, Mayrink, Genaro O, Carneiro CM, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA et al. Relationship between canine visceral leishmaniosis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. *J Comp Pathol*. 2006;135:100-07. [DOI:10.1016/j.jcpa.2006.06.005].
16. Ramos-Vara JA, Kiupel M, Baszler T, Bliven L, Brodersen BW, Chelack B. Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. *J Vet Diagn Invest*. 2008;20:393-413. [DOI: 10.1177/104063870802000401].
17. Ferrer L, Rabanal RM, Domingo M. Identification of *Leishmania donovani* amastigotes in canine tissues by immunoperoxidase staining. *Res Vet Sci*. 1988; 44(2):194-6.
18. Bourdoiseau G, Marchal T, Magnol JP. Immunohistochemical detection of *Leishmania infantum* in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of canine skin and lymph nodes. *J Vet Diagn Invest*. 1997; 2(9):439-40.
19. Solano-Gallego L, Fernández-Bellon H, Morell P, Fondevila D, Alberola J, Ramis A et al. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. *J Comp Pathol*. 2004;130(1):7-12. [DOI:10.1016/S0021-9975(03)00063-X].
20. Xavier SC, de Andrade HM, Monte SJH, Chiarelli IM, Lima WG, Michalick MSM, et al. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dog using histological, immunohistochemical and PCR methods. *BMC Vet Res*. 2006; 2(17):1-7. [DOI:10.1186/1746-6148-2-17].
21. Ordeix L, Solano-Gallego L, Fondevila D, Ferrer L, Fondati A. Papular dermatitis due to *Leishmania* spp. infection in dogs with parasite-specific cellular immune response. *Vet Dermatol*. 2005;16(3):187-19. [DOI: 10.1111/j.1365-3164.2005.00454.x].
22. Alves VAF. Garantia de qualidade em imuno-histoquímica. In: Alves VAF, Bacchi CE, Vassalo J. Manual de imuno-histoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia; 1999. p.1-9.
23. Jaffer S, Bleiweiss IJ. Beyond hematoxylin and eosin: the role of immunohistochemistry in surgical pathology. *Cancer Invest*. 2004;22(3):445-65. [DOI: 10.1081/CNV-200034896].
24. Leong ASY, Wright J. The contribution of immunohistochemical staining in tumor diagnosis. *Histopathol*. 1987;11(12):1295-305. [DOI:10.1111/j.1365-2559.1987.tb01874.x].
25. Rosai J. Special techniques in surgical pathology. In: Ackerman's Surgical Pathology. 8° ed. Nova York: Mosby-Year Book, 1996. p. 29-62.
26. Taylor CR, Cote RJ. Immunocytochemistry: a diagnostic tool for the surgical pathologist. In: Taylor CR, Cote RJ, editors. Major problems in pathology. Vol 19. 2° ed. Philadelphia: WB Saunders; 1994. p. 421-3.
27. Werner M, Chott A, Fabiano A, Battifora H. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol*. 2000;24(7):1016-9. [DOI:10.1097/00000478-200007000-00014].
28. Brasil. Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Algoritmo para confirmação de primeiro caso autóctone de leishmaniose visceral. Brasília, 2013.
29. Motoie G, Ferreira GE, Cupolillo E, Canavez F, Pereira-Chioccola VL. Spatial distribution and population genetics of *Leishmania infantum* genotypes in São Paulo State, Brazil, employing multilocus microsatellite typing directly in dog infected tissues. *Infect Genet Evol*. 2013;18:48-59. [DOI: 10.1016/j.meegid.2013.04.031].
30. Mancianti F, Gramiccia M, Gradoni L, Pieri S. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1988;82(4):566-7. [DOI:10.1016/00359203(88)90510-X].
31. Santos IB, Quintella LP, Madeira MF, Miranda LH, Silva DD, Schubach EY et al. Utilização da imunohistoquímica com soro hiperimune de coelho anti-*Leishmania chagasi* e anti-*Leishmania Viannia braziliensis* no diagnóstico das leishmanioses caninas no Rio de Janeiro – Brasil. Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária; outubro de 2008; Gramado – RS. [acesso 2015 agosto 06]. Disponível: [http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/].



32. Moreira MA, Luvizotto MC, Garcia JF, Corbett C, Laurenti MD. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of Leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Vet Parasitol*. 2007;145(3-4): 245-52. [DOI:10.1016/j.vetpar.2006.12.012].
33. Costardi ML. Imunohistoquímica em cães positivos para leishmaniose visceral [dissertação de mestrado]. Campo Grande (MS): Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2009.
34. Ciaramella P, Oliva G, Luna R, Gradoni L, Ambrosio R, Cortese L, et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec*. 1997;141(21):539-43. [DOI:10.1136/vr.141.21.539].
35. Queiroz NM, Assis J, Oliveira TM, Machado RZ, Nunes CM, Starke-Buzetti WA. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunohistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2010;19(1):32-8. [DOI:10.4322/rbpv.01901006].
36. Davies E, Mackenzie SM. Extra-adrenal production of corticosteroids. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2003;30(7):437-45. [acesso 2015 agosto 06]. Disponível: [<http://dx.doi.org/10.1046/j.1440-1681.2003.03867.x>]. [DOI:10.1046/j.1440-1681.2003.03867.x].
37. Momo C, Rocha NA, Moreira PR, Munari DP, Bomfim SE, Rozza DB, et al. Morphological changes and parasite load of the adrenal from dogs with visceral leishmaniasis. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2014;23(1):30-5. [DOI:10.1590/S1984-29612014004].



# Tuberculose pulmonar paucibacilar em Centros de Detenção Provisória

## Paucibacillary pulmonary tuberculosis in Provisional Detention Centers

RIALA6/1687

Maria Cecília CERGOLE-NOVELLA<sup>1\*</sup>, Andréia Moreira dos Santos CARMO<sup>1</sup>, Alexandra Alves dos Anjos REDONDARO<sup>1</sup>, Valéria dos Santos CANDIDO<sup>1</sup>, Mara Cristina de Souza BUZON<sup>1</sup>, Ana Paula da Cunha GONÇALVES<sup>1</sup>, Érica CHIMARA<sup>2</sup>, Regina Ruivo Ferro e SILVA<sup>1</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Centro de Laboratório Regional de Santo André, Instituto Adolfo Lutz. Avenida Ramiro Colleoni, 240, Vila Dora, Santo André, SP. CEP 09040-160. Tel: 11 4990 1267. E-mail: mcecilia@ial.sp.gov.br

<sup>2</sup>Centro de Bacteriologia, Instituto Adolfo Lutz. São Paulo, SP, Brasil

Recebido: 24.09.2015 - Aceito para publicação: 23.12.2015

### RESUMO

Cultura de micobactérias proporciona o crescimento de bacilos viáveis, mesmo presentes em escassa quantidade e não detectados pela baciloscopia. Neste estudo foram analisadas as amostras de escarro que apresentaram baciloscopia negativa e cultura positiva. As amostras foram coletadas de 2008 a 2013, de indivíduos detidos em Centros de Detenção Provisória de Santo André, Mauá e Diadema, Estado de São Paulo. As metodologias utilizadas foram baciloscopia por coloração Ziehl-Neelsen e cultura pelo Sistema BACTEC MGIT 960 e Ogawa-Kudoh. Dos 11.529 exames realizados, 221 (1,9 %) apresentaram baciloscopias negativas e culturas positivas. Dos 221 isolados, 166 (75,1 %) pertenciam ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, 21 (9,5 %) micobactérias não membros do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MNT), 33 (14,9 %) *Mycobacterium* sp e uma cultura mista do Complexo *M. tuberculosis* e *M. avium*. MNT mais frequentes foram *M. avium* (23,8 %) e *M. fortuitum* (19,0 %). A maioria dos isolados do Complexo *M. tuberculosis* (155/166 - 93,4 %) foi sensível aos antimicrobianos. Sete amostras apresentaram resistência à isoniazida e uma apresentou multirresistência à isoniazida e rifampicina. Este estudo mostra a importância da realização da cultura em escarros que apresentam baciloscopia negativa no diagnóstico da TB e micobacteriose. O tratamento tardio causa a continuidade da transmissão da doença e agravamento do quadro clínico.

**Palavras-chave.** tuberculose, prisões, baciloscopia, técnicas de cultura, escarro.

### ABSTRACT

Culture of mycobacteria induces the growth of viable bacillus occurring in small quantity, which are not detectable by bacilloscopy. This study aimed at identifying the mycobacteria isolates from sputum presenting negative bacilloscopy and positive culture. The samples were collected from 2008 to 2013 from criminals of Provisional Detention Centers in Santo André, Mauá and Diadema/SP. Smears were stained by Ziehl-Neelsen staining and the cultures were performed by the BACTEC MGIT 960 system and Ogawa-Kudoh culture medium. Of 11,529 isolates, 221 (1.9 %) showed negative bacilloscopy and positive cultures. Of 221 isolates, 166 (75.1 %) belonged to *Mycobacterium tuberculosis* complex, 21 (9.5 %) were nontuberculous mycobacteria (NTM), 33 (14.9 %) *Mycobacterium* sp, and one identified as a mixed culture of *M. tuberculosis* and *M. avium* complex. The most common NTM species were *M. avium* (23.8 %) and *M. fortuitum* (19.0 %). Most of the isolates (155/166-93.4 %) were susceptible to antimicrobial agents. Seven samples were resistant to isoniazid, and one presented multiresistance to isoniazid and rifampicin. This study shows the importance in performing sputum culture, when these samples are negative on bacilloscopy in diagnosing TB and mycobacteriosis. The treatment delay results in the maintenance of disease transmission and worsening of clinical symptoms.

**Keywords.** tuberculosis, prisons, smear, culture techniques, sputum.

## INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma doença pulmonar ou laríngea transmitida por via aérea em praticamente todos os casos<sup>1</sup>. Uma das medidas para o controle da tuberculose é a investigação de populações com elevado risco de contrair a doença, como as populações privadas de liberdade. Por causa das condições precárias dos centros de detenção e superpopulação de indivíduos privados de liberdade, muitos estudos são realizados na busca ativa de novos casos de tuberculose nessa população<sup>2-4</sup>. No Brasil, a tuberculose é a terceira doença infecciosa que mais leva ao óbito (4800 mortes/ano), 70 mil novos casos descritos no Global Tuberculosis Report 2015<sup>5</sup> e é uma doença endêmica nos presídios brasileiros<sup>6,7</sup>. No entanto, poucos são os estudos no Brasil sobre baciloscopia negativa e cultura positiva no diagnóstico da tuberculose transmitida por micobactérias pertencentes ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis* e da micobacteriose causada por micobactérias não membros do Complexo *M. tuberculosis* originando os termos micobactéria não tuberculosa (*nontuberculous mycobacteria*, MNT) e micobactéria outra não tuberculosa (*mycobacteria other than tuberculosis*, MOTT)<sup>8,9</sup>.

Pacientes imunocomprometidos e com baciloscopia negativa, apesar de constituir menor risco de transmissão e mortalidade, apresentam significativa proporção (50 – 71 %) que progride para doença ativa justificando o tratamento<sup>10</sup>. O diagnóstico da tuberculose e a inadequada detecção de novos casos em todo o mundo, especialmente na África e Ásia, são os maiores desafios em países de baixa e média renda<sup>11-13</sup>.

A baciloscopia permanece a mais acessível ferramenta no diagnóstico da doença ativa, porém a cultura é o método de referência padrão-ouro, sensível e específico para o diagnóstico da tuberculose e micobacteriose. Mesmo com o desenvolvimento de modernas técnicas de biologia molecular, nenhum método foi completamente eficiente para substituir a baciloscopia e o olhar do microbiologista<sup>6,7,14,15</sup>. O número mínimo de bacilos álcool-ácido resistentes necessários para produzir um esfregaço com resultado positivo tem sido estimado entre

5000 a 10000 por mililitro<sup>16</sup>, enquanto a detecção de bacilos pela cultura é de 10 a 100 bacilos cultiváveis por mililitro de escarro<sup>17,18</sup>. Devemos levar em consideração erros mais comuns na leitura das baciloscopias, que levam ao resultado falso negativo, como coleta e acondicionamento inadequados das amostras de escarro, utilização da porção não purulenta do escarro, esfregaço com pouca amostra, tempos incorretos nos procedimentos de coloração das lâminas, sobreposição e diminuição do número de campos lidos e até mesmo o uso de microscópio sem condições adequadas de uso e manutenção<sup>10,19</sup>.

A área de abrangência do Centro de Laboratório Regional do Instituto Adolfo Lutz de Santo André VIII (CLR-IAL Santo André) contempla sete municípios - Santo André, São Bernardo do Campo, São Caetano do Sul, Mauá, Ribeirão Pires, Rio Grande da Serra e Diadema com população total de 2.551.328 habitantes<sup>20</sup>. Nesses municípios há quatro Centros de Detenção Provisória (CDP), todos com superpopulação. O CLR-IAL Santo André realiza cultura de micobactérias isoladas do escarro de indivíduos privados de liberdade no ingresso ou sintomáticos dos CDP de três municípios - Santo André, Mauá e Diadema com superpopulação prisional de 2007 indivíduos e capacidade prisional de 535 indivíduos, 1512/624, e 1634/613, por município respectivamente (Fonte: Secretaria da Administração Penitenciária. SAP - <http://www.sap.sp.gov.br/> em 04/03/2015).

CDP é o presídio do sistema penitenciário destinado a custodiar as pessoas reclusas provisoriamente, enquanto aguardam sentença. A busca ativa de novos casos da tuberculose ocorre desde a admissão do indivíduo no CDP até o recebimento do alvará de soltura ou transferência para outro estabelecimento do sistema penitenciário.

Tendo em vista que nossa maior demanda de cultura de micobactérias vem dos CDP, que não há estudos realizados sobre tuberculose nesses centros e devido à detecção de casos de baciloscopia negativa com cultura positiva, o objetivo deste estudo foi avaliar escarros que apresentaram baciloscopia negativa e cultura positiva de indivíduos privados de liberdade em

Centros de Detenção Provisória dos municípios de Santo André, Mauá e Diadema no estado de São Paulo, entre 2008 e 2013.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostragem

Estudo descritivo utilizando dados da rotina laboratorial a partir de 11.529 amostras de escarros colhidas por expectoração espontânea matutina de indivíduos privados de liberdade (uma amostra de cada indivíduo) do sexo masculino no ingresso ou quando sintomáticos de três Centros de Detenção Provisória situados nos municípios de Mauá, Santo André e Diadema no Estado de São Paulo, Brasil no período de 01 de junho de 2008 a 31 de maio de 2013.

### Critérios de inclusão e exclusão

As amostras de escarros colhidas do mesmo indivíduo dentro de um intervalo de tempo de 15 dias foram consideradas diagnóstico e incluídas no estudo. As amostras de escarros colhidas do mesmo indivíduo em um espaço de tempo superior a 15 dias foram consideradas controle e excluídas do estudo.

### Baciloscopia

A confecção dos esfregaços de escarros, coloração pelo método de Ziehl-Neelsen e leitura das baciloscopias<sup>19</sup> foram realizados pelos Laboratórios Municipais da Rede do Programa de Controle da Tuberculose do Estado de São Paulo, os quais encaminharam os resultados ao CLR-IAL Santo André. A mesma amostra de escarro foi mantida a 4 °C e transportada ao CLR-IAL Santo André em caixa térmica, para realização da cultura.

### Cultura

As amostras de escarro foram tratadas segundo o método de Petroff modificado<sup>9</sup>. Após o tratamento, a amostra foi semeada em meio de cultura líquido Middlebrook 7H9 utilizando o Sistema BACTEC MGIT 960<sup>21</sup>. Para serem consideradas negativas, as culturas foram mantidas no equipamento por até 42 dias. Para volume de escarro inferior a 1 mL, foi usada a metodologia

de Ogawa-Kudoh<sup>22</sup>. Semanalmente as culturas foram observadas para verificar presença de crescimento. As culturas foram consideradas negativas quando nenhum crescimento foi observado na última leitura após 8 semanas de incubação<sup>19</sup>. A confirmação da presença de crescimento micobacteriano foi feita pela análise microscópica de uma lâmina confeccionada a partir da cultura positiva e corada pelo método de Ziehl Neelsen.

### Identificação

A identificação presuntiva foi realizada pela análise macroscópica da cultura (pigmento e morfologia de cultura) e morfologia microscópica dos bacilos. Os isolados com características pertencentes ao Complexo *M. tuberculosis*, fator corda positivo, com colônia acromógena, geralmente de cor creme, rugosa com aspecto de couve-flor foram submetidos ao teste de suscetibilidade aos fármacos antituberculose (TS) e teste de crescimento em presença de ácido p-nitrobenzóico (PNB). Os isolados sugestivos de MNT, com presença ou não de fator corda, apresentando colônias pigmentadas ou acromógenas, lisas ou rugosas, foram encaminhados ao IAL Central para identificação pelo método PRA-*hsp65* (*Polymerase Chain Reaction Restriction Analysis*)<sup>23,24</sup>.

### Teste de suscetibilidade (TS) do Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

Os testes foram realizados pelo Sistema BACTEC MGIT 960 Sensibilidade da Becton e Dickinson<sup>21</sup> com os isolados do Complexo *M. tuberculosis*, negativos para o teste de PNB, obtidos a partir do meio líquido ou sólido. Os fármacos liofilizados foram reconstituídos nas seguintes concentrações: estreptomicina (83 µg/mL), isoniazida (8,3 µg/mL), rifampicina (83 µg/mL) e etambutol (415 µg/mL). Em cada tubo de MGIT foram adicionados 800 µL de suplemento de crescimento (OADC) e 100 µL de cada fármaco chegando à concentração final de estreptomicina (1,0 µg/mL), isoniazida (0,1 µg/mL), rifampicina (1,0 µg/mL) e etambutol (5,0 µg/mL) e 500 µL do inóculo (suspensão bacteriana diluída 1:5). A cepa controle utilizada foi *M. tuberculosis* H37Ra.

## RESULTADOS

Foram processadas 11.529 amostras de escarros para baciloscopia e para cultura nos Laboratórios Municipais da Rede do Programa de Controle da Tuberculose do Estado de São Paulo e o CLR-IAL Santo André, respectivamente, no diagnóstico de novos casos de tuberculose e micobacteriose em indivíduos privados de liberdade (uma amostra de escarro para cada indivíduo) dos CDP de Mauá, Santo André e Diadema.

Durante os cinco anos do estudo, obtivemos baciloscopias negativas ou positivas com culturas negativas, positivas ou contaminadas. Dos 11.529 exames realizados, 221 (1,9 %) apresentaram baciloscopias negativas e culturas positivas, 168 (1,5 %) baciloscopias e culturas positivas, 31 baciloscopias sem resultados informados pelo respectivo Laboratório Municipal, mas com culturas positivas e 11.109 baciloscopias positivas ou negativas com culturas negativas ou contaminadas. Do total das 221 culturas positivas, 166 (75,1 %) foram identificadas como Complexo *M. tuberculosis* (Tabela 1). A maioria dos isolados do Complexo *M. tuberculosis* (155/166, 93,4 %) foi sensível aos antimicrobianos isoniazida, rifampicina, etambutol e estreptomicina. Dez (6 %) isolados apresentaram monorresistência à isoniazida,

rifampicina ou estreptomicina e um isolado (0,6 %) apresentou multirresistência à isoniazida e rifampicina. Nenhum isolado foi resistente ao etambutol (Tabela 1).

As demais culturas positivas foram identificadas como MNT (21/221, 9,5%), *Mycobacterium* sp (33/221, 14,9 %) e uma cultura mista contendo Complexo *M. tuberculosis* e *M. avium*. O menor percentual de MNT (9,5 %) encontrado no presente estudo em relação às amostras do Complexo *M. tuberculosis* (75,1 %) corrobora com o encontrado na literatura. Andrade e col<sup>25</sup> identificaram 9,1 e 91,9 % e Maurya e col<sup>26</sup> identificaram 27,3 e 72,7 % de MNT e Complexo *M. tuberculosis*, respectivamente em pacientes hospitalizados. As espécies de MNT mais frequentes foram *M. avium* (5/21, 23,8 %) e *M. fortuitum* (19,0 %) (Tabela 2). Dois isolados de MNT foram identificados somente pelo grupo, pois apresentaram padrão de PRA-*hsp65* não descrito no algoritmo padrão<sup>19</sup> e na literatura. Os isolados identificados somente ao nível de gênero apresentaram contaminação, não sendo possível chegar à identificação conclusiva (Tabela 2). Cinco das 221 (2,2 %) culturas foram isoladas de indivíduos portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), das quais quatro do Complexo *M. tuberculosis* sensíveis aos antimicrobianos testados e uma delas identificada como *M. fortuitum* (Tabelas 1 e 2).

**Tabela 1.** Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos dos isolados do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* provenientes de escarros de indivíduos privados de liberdade que apresentaram baciloscopia negativa e cultura positiva

Complexo <i>M. tuberculosis</i> n=166 (%)	Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos			
	Isoniazida	Rifampicina	Estreptomicina	Etambutol
155* (93,4)	S	S	S	S
1	S	S	R	S
7 (4,2)	R	S	S	S
2 (1,2)	S	R	S	S
1	R	R	S	S

\*quatro amostras foram isoladas de indivíduos portadores do HIV

**Tabela 2.** Frequência de crescimento de espécies não membros do Complexo *M. tuberculosis*, provenientes de escarros de indivíduos privados de liberdade que apresentaram baciloscopia negativa e cultura positiva

Micobactérias n = 55	Número de amostras (%)
Micobactérias não membros do Complexo <i>M. tuberculosis</i>	21 (38,2)
<i>Mycobacterium avium</i>	5 (23,8)
<i>Mycobacterium</i> crescimento rápido acromogena	1 (4,8)
<i>Mycobacterium</i> crescimento lento fotocromogena	1 (4,8)
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	4 (19,0) <sup>a</sup>
<i>Mycobacterium gordonae</i>	2 (9,4)
<i>Mycobacterium intracellulare</i> ou <i>M. chimaera</i>	1 (4,8)
<i>Mycobacterium kansasii</i>	3 (14,3)
<i>Mycobacterium lentiflavum</i> ou <i>M. parascrofulaceum</i>	3 (14,3)
<i>Mycobacterium mucogenicum</i>	1 (4,8)
Complexo <i>M. tuberculosis</i> e <i>Mycobacterium avium</i>	1 (1,8) <sup>b</sup>
<i>Mycobacterium</i> sp	33 (60,0)

<sup>a</sup> uma das amostras foi isolada de indivíduo portador do HIV

<sup>b</sup> cultura mista

## DISCUSSÃO

Apesar do aumento no número de casos novos no mundo, cerca 9 milhões, a taxa de incidência global vem diminuindo lentamente (menos de 1 % ao ano), sendo estimada uma taxa de 139 casos por 100 mil habitantes<sup>27</sup>. Em 2009 no Brasil, foram notificados 72 mil casos novos. O estado de São Paulo detecta o maior número absoluto de casos e o estado do Rio de Janeiro apresenta o maior coeficiente de incidência<sup>27</sup>. Um dos desafios para o controle da endemia é a elevada incidência entre populações de maior risco, entre elas a população prisional<sup>28</sup>, que contribuiu com 5 % dos casos notificados em 2008. No momento do ingresso no Sistema Penitenciário foi observado prevalência de 2,7 %<sup>29</sup>, avaliada por meio de inquérito radiológico, clínico e bacteriológico pela

baciloscopia, cultura do escarro e teste de sensibilidade<sup>27</sup>.

A realização da cultura, além de ser uma técnica sensível, permite o isolamento das colônias do Complexo *M. tuberculosis* e MNT utilizadas na identificação da espécie e teste de suscetibilidade aos fármacos antituberculose. No presente estudo, apesar do pequeno número de amostras de micobactérias isoladas dos escarros dos indivíduos que apresentaram baciloscopia negativa e cultura positivas (221/11529, 1,9 %), os resultados revelaram a presença de 166 micobactérias membros do Complexo *M. tuberculosis* e 21 MNT potencialmente patogênicas (*M. avium*, *M. fortuitum*, *M. intracellulare* e *M. kansasii*) (Tabelas 1 e 2). Este dado é relevante quando comparado ao número de amostras de escarros que apresentaram baciloscopias e culturas

positivas (168/11529, 1,5 %). De acordo com a Sociedade Americana Torácica, será considerado caso de micobacteriose o isolamento de MNT em mais de duas amostras de sítios não estéreis<sup>30</sup>. Salientamos que ao pesquisar o histórico dos respectivos 21 pacientes portadores de MNT, no Sistema de Controle de Pacientes com Tuberculose do Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo (TBWeb) e Sistema Integrado de Gestão Hospitalar (SIGH) não houve confirmação desses isolados de MNT em mais de uma amostra de escarro até o mês de abril de 2015. Para a caracterização de um caso de micobacteriose é necessário buscar no histórico clínico dos pacientes a confirmação de MNT positivo, pois é de extrema importância, principalmente em comunidades fechadas e imunodeprimidos, considerando ainda que as MNT são naturalmente resistentes a várias drogas<sup>31,32</sup>.

A observação, no presente estudo, da presença de quatro isolados do Complexo *M. tuberculosis* e um de MNT em indivíduos portadores do HIV (**Tabela 2**) mostra a importância da realização da cultura em indivíduos com baciloscopia negativa provenientes de populações de risco, sobretudo em ambientes de superpopulação. O resultado de baciloscopia negativa em casos de tuberculose e micobacteriose é observado em várias partes do mundo, retardam o tratamento e elevam a mortalidade, particularmente em pacientes imunocomprometidos, como na população com HIV<sup>33-35</sup>.

No Brasil, a realização do TS para o Complexo *M. tuberculosis* é recomendado para casos especiais como comunicantes de tuberculose resistente; pacientes com antecedentes de tratamento prévio, independentemente do tempo decorrido; pacientes imunodeprimidos, principalmente portadores do HIV; paciente com baciloscopia positiva no final do 2º mês de tratamento; falência ao tratamento antiTB; investigação de populações com maior risco de albergarem cepa do Complexo *M. tuberculosis* resistente (profissionais de saúde, população de

rua, privados de liberdade, pacientes internados em hospitais que não adotam medidas de biossegurança e instituições de longa permanência) ou com difícil abordagem subsequente (indígenas)<sup>27</sup>. Em estudo realizado em sistema prisional, foi relatado que o abandono do tratamento e os baixos índices de cura contribuem para emergir a resistência aos tuberculostáticos, tornando-se uma ameaça a qualquer tentativa de controle<sup>36</sup>. Este problema agrava ainda o fato de presídios funcionarem como reservatórios para a multirresistência às drogas antiTB (MRD-TB)<sup>37</sup>. Os testes de suscetibilidade realizados no presente estudo revelaram que 6,6 % (11/166) do total das amostras do Complexo *M. tuberculosis* foram resistentes aos antimicrobianos testados e multirresistência (resistência a pelo menos isoniazida e rifampicina) foi observada em um desses isolados. Esses dados corroboram com a literatura onde amostras do Complexo *M. tuberculosis* apresentaram resistência e/ou MRD-TB em amostras de escarros que apresentaram baciloscopia negativa ou positiva. Em 2012, a Organização Mundial de Saúde estimou incidência de multirresistência, ao menos a isoniazida e rifampicina, de aproximadamente 5,7 % nos casos de tuberculose no mundo<sup>38</sup>. Rusovich e col<sup>39</sup> relataram que dos 5377 casos de tuberculose registrados, 2960 (55 %) apresentaram baciloscopia negativa. Dos 2960, 1639 (55 %) eram cultura positiva, dos quais 768 (47 %) apresentaram multirresistência aos antimicrobianos testados.

Atualmente, testes rápidos moleculares para o diagnóstico da tuberculose podem detectar diretamente do escarro a presença do Complexo *M. tuberculosis* e resistência ao agente antimicrobiano rifampicina em até 2 horas<sup>40</sup>. Porém, a cultura continuará sendo realizada para possibilitar o cultivo do Complexo *M. tuberculosis* para a realização do TS ou identificação de amostras de MNT. Devemos salientar que, mesmo com o avanço tecnológico a cultura da micobactéria continuará sendo uma importante ferramenta no diagnóstico laboratorial das doenças causadas por micobactérias.

O presente estudo mostra a importância da cultura de amostras de casos que apresentam baciloscopia negativa no diagnóstico laboratorial da tuberculose ou micobacteriose. O emprego tardio do tratamento apropriado pode acarretar continuidade na transmissão da doença com agravamento do quadro clínico, principalmente em pacientes assintomáticos. A eficiência no diagnóstico da tuberculose nos Centros de Detenção Provisória de abrangência do CLR-IAL de Santo André é devida a diferentes ações que incluem a busca ativa permanente em conjunto com as Vigilâncias Epidemiológicas, Estadual e Municipal.

## REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Saúde. Manual de Recomendações para o Controle da tuberculose no Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Brasília. 2010.
2. Bergmann JS, Yuoh G, Fish G, Woods GL. Clinical evaluation of the enhanced Gen-Probe Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test for rapid diagnosis of tuberculosis in prison inmates. *J Clin Microbiol*. 1999;37:1419-25.
3. Banu S, Hossain A, Uddin MK, Uddin MR, Ahmed T, Khatun R, et al. Pulmonary tuberculosis and drug resistance in Dhaka central jail, the largest prison in Bangladesh. *PLoS One*. 2010;5:e10759. [DOI: 10.1371/journal.pone.0010759].
4. Chigbu LN, Iroegbu CU. Incidence and spread of *Mycobacterium tuberculosis*-associated infection among Aba Federal prison inmates in Nigeria. *J Health Popul Nutr*. 2010;28:327-32.
5. Global Tuberculosis Report. WHO/HTM/TB/2015.11. Geneva, World Health Organization, 2015.
6. Fournet N, Sanchez A, Massari V, Penna L, Natal S, Biondi E, et al. Development and evaluation of tuberculosis screening scores in Brazilian prisons. *Public Health*. 2006;120(10):976-83. [DOI: 10.1016/j.puhe.2006.06.004].
7. Sanchez A, Larouzé B, Espinola AB, Pires J, Capone D, Gerhardt G, et al. Screening for tuberculosis on admission to highly endemic prisons? The case of Rio de Janeiro State prisons. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2009;13:1247-52.
8. Falkinham JO 3rd. Epidemiology of Infection by Nontuberculous Mycobacteria. *Clin Microbiol Rev*. 1996; 9(2):177-215.
9. Maruthai K, Ravibalan T, Vallayachari K, Kesavan S, Samrot AV, Muthaiah M. Molecular typing and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates using Double Repetitive Element PCR and Duplex PCR. *Int J Mycobacteriol*. 2015;4(1):60-6. [DOI: 10.1016/j.ijmyco.2014.11.061].
10. Colebunders R, Bastian I. A review of the diagnosis and treatment of smear-negative pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2000;4(2):97-107.
11. Affolabi D, Akpona R, Odoun M, Alidjinou K, Wachinou P, Anagonou S, et al. Smear-negative, culture-positive pulmonary tuberculosis among patients with chronic cough in Cotonou, Benin. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2011;15(1):67-70.
12. Alavi-Naini R, Cuevas LE, Squire SB, Mohammadi M, Davoudikia AA. Clinical and laboratory diagnosis of the patients with sputum smear-negative pulmonary tuberculosis. *Arch Iran Med*. 2012;15(1):22-6. [DOI: 012151/AIM.007].
13. Assael R, Cervantes J, Barrera G. Smears and cultures for diagnosis of pulmonary tuberculosis in an asymptomatic immigrant population. *Int J Gen Med*. 2013;6:777-9. [DOI: 10.2147/IJGM.S48964].
14. Shah NS, Cavanaugh JS, Pratt R, Cain KP, Wells C, Laserson K, et al. Epidemiology of smear-negative pulmonary tuberculosis in the United States, 1993-2008. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2012;16(9):1234-40. [DOI: 10.5588/ijtld.11.0794].
15. Abebe G, Deribew A, Apers L, Abdissa A, Kiflie Y, Koole O, et al. Evaluation of the 2007 WHO guideline to diagnose smear negative tuberculosis in an urban hospital in Ethiopia. *BMC Infect Dis*. 2013;13:427. [DOI: 10.1186/1471-2334-13-427].



16. David HL. Bacteriology of mycobacterioses. US Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service, Communicable Disease Centre, Atlanta, USA, 1996.
17. Rieder HL, Van Deun A, Kam KM, Kim SJ, Chond TM, Trébucq A, et al. Priorities for Tuberculosis Bacteriology Services in Low-Income Countries. Second edition. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (The Union). Paris, France. 2007.
18. WHO/World Health Organization. Toman's Tuberculosis. Case detection, treatment, and monitoring. Questions and answers. 2nd edition. Edited by T. Frieden. WHO/ HTM/TB2004.334. Geneva, Switzerland. 2004.
19. Brasil. Ministério da Saúde. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília. Ministério da Saúde, 2008. 436 p. : il. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).
20. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. 2010. [acesso: 201 Set 30]. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/].
21. Becton Dickinson and Company. 7 Loveton Circle, Sparks, MD 21152 USA. Folheto da BD BBL™ MGIT™, versão: MAI\_08\_001.
22. Kudoh S, Kudoh T. A simple technique for culturing tubercle bacilli. *Bull World Health Organ*. 1974; 51(1): 71-82.
23. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol*. 1993;31(2):175-8.
24. Chimara E, Ferrazoli L, Ueky SY, Martins MC, Durham AM, Arbeit RD, et al. Reliable identification of mycobacterial species by PCR-restriction enzyme analysis (PRA)-*hsp65* in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA-*hsp65* patterns. *BMC Microbiol*. 2008;8:48. [DOI: 10.1186/1471-2180-8-48].
25. Andrade FEM, Londoño CA, Acevedo CS, Echeverri AQ, Montaña CEB, Navas MAM, et al. Características clínicas, factores de riesgo y perfil de susceptibilidad de las infecciones por micobacterias documentadas por cultivo, en un hospital universitario de alta complejidad en Medellín (Colombia). *Rev Chil Infectol*. 2014;31(6):735-42. [DOI: 10.4067/S0716-10182014000600015].
26. Maurya AK, Nag VL, Kant S, Kushwaha RAS, Kumar M, Singh AK, et al. Prevalence of Nontuberculous Mycobacteria among Extrapulmonary Tuberculosis Cases in Tertiary Care Centers in Northern India. *BioMed Res Int*. 2015;2015:465403. [DOI: 10.1155/2015/465403].
27. Brasil. Ministério da Saúde. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília : Ministério da Saúde, 2011. 284 p. : il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).
28. Oliveira LGD, Natal S, Camacho LAB. Análise da implantação do Programa de Controle da Tuberculose em unidades prisionais no Brasil. *Cad Saúde Pública*. 2015;31(3):543-54. [DOI: 10.1590/0102-311X00042914].
29. Sanchez A, Larouzé B, Espinola AB, Pires J, Capone D, Gerhardt G, et al. Screening for tuberculosis on admission to highly endemic prisons? The case of Rio de Janeiro State prisons. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2009;13(10):1247-52.
30. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007;175(4):367-416. [DOI: 10.1164/rccm.200604-571ST].
31. Gillespie SH. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: clinical and molecular perspective. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(2):267-74. [DOI: 10.1128/AAC.46.2.267-274.2002].

32. Aily DCG, Berra JAP, Brandão AP, Chimara E. Tuberculose, HIV e coinfeção por TB/HIV no Sistema Prisional de Itirapina, São Paulo, Brasil. *Rev Inst Adolfo Lutz*. São Paulo, 2013; 72(4):288-94.
33. Bicmen C, Gunduz AT, Coskun M, Senol G, Cirak AK, Ozsoz A. Molecular detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex and four clinically important non tuberculous mycobacterial species in smear-negative clinical samples by the genotype mycobacteria direct test. *J Clin Microbiol*. 2011;49(8):2874-8. [DOI: 10.1128/JCM.00612-11].
34. Ssengooba W, Kiwanuka N, Kateete DP, Katamba A, Joloba ML. Incremental yield of serial sputum cultures for diagnosis of tuberculosis among HIV infected smear negative pulmonary TB suspects in Kampala, Uganda. *PLoS One*. 2012;7(5):e37650. [DOI: 10.1371/journal.pone.0037650].
35. Kehinde Aderemi O, Dada-Adegbola H. Epidemiology of smear - negative tuberculosis in Ibadan, Nigeria. *Afr J Infect Dis*. 2013;7(1):14-7.
36. Oliveira HB, Cardoso JC. Tuberculosis among city jail inmates in Campinas, São Paulo, Brazil. *Rev Panam Salud Publica*. 2004;15(3):185-93. [DOI: 10.1590/S1020-49892004000300008].
37. O'Grady J, Maeurer M, Atun R, Abubakare I, Mwaba P, Bates M, et al. Tuberculosis in prisons: anatomy of global neglect. *Eur Respir J*. 2011;38(4):752-4. [DOI: 10.1183/09031936.00041211].
38. Global tuberculosis report. 2013. WHO/HTM/TB/2013.11. Geneva, World Health Organization, 2013.
39. Rusovich V, Kumar AM, Skrahina A, Hurevich H, Astrauko A, de Colombani P, et al. High time to use rapid tests to detect multidrug resistance in sputum smear-negative tuberculosis in Belarus. *Public Health Action*. 2014;4(4):243-8. [DOI: 10.5588/pha.14.0069].
40. Helb D, Jones M, Story E, Boehme C, Wallace E, Ho K, et al. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology. *J Clin Microbiol*. 2010; 48:229-37. [DOI: 10.1128/JCM.01463-09].



# Implantação de um método para determinação da atividade da transcetolase eritrocitária para avaliação indireta da tiamina

## Implementation of a method for determining the erythrocyte transketolase activity for indirect evaluation of thiamin

RIALA6/1688

Marilena OSHIRO\*, Karen MIGUITA

\*Endereço para correspondência: Núcleo de Hematologia e Bioquímica, Centro de Patologia, Instituto Adolfo Lutz. Av. Dr. Arnaldo, 355, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 01246-902. Tel: 11 3068 2873. E-mail: maoshiro@ial.sp.gov.br

Recebido: 13.11.2015 - Aceito para publicação: 14.03.2016

### RESUMO

O teste de ativação da transcetolase eritrocitária (TK-E) pelo pirofosfato de tiamina (TPP) exógeno é um método indireto para mensurar a tiamina (vitamina B1). A diminuição da atividade da transcetolase eritrocitária e o aumento da estimulação *in vitro* com o TPP maior do que 17 % indicam deficiência de tiamina. Este é um método plausível, pois são nos eritrócitos que estão concentradas a maior parte desta vitamina. Em virtude de surtos de beribéri que tem ocorrido no Brasil desde 2006, o Instituto Adolfo Lutz (IAL), como Laboratório Central de Saúde Pública, propôs a implantação desse método para auxiliar na investigação de novos surtos ou de casos isolados. Foram avaliados o teste de precisão, a linearidade, a estabilidade do hemolisado e da amostra, e estimados os limites de detecção e de quantificação. A atividade da TK-E sem ativação pelo TPP foi de 0,732 UI/gHb e com ativação foi de 0,827 UI/gHb. Todos os resultados dos parâmetros avaliados neste estudo apresentaram-se dentro dos critérios de aceitabilidade garantindo-se a confiabilidade do método. Fica, assim, disponível mais um ensaio bioquímico para a Rede Pública de Saúde, mas ainda necessário definir os valores de referência para estabelecer os limites clínicos da deficiência de tiamina.

**Palavras-chave.** transcetolase, tiamina, diagnóstico, beriberi.

### ABSTRACT

Erythrocyte transketolase activation test (TK-E) by exogenous thiamine pyrophosphate (TPP) is an indirect method to measure thiamine (vitamin B1). The decrease in the erythrocyte transketolase activity and the increase of *in vitro* stimulation with TPP greater than 17 % indicate thiamine deficiency. It is a reasonable method as the major portion of this vitamin are concentrated in erythrocytes. Due to the beriberi outbreaks that have occurred in Brazil since 2006, the Adolfo Lutz Institute (IAL), as a Central Public Health Laboratory, proposed the implementation of this method to give support to the investigation on the new outbreaks or isolated cases. The evaluated parameters were precision, linearity, hemolysate and sample stability, and the limits of detection and quantification were estimated. The TK-E activity without activation by TPP was 0.732 UI/gHb, and with activation was 0.827 UI/gHb. All of the results obtained from the evaluated parameters showed to be within the eligibility criteria, ensuring the reliability of the proposed methods. Thus, this method showed to be adequate as biochemical assay for the Public Health Network. However, there is a need to define the reference values to establish the clinical limits of thiamine deficiency.

**Keywords.** transketolase, thiamine, diagnosis, beriberi.

## INTRODUÇÃO

Existem enzimas nos glóbulos vermelhos que são dependentes de vitaminas e suas atividades são correlacionadas para avaliar o estado nutricional dessas vitaminas<sup>1</sup>, a transcetolase eritrocitária (TK-E) é um exemplo. Utiliza como cofator o pirofosfato de tiamina (TPP), a forma biologicamente ativa da tiamina (vitamina B1)<sup>2</sup>. Esta enzima atua amplamente no ciclo das pentoses contribuindo na formação do NADPH<sup>3</sup>, coenzima importante no restabelecimento da glutathione na sua forma reduzida<sup>2</sup> e, também, participa na síntese de nucleotídeos e ácidos nucleicos<sup>3</sup>. Como o ciclo das pentoses é mais ativo nos glóbulos vermelhos e aproximadamente 80 % da tiamina se encontram neles<sup>4,5</sup>, é sensato utilizar a atividade da transcetolase nestas células como marcador das alterações metabólicas da tiamina<sup>6,7</sup>.

O teste de ativação da transcetolase eritrocitária pelo TPP exógeno é um método indireto de mensurar a tiamina<sup>5</sup>. A diminuição da atividade da transcetolase eritrocitária e o aumento da estimulação *in vitro* com o TPP maior que 17 % indicam deficiência de tiamina<sup>7</sup>.

O beribéri é uma doença causada por deficiência de tiamina caracterizada por manifestações neurológicas e cardiovasculares<sup>8,9</sup>. Casos extremos de deficiência podem afetar o coração, dando origem a uma cardiomiopatia por deficiência nutricional, conhecida como beribéri cardíaca ou afetar o sistema nervoso central, provocando a encefalopatia de Wernicke que se caracteriza por confusão mental, oftalmoplegia e taxia podendo evoluir para o coma e morte<sup>9,10</sup>. A deficiência também tem sido relatada como causa de hipertensão pulmonar<sup>11</sup> e de perda visual devido a neuropatia óptica<sup>12</sup>.

A deficiência de tiamina quando não está associada à carência alimentar, pode estar relacionada com o aumento de demandas metabólicas ou situações que interferem na sua biodisponibilidade<sup>4</sup>. É comum encontrar a deficiência em etilista crônico, pacientes com anorexia nervosa<sup>13</sup>, doenças gastrointestinais associadas com diarreia crônica e vômitos frequentes<sup>14</sup>, pacientes submetidos à cirurgia

gástrica<sup>15</sup> ou intestinal<sup>14</sup> e nos cardiopatas<sup>16</sup>.

Em 2012, o Ministério da Saúde publicou o “Guia de consulta para Vigilância Epidemiológica, Assistência e Atenção Nutricional dos casos de Beribéri”, em vista das notificações de beribéri ocorridas nos estados do Maranhão, Tocantins e Roraima. Até então, não se tinha registro de surto no país há mais de oitenta anos<sup>4</sup>.

A tiamina pode ser avaliada no sangue ou na urina. Porém, estes exames não estão disponíveis no Sistema Único de Saúde<sup>4</sup>, sendo raro encontrar em outros serviços<sup>13</sup>.

Assim, o objetivo deste estudo foi implantar a metodologia que determinasse a atividade enzimática da transcetolase eritrocitária com e sem a estimulação do TPP exógeno, para ser utilizada como indicador do estado nutricional quanto à tiamina, disponibilizando mais um exame específico para a Rede Pública de Saúde.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi conduzido dentro dos padrões exigidos pela Resolução 466 de 12/12/2012 do Ministério da Saúde / Conselho Nacional da Saúde, e teve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto Adolfo Lutz, Protocolo nº 035/2009 emitida em 24/11/2009.

As amostras de sangue foram obtidas de voluntários, após concordarem e assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Foram utilizados para coleta tubos a vácuo contendo anticoagulante K<sub>3</sub>EDTA. As amostras foram armazenadas em temperatura entre 4 e 8 °C até o momento da análise.

### Preparo do hemolisado

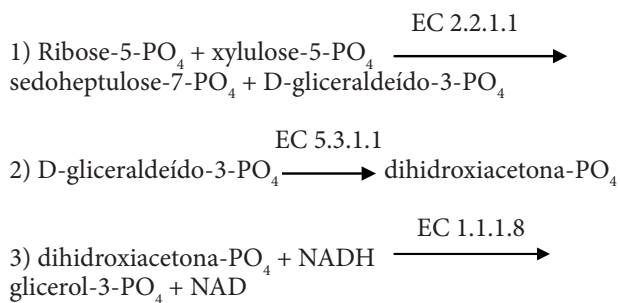
As amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 2.500 rpm em temperatura de 8 °C, e o plasma e a camada de leucócitos foram descartados. As hemácias foram submetidas a três lavagens sucessivas com solução de NaCl 0,9 % gelada, o sobrenadante e a camada de leucócitos foram descartadas em cada ciclo. Os hemolisados foram preparados adicionando-se água bi-destilada nas hemácias lavadas na proporção de 2:1 (hemácias: água).

Em seguida, foram submetidas ao congelamento e descongelamento por duas vezes para assegurar total hemólise. As concentrações de hemoglobina foram ajustadas para ficarem entre 3,5 a 4 g/dL com solução Tris-HCl 0,1 M pH 7,6 + Triton X-100 (na proporção 1:100). Foram centrifugados por 10 minutos a 3.000 rpm e o sobrenadante separado e mantido entre 4 a 8 °C até o momento da análise. A concentração de hemoglobina foi determinada em contador hematológico automatizado.

### Atividade da TK-E com e sem o TPP

O método para a determinação da atividade da TK-E com e sem TPP foi realizada conforme Bayoumi e Rosalki<sup>1</sup> com algumas modificações. O sistema reagente utiliza a nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH), que absorve luz no comprimento de onda de 340nm. A variação de absorbância por minuto obtida pela oxidação da coenzima NADH a NAD, reflete diretamente a atividade da transcetolase.

As sequências das reações estão abaixo descritas:



EC 2.2.1.1 = Transcetolase  
 EC 5.3.1.1 = Triosefosfato isomerase  
 EC 1.1.1.8 = Glicerol-3-fosfato desidrogenase

Soluções	Sem TPP	Com TPP
	µl	µl
Tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,6	50	0
Ribose-5-fosfato 15mM	915	915
Hemolisado	20	20
GDH/TPI (7kU/L - 1800kU/L)	5	5
TPP 10mM	0	50
Incubar 15 minutos a 37 °C		
NADH 10 mM	10	10
Leitura 10 minutos a 37 °C		

$$\text{Cálculo: } \frac{\Delta\text{DO} \times 10^5}{E \times \text{Hb} \times 20} = \text{UI/gHb. min. a } 37^\circ\text{C}$$

$\Delta\text{DO}$  = Variação da densidade ótica por minuto  
 $10^5$  = Correção da unidade da hemoglobina  
 $E$  = Coeficiente de extinção molar da coenzima NAD ( 6,22 )  
 $\text{Hb}$  = Concentração da hemoglobina no hemolisado  
 $20$  = volume da amostra

As soluções de Ribose-5-fosfato (Sigma) 15mM, o TPP (Sigma) 10mM e NADH (Sigma) 10mM foram preparados com Tampão Tris-HCl 0,1M, pH 7,6. Todos foram preparados no dia do uso e mantidos na temperatura entre 4 e 8 °C. A enzima GDH/TPI (Sigma) estava pronta para o uso, sem necessidade prévia de diluição, porém foi mantida na temperatura constante entre 4 e 8 °C.

A porcentagem de Ativação foi obtida através da seguinte equação:

$$\% \text{ ativação} = \frac{\text{TK-E c/ TPP} - \text{TK-E s/ TPP}}{\text{TK-E s/ TPP}} \times 100$$

### Métodos estatísticos

Além da análise descritiva como média, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), valores mínimos e máximos e limite de repetibilidade (Lrepê), foram utilizados outros métodos conforme o propósito de cada estudo: teste de normalidade (Anderson Darling); avaliação das variâncias (Cochran, Levene ou Bartlett); análise de comparabilidade (ANOVA), Teste F e t de Student; avaliação de linearidade (Regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, polinômio linear e quadrática).

Foi utilizado nível de confiança de 95 %.

### RESULTADOS

Para confirmar que este método implantado atende aos propósitos, foram realizados alguns experimentos de validação, conforme orientações DOQ-CGCRE-008/2011<sup>17</sup>, RDC n°27/2012-ANVISA/MS<sup>18</sup> e Oliveira e Mendes<sup>19</sup>, quando aplicáveis.

### Avaliação da precisão

Primeiramente, foi realizado um estudo preliminar de precisão para identificar discrepâncias frente o esperado e, se fosse necessário, fazer ajustes no sistema antes de prosseguir com estudos mais completos. Desta forma, foram avaliadas três amostras com atividades enzimáticas diferentes da TK-E, analisadas por sistema de repetitividade, ou seja, as oito medições de cada amostra foram realizadas no mesmo dia e sem alterações de local, equipamento, reagentes e do técnico. Os resultados estão consignados na **Tabela 1**.

Neste estudo preliminar foi possível verificar que o método apresentou um CV médio de 6,67 %. E, pela semelhança dos CVs apresentados nas três amostras, podemos

concluir que a imprecisão é constante não variando em diferentes níveis de atividade enzimática.

O limite de repetitividade (Lrepê) obtido neste estudo foi utilizado para identificar valores discrepantes ou *outliers* nos demais experimentos. É a diferença máxima permitida entre um par de replicatas de cada corrida, tendo o cuidado de não rejeitar mais de 5 % das análises<sup>19</sup>.

A precisão intermediária ou interensaio foi realizada em duas amostras com níveis de atividade enzimática diferentes, porém previamente conhecido. Cada amostra foi dividida em quatro partes e analisada diariamente em duplicata por cinco dias. Os resultados estão consignados na **Tabela 2**.

**Tabela 1.** Estudo preliminar intraensaio

Replicatas	TK-E sem TPP em UI/gHb			TK-E com TPP em UI/gHb		
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
1	0,59	0,94	1,19	0,68	1,16	1,3
2	0,63	0,81	1,06	0,7	1,02	1,12
3	0,52	0,9	1,18	0,74	0,98	1,29
4	0,62	0,85	1,02	0,6	1,09	1,24
5	0,57	0,93	1,22	0,66	1,06	1,28
6	0,58	0,94	1,16	0,72	1,15	1,29
7	0,52	0,83	1,18	0,7	1,02	1,14
8	0,61	0,96	1,04	0,64	0,98	1,16
Média	0,58	0,895	1,131	0,68	1,058	1,228
DP	0,042	0,057	0,078	0,045	0,071	0,075
CV %	7,257	6,405	6,903	6,67	6,682	6,139
Lrepê*	0,118	0,16	0,219	0,127	0,198	0,211

Lrepê\*: desvio padrão x 2,8 (para duplicata e nível de confiança de 95 %)

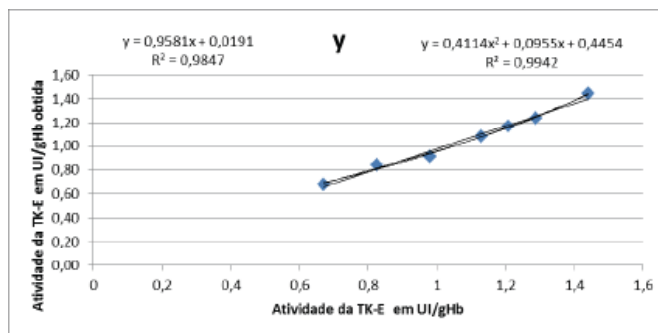
**Tabela 2.** Resumo estatístico do estudo de precisão completa

Parâmetros analisados	TK-E sem TPP		TK-E com TPP	
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1	Amostra 2
Média	0,58	0,85	0,67	1,11
DP intraensaio	0,04	0,06	0,05	0,06
CV % intraensaio	6,74	6,95	6,8	5,13
DP interensaio	0,02	0,03	0,02	0,04
CV % interensaio	3,79	4,06	2,72	3,22
DP total	0,04	0,06	0,04	0,06
CV % total	6,96	7,26	6,48	5,49
Erro aleatório total	11,0 %	12,0 %	11,0 %	9,0 %
Critério de aceitabilidade entre replicatas	0,12	0,16	0,13	0,2

**Linearidade**

O estudo da linearidade teve como objetivo verificar se o método tem a capacidade de demonstrar que os resultados obtidos são proporcionais à concentração, dentro de um intervalo específico (Figura 1). Foram realizadas diluições seriadas de uma amostra com atividade alta (obtida com acréscimo de TK) e uma amostra com atividade baixa, resultando em 7 amostras. Cada amostra foi analisada três vezes. Aos resultados obtidos foram aplicados testes estatísticos. A homocedasticidade das variâncias foi comprovada através do teste de Cochran, o C calculado de 0,287 foi menor do que o C tabelado 0,561 ( triplicata em sete níveis de concentração, em nível de confiança de 95 %). Através da análise de regressão linear e ANOVA foi possível observar que a regressão foi significativa ( $p < 0,05$ ), porém os desvios de

linearidade de todas as concentrações foram menores que 5 % quando comparado com a regressão polinomial de 2º grau (regressão quadrática), desconsiderando a relevância da não linearidade detectada. O coeficiente de correlação de Pearson(r) foi de 0,9923.



**Figura 1.** Gráfico da linearidade com as equações polinomiais de 1º e 2º graus

### Limite de detecção e de quantificação

A determinação do limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foi estimada através das equações: LD = média + tDP e LQ = média + 10DP, onde *t* (Student) com nível de confiança de 95 % e DP é o desvio padrão. Os resultados estão representados na **Tabela 3**.

**Tabela 3.** Limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

	LD	LQ
TK-E s/TPP	0,091	0,296
TK-E c/TPP	0,121	0,398

### Estabilidade

A estabilidade do hemolisado foi conferida através da avaliação de sete amostras distintas com quatro replicações em cada amostra. Os hemolisados foram analisados no dia do preparo e no dia seguinte. Foram mantidas por 24 horas em temperatura entre 4 a 8 °C (geladeira) e entre -16 e -20 °C (freezer). A comparação entre os valores do dia e do posterior, nas sete amostras, revelou que a TK-E é estável nos hemolisados, sejam armazenados em geladeira ou no freezer. O resultado estatístico demonstrou não haver diferenças significativas ao nível de confiança de 95 % ( $p>0,05$ ).

### Temporalidade

A temporalidade das amostras foi definida juntamente com a precisão intermediária quando as amostras foram analisadas por cinco dias consecutivos, armazenadas em temperatura entre 4 e 8 °C. A diferença percentual da perda de atividade enzimática entre os valores obtidos no primeiro dia e no quinto dia foi em torno de 7,9 % para a TK-E sem TPP e de 6,2 % para a TK-E com TPP. O método foi testado em 21 amostras obtidas de voluntários saudáveis, sem uso de complementos vitamínicos. Os dados obtidos apresentaram distribuição gaussiana pelo teste de Anderson Darling ( $p>0,05$ ). A **Tabela 4** consigna os dados estatísticos desses voluntários.

**Tabela 4.** Resumo estatístico dos valores obtidos das amostras de 21 indivíduos normais

Parâmetro	TK sem TPP UI/gHb	TK com TPP UI/gHb	% estimulação
Média	0,732	0,827	12,98
Desvio Padrão	0,113	0,136	3,48
Valor mínimo	0,57	0,63	5,97
Valor máximo	0,973	1,16	21,84

## DISCUSSÃO

Quando surgiram os primeiros surtos de beribéri em 2006, no estado do Maranhão, não havia nenhum laboratório público que pudesse avaliar a tiamina daquela comunidade, incluindo o IAL. Foi assim que surgiu este estudo para implantação do método da análise da atividade da transcetolase eritrocitária com e sem estímulo pelo TPP. Um método indireto, porém adequado para o propósito, uma vez que as hemácias são as primeiras células a serem afetadas pela depleção vitamínica<sup>20</sup>.

O método escolhido foi o proposto por Bayomi e Rosalki em 1976<sup>1</sup>. Para avaliá-lo foi necessário realizar estudo de validação. Ele comprova através de evidências objetivas alguns requisitos básicos que garantem a confiabilidade dos resultados.

O primeiro passo foi verificar a precisão do método. É importante salientar que toda medição analítica agrega um percentual de variação, o qual é conhecido como “erro”. Este “erro” pode ser de ocorrência casual ou acidental, chamado de erro aleatório. Neste estudo, o erro aleatório total ficou em torno de 11,5 % para a TK-E sem adição de TPP e de 10 % para a TK-E com adição de TPP, dentro do recomendado pela ANVISA<sup>18</sup> o qual se permite até 15 % para as imprecisões.

A imprecisão intraensaio encontrada ficou entre 6 e 7 %, uma estimativa bastante razoável em se tratando de enzimas. Este achado está em consonância com dados do laboratório de Cambridge onde o CV deles fica entre 5,1 a 7,7 %<sup>21</sup>, utilizando metodologia semelhante.



A exatidão não pôde ser avaliada conforme exigido pelas normas da qualidade por não haver amostras de referência e nem ter como comparar com outro método. Porém, a média da atividade da TK-E do grupo de voluntários saudáveis foi de 0,732 UI/gHb, com desvio padrão de 0,113 UI/gHb, próximos ao valor médio de 0,77 UI/gHb encontrados por Smeets et al<sup>22</sup> em doadores de sangue e, dentro do intervalo de 0,514 a 0,739 UI/gHb, encontrado por Waring et al<sup>23</sup> obtidos, também, em doadores de sangue de ambos os sexos. Ambos utilizaram metodologia similar ao deste trabalho. Valores mais baixos foram encontrados em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 com neuropatia<sup>6</sup>.

Valor de referência para indivíduos normais podem diferir de um laboratório para outro, mesmo que ambos utilizem o mesmo método. As variações pré-analíticas, variações analíticas e as variações biológicas inter-indivíduos são os fatores que podem influenciar nessas diferenças. Por isso, é recomendado que cada laboratório determine o seu próprio valor de referência com as incertezas associadas. No presente estudo, a média obtida no grupo de voluntários não pode ser utilizada para esta finalidade devido ao número pequeno de voluntários.

A estabilidade da atividade da TK-E no hemolisado foi verificada. Observou-se que se manteve estável por até 24 horas, quando conservado em temperatura de geladeira ou congelado. Smeets et al<sup>22</sup> descreve que não há perda de atividade da TK-E por quatro semanas nos hemolisados armazenados a -20 °C. Porém, se forem congelados e descongelados por duas vezes poderá haver perda significativa da atividade enzimática.

A maioria das enzimas presentes no glóbulo vermelho é mais estável quando estão no sangue total do que quando as células são lavadas ou congeladas<sup>24</sup>. Esta estabilidade foi conferida por até cinco dias no sangue total, conteúdo anticoagulante EDTA e armazenada em temperatura entre 4 e 8 °C. Ao final de cinco dias, verificou-se uma diminuição da atividade enzimática próxima de 8 %. Beutler<sup>24</sup> define para várias enzimas eritrocitárias uma estabilidade

de 20 dias com perda de atividade <10 %, nas mesmas condições. Soukalon et al<sup>21</sup> mantiveram os glóbulos vermelhos lavados e congelados a -30 °C por até 3 meses para avaliar a TK-E.

A avaliação da transcetolase eritrocitária não é comum na prática clínica e, portanto não há muitas informações sobre o desempenho do método analítico na literatura para comparação. Desta forma, todos os dados obtidos neste estudo poderão ser utilizados como indicadores nas especificações da qualidade, visto que eles ficaram dentro dos limites aceitáveis determinadas pelas normas regulamentadoras como a RDC nº 27/2012 da ANVISA<sup>18</sup>.

O beribéri tem sido um importante problema de saúde pública<sup>4</sup>. E, o agente causador nem sempre é a carência alimentar da tiamina. Existem outros mecanismos que podem levar à deficiência. Por exemplo, a suspeita da causa do surto ocorrido no estado do Maranhão foi a contaminação do arroz pelo fungo *Penicillium citreonigrum*<sup>25</sup>, que produz a micotoxina citreoviridina, a qual degrada a tiamina. Existem, também, as tiaminases presentes em alguns alimentos como peixe, crustáceos e chá, ou produzidas por algumas bactérias como *Clostridium botulium*<sup>26</sup>, que age da mesma forma sob a tiamina.

Publicações recentes têm relatado casos de beribéri em pacientes com uso prolongado de diuréticos<sup>27</sup> e muitos casos graves após cirurgia bariátrica<sup>3,10,15</sup>.

A deficiência de tiamina não é uma condição rara<sup>13</sup>. Ela pode estar presente em 40 % dos casos de neuropatia após a cirurgia bariátrica<sup>9</sup>; nos pacientes cardíacos, Cunha et al<sup>16</sup> encontraram deficiência em 33 %; nos pacientes com anorexia nervosa 38 %<sup>28</sup>, nos hospitalizados ficam entre 10 a 20 %<sup>13</sup>.

Apesar do diagnóstico de beribéri ser basicamente clínico<sup>13</sup> e o tratamento ser feito com reposição de tiamina<sup>4</sup>, a avaliação do estado nutricional através da atividade da TK-E poderá não só contribuir na etiologia da doença, como também evidenciar o nível da vitamina em várias situações clínicas suspeitas, bem como na realização de estudos epidemiológicos.

## CONCLUSÃO

Fica disponibilizado mais um método para a Rede Pública de Saúde, que se mostrou analiticamente satisfatório. Entretanto, é necessário definir valores de referências para estabelecer os limites clínicos de deficiência.

## REFERÊNCIAS

1. Bayoumi RA, Rosalki SB. Evaluation of methods of coenzyme activation of erythrocyte enzymes for detection of deficiency of vitamins B1, B2 and B6. *Clin Chem*. 1976; 22(3): 327-35.
2. Andrade JA, Gayer CR, Nogueira NP, Paes MC, Bastos VL, Neto Jda C, et al. The effect of thiamine deficiency on inflammation, oxidative stress and cellular migration in an experimental model of sepsis. *J Inflamm (Lond)*. 2014;11:11. [DOI: 10.1186/1476-9255-11-11].
3. Stroh C, Meyer F, Manger T. Beriberi, a severe complication after metabolic surgery - review of the literature. *Obes Facts*. 2014;7(4):246-52. [DOI: 10.1159/000366012].
4. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Secretaria Especial de Saúde Indígena. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Consulta para Vigilância Epidemiológica, Assistência e Atenção Nutricional dos casos de Beriberi. 1ª Edição. 2012. Brasília. 66p.
5. Talwar D, Davidson H, Cooney J, O'Reilly D. Vitamin B1 status assessed by direct measurement of thiamin pyrophosphate in erythrocytes or whole blood by HPLC: comparison with erythrocyte transketolase activation assay. *Clin Chem*. 2000; 46:704-10.
6. Michalak S, Michatowska-Wender G, Adamcewicz G, Wender MB. Erythrocyte transketolase activity in patients with diabetic and alcoholic neuropathies. *Folia Neuropathol*. 2013; 51(3):222-6. [DOI: <https://doi.org/10.5114/fn.2013.37706>].
7. Lonsdale D. A review of the biochemistry, metabolism and clinical benefits of thiamine and its derivatives. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2006;3(1):49-59. [DOI: 10.1093/ecam/nek009].
8. Cerroni MP, Barrado JC, Nobrega AA, Lins AB, Silva IP, Manguera RR, et al. Outbreak of Beriberi in an indian population of the upper Amazon region, Roraima state, Brazil, 2008. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;83(5):1093-7. [DOI: 10.4269/ajtmh.2010.10-0345].
9. Alves LF, Gonçalves RM, Cordeiro GV, Lauria MW, Ramos AV. Beriberi pós bypass gástrico: uma complicação não tão rara. Relato de dois casos. Revisão da literatura. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2006;50(3):564-8. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-27302006000300021>].
10. Manatakis DK, Georgopoulos N. A fatal case of Wernicke's Encephalopathy after sleeve gastrectomy for morbid obesity. *Case Rep Surg*. 2014;2014:281210. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/281210>].
11. Coelho LS, Hueb JC, Minicucci MF, Azevedo PS, Paiva SA, Zornoff LA. Thiamin deficiency as a cause of reversible cor pulmonale. *Arq Bras Cardiol*. 2007;91(1):e7-9. [DOI: 10.1590/S0066-782X2008001300013].
12. Gratton SM, Lam BL. Visual loss and optic nerve head swelling in thiamine deficiency without prolonged dietary deficiency. *Clin Ophthalmol*. 2014;8:1021-4. [DOI: 10.2147/OPHT.S64228].
13. Crook MA, Sriram K. Thiamine deficiency: the importance of recognition and prompt management. *Nutrition*. 2014;30(7-8):953-4. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2014.03.003>].
14. Sechi G, Serra A. Wernicke's encephalopathy: new clinical settings and recent advances in diagnosis and management. *Lancet Neurol*. 2007;6(5):442-55. [DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(07\)70104-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(07)70104-7)].
15. Raziel AR. Thiamine deficiency after bariatric surgery may lead to Wernicke encephalopathy. *Isr Med Assoc J*. 2012;14(11):692-4.
16. Da Cunha S, Albanesi Filho FM, da Cunha Bastos VL, Antelo DS, Souza MM. Thiamin, selenium, and copper levels in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy taking diuretics. *Arq Bras Cardiol*. 2002;79(5):454-65. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0066-782X2002001400003>].

17. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO. DOQ-CGCRE-008-Orientação sobre validação de métodos analíticos. Rev 04. Rio de Janeiro (RJ): Coordenação Geral de Acreditação; 2011.
18. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 22 maio 2012.
19. Oliveira CA, Mendes ME. Gestão de Fase Analítica do Laboratório- como assegurar a qualidade na prática. 1ª ed. Rio de Janeiro (RJ); 2010.
20. Bailey AL, Finglas PM, Wright AJ, Southon S. Thiamin intake, erythrocyte transketolase (EC 2.2.1.1) activity and total erythrocyte thiamin in adolescents. *Br J Nutr*. 1994; 72(1):111-25. [DOI: <https://doi.org/10.1079/BJN19940014>].
21. Soukaloun D, Lee SJ, Chamberlain K, Taylor AM, Mayxay M, Sisouk K et al. Erythrocyte transketolase activity, markers cardiac dysfunction and the diagnosis of infantile beriberi. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(2):e971. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000971>].
22. SmeetsEHJ, MullerH, deWaelJ. ANADH-dependent transketolase assay in erythrocyte hemolysates. *Clin Chim Acta*. 1971;33:379-86. [DOI:10.1016/0009-8981(71)90496-7].
23. Waring PP, Fisher D, McDonnell J, McGown EL, Sauberlich H. A continuous-flow (AutoAnalyzer II) procedure for measuring erythrocyte transketolase activity. *Clin Chem*. 1982; 28(11):2206-13.
24. Beutler E. Red cell metabolism- A manual of biochemical methods. 3ª ed. Orlando (FL): Grune & Stratton; 1984.
25. Rosa CA, Keller KM, Oliveira AA, Almeida TX, Keller LA, Marassi AC, et al. Production of citreoviridin by *Penicillium citreonigrum* strains associated with rice consumption and beriberi cases in the Maranhão State, Brazil. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2010;27(2):241-8. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/19440040903289712>].
26. Ringe H, Schuelke M, Weber S, Dorner BG, Kirchner S, Dorner MB. Infant Botulism: is there an association with thiamine deficiency? *Pediatrics*. 2014;134(5):e1436-40. [DOI: 10.1542/peds.2013-3378].
27. Mitsumida N, Umeda H, Iwase M. Shoshi Beriberi induced by long-term administration of diuretics: a case report. *Case Rep Cardiol*. 2014; 2014:878915. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/878915>].
28. Winston AP, Jamieson CP, Madira W, Gatward NM, Palmer RL. Prevalence of thiamin deficiency in anorexia nervosa. *Int J Eat Disord*. 2000;28:451-4. [DOI: 10.1002/1098-108X(200012)28:4<451::AID-EAT14>3.0.CO;2-I].



# Validação e aplicação de métodos cromatográficos para determinação de vitaminas em suplementos

## Validation and application of chromatographic methods for determination of vitamins in supplements

RIALA6/1689

Lucile Tiemi ABE-MATSUMOTO<sup>1,2\*</sup>, Geni Rodrigues SAMPAIO<sup>2</sup>, Deborah Helena Markowicz BASTOS<sup>2</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Núcleo de Química, Física e Sensorial, Centro de Alimentos, Instituto Adolfo Lutz, Av. Doutor Arnaldo, 355, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 01246-000. Tel: 11 3068 2939. E-mail: lucileabe@ial.sp.gov.br

<sup>2</sup>Laboratório de Bromatologia, Departamento de Nutrição, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, Av. Doutor Arnaldo, 714, São Paulo, SP, Brasil. CEP 01246-904

Recebido: 15.01.2016 - Aceito para publicação: 10.05.2016

### RESUMO

Foram propostas duas metodologias para realizar a determinação de vitaminas em suplementos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE): uma para a determinação simultânea de vitaminas lipossolúveis (acetato de retinol, palmitato de retinol, acetato de  $\alpha$ -tocoferol e  $\beta$ -caroteno) e outra para a determinação simultânea de vitaminas hidrossolúveis (B1, vitamina C, nicotinamida, ácido nicotínico, B6 e ácido pantotênico). A validação das metodologias foi realizada utilizando-se material de referência certificado SRM 3280 do NIST e padrões de vitaminas. Os limites de detecção (LDs) e de quantificação (LQs) variaram entre 0,3 e 4,3  $\mu\text{g/mL}$  e entre 0,5 e 14,0  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Os percentuais de recuperação dos padrões adicionados nas matrizes variaram entre 92 % e 109 % e entre 86 % e 108 % no material de referência. A repetitividade foi calculada utilizando-se o desvio padrão relativo (RSD); e foram detectados valores entre 0,2 % e 9,6 %. Os métodos validados foram aplicados para a determinação de vitaminas A, E, B1, C, niacina, B6 e ácido pantotênico em 10 amostras de suplementos vitamínicos. Ambos os métodos são adequados para a análise de vitaminas em suplementos e suas aplicações serão imprescindíveis, visto a necessidade urgente de efetuar monitoramento e fiscalização destes produtos.

**Palavras-chave.** suplementos nutricionais, vitaminas lipossolúveis, vitaminas hidrossolúveis, validação, cromatografia líquida.

### ABSTRACT

Two methodologies were proposed for determining vitamins in supplements by means of high performance liquid chromatography (HPLC): one for simultaneous determination of fat soluble vitamins (retinyl acetate, retinyl palmitate,  $\alpha$ -tocopheryl acetate and  $\beta$ -carotene), and the other for the simultaneous determination of water soluble vitamins (B1, C, nicotinamide, nicotinic acid, B6 and pantothenic acid). The methodologies were validated using certified reference material SRM 3280 from NIST and vitamins standards. The limits of detection (LODs) and the limits of quantification (LOQs) ranged from 0.3 to 4.3  $\mu\text{g/mL}$  and from 0.5 to 14.0  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. The recoveries of spiked vitamin standards in supplements ranged from 92 % to 109 %, and from 86 % to 108 % in the reference material. The repeatability was calculated by the relative standard deviation (RSD), with values from 0.2 % to 9.6 %. The validated methods were applied for determining vitamins A, E, B1, C, niacin, B6 and pantothenic acid in 10 multivitamin supplements samples. Both methods are suitable for determining vitamins in multivitamin supplements, and their applications will be essential, considering the urgent need for monitoring and for surveying these products.

**Keywords.** nutritional supplements, fat-soluble vitamins, water-soluble vitamins, validation, liquid chromatography.

## INTRODUÇÃO

Estudos sugerem aumento do consumo de suplementos vitamínicos e minerais no Brasil, sendo comparável aos encontrados em países como os Estados Unidos e a Alemanha<sup>1,2</sup>. Esta categoria de produtos passou a ser isenta de registro no Ministério da Saúde a partir de 2010<sup>3</sup>, facilitando ainda mais a sua comercialização no mercado brasileiro. As informações sobre qualidade e segurança destes produtos são, na maioria das vezes, limitadas às informações constantes nos rótulos, porém, as concentrações de vitaminas declaradas na informação nutricional da rotulagem poderão ser confirmadas somente após análise destes produtos com metodologias analíticas validadas<sup>4</sup>.

Para a determinação de vitaminas lipossolúveis em alimentos, a maioria das técnicas envolve etapas de saponificação, extração com solvente orgânico e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por fluorescência ou ultravioleta-visível (UV-Vis). A determinação de vitaminas hidrossolúveis foi realizada durante muitos anos por métodos microbiológicos e espectrofotométricos e, posteriormente, também por CLAE<sup>5,6</sup>. Novas técnicas cromatográficas têm sido desenvolvidas apresentando diversas vantagens tais como: redução no tempo de análise, utilização de menor quantidade de solventes, maior eficiência, além da possibilidade de quantificar várias vitaminas em uma mesma análise. O uso de CLAE com detector de massas e a técnica por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE), por exemplo, permitem essas vantagens, porém são equipamentos de alto custo<sup>7,8,9</sup>.

A análise de vitaminas envolve alguns desafios. Sua determinação exige cuidados especiais, principalmente devido a sensibilidade destes compostos à luz, oxigênio, temperatura e alterações de pH<sup>5</sup>. Em alimentos *in natura*, as vitaminas encontram-se em baixas concentrações, muitas vezes com a presença de interferentes em matrizes complexas. Em suplementos, as vitaminas estão presentes em concentrações maiores, porém, há grande variação entre as concentrações de vitaminas adicionadas nestes produtos,

dificultando a extração e análise simultânea de alguns compostos<sup>10</sup>. As concentrações de vitamina B<sub>12</sub> e de vitamina C, por exemplo, encontram-se próximos de 2 µg e 45 mg, respectivamente em uma porção.

O tamanho da porção para análise é um fator importante a se considerar, já que algumas vitaminas são microencapsuladas com a finalidade de garantir sua estabilidade durante o período de armazenamento e as partículas podem não estar homogeneamente distribuídas. As tecnologias como a nano e a microencapsulação estão rapidamente evoluindo, sendo que os diferentes processos utilizados podem dificultar a extração de algumas vitaminas<sup>11</sup>. Devido às dificuldades para se estabelecer um método prático e seguro para análise de vitaminas em suplementos vitamínicos, o *National Institute of Standard and Technology* (NIST) produziu recentemente um material de referência de multivitamínicos e multielementos<sup>12</sup>. Este material serve de suporte para a validação de metodologias de análise destes produtos permitindo aos laboratórios a implantação de metodologias confiáveis, possibilitando uma fiscalização adequada para oferecer produtos com maior garantia de qualidade aos consumidores.

Com a isenção da obrigatoriedade de registro sanitário, a fiscalização de suplementos vitamínicos por órgãos competentes torna-se extremamente necessária para assegurar a idoneidade dos mesmos. Assim, este trabalho teve como objetivo, adequar e validar metodologias para determinação de vitaminas em suplementos vitamínicos nas formas de comprimidos, drágeas, cápsulas gelatinosas duras e moles e soluções, visando estabelecer métodos de fácil e rápida execução para a implantação na rotina, tanto em laboratórios de saúde pública quanto em laboratórios de controle de qualidade nas indústrias.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Padrões, reagentes, material de referência certificado e amostras

Os padrões de acetato de retinol, acetato de  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -caroteno, cloridrato de tiamina (B1), riboflavina (B2), cloridrato de piridoxina (B6), nicotinamida, ácido nicotínico e ácido pantotênico foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (St Louis,

EUA); o palmitato de retinol da Fluka (Buchs, Suíça) e o ácido ascórbico (C) da Supelco (Bellefonte, EUA). Foram utilizados os seguintes solventes grau cromatográfico: metanol da Carlo Erba e acetonitrila, hexano e clorofórmio da J. T. Baker® (Bakerbond, EUA). Trietilamina e BHT (butil hidroxitolueno) foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (St Louis, EUA), HCl (ácido clorídrico) e ácido orto-fosfórico, da Merck® (Darmstadt, Alemanha), e fosfato de sódio monobásico, da Calbiochem® (San Diego, EUA). O material de referência SRM 3280 - *Multivitamin/Multielement Tablet*, foi adquirido do NIST e as amostras de suplementos vitamínicos foram adquiridas no comércio da cidade de São Paulo (SP).

A solução tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 3,0) foi preparada semanalmente, dissolvendo-se 6,9 g de fosfato de sódio monobásico em 1 L de água Milli-Q e o pH foi ajustado para  $3,0 \pm 0,1$  com adição de ácido ortofosfórico 85 %. A solução foi colocada em banho ultrassônico por 10 min e filtrada em membranas de 0,45 µm antes do uso.

### Equipamentos

A pulverização das matrizes drágeas e comprimidos foi realizada em moinho vibratório, modelo MM400, marca Retsch Technology® (Haan, Alemanha). Para os procedimentos de análise, utilizou-se balança analítica modelo XS205, marca Mettler Toledo (Schwerzenbach, Suíça); banho ultrassônico modelo Ultracleaner 1400, marca Unique (São Paulo, Brasil); centrífuga modelo 3-18K, marca Sigma (Osterode, Alemanha); concentrador de amostras modelo Centrivap, marca Labconco (Kansas City, EUA). A leitura das absorvâncias dos padrões de vitaminas e de β-caroteno foi realizada em espectrofotômetro UV/Visível modelo UV-X1650PC, marca Shimadzu® (Kyoto, Japão) e o ajuste de pH da solução tampão foi realizado em pHmetro digital, modelo PG1800, marca Gehaka® (São Paulo, Brasil). A água foi purificada pelo sistema Milli-Q, da Millipore (Bedford, EUA).

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência, modelo LC-20AT, com injetor automático SIL-20AC, controlador CBM-20A, forno de coluna CTO-20A e detector de arranjo de diodos PDA-20A, marca

Shimadzu® (Kyoto, Japão). Para ambos os métodos, foi utilizada coluna de fase reversa C18 Shim-Pack VP-ODS-2 (150 mm x 4,6 mm, partículas de 5 µm), marca Shimadzu (Kyoto, Japão).

### Preparo das amostras de suplementos vitamínicos

Um mínimo de dez unidades das amostras em drágeas ou comprimidos foram pesadas para o cálculo do peso médio real, e estas foram trituradas em moinho utilizando vasos de moagem de 50 mL, com frequência de 20 Hz durante 1 min. Para a determinação das vitaminas A e E e β-caroteno foi necessária uma etapa adicional: as amostras trituradas previamente, foram passadas em tamis de 100 Mesh, e o conteúdo retido no tamis foi pulverizado em vaso de moagem de 10 mL com frequência de 20 Hz durante 30 s, para que todo o pó atingisse uma granulometria menor que 150 µm, ou seja, passasse pelo tamis de 100 Mesh.

As cápsulas gelatinosas duras foram abertas manualmente e o conteúdo (pó) de dez unidades foi homogeneizado em frascos de polipropileno. As cápsulas gelatinosas moles de matriz oleosa foram abertas com auxílio de estilete e o conteúdo de dez unidades foi homogeneizado em tubos de polipropileno. Nestes dois tipos de cápsulas, o conteúdo foi completamente removido para a pesagem das cápsulas vazias. Determinou-se por diferença entre os pesos das cápsulas inteiras e das cápsulas vazias, o peso médio do conteúdo de dez unidades. Em matrizes líquidas, os frascos foram agitados antes da tomada de amostra para garantir sua homogeneidade.

### Metodologia proposta para a determinação de vitaminas A e E e β-caroteno

O desenvolvimento da metodologia foi baseado no método descrito por Thomas et al<sup>13</sup> com modificações. As etapas de adequação do ensaio, que levaram a alterações no método original, bem como os resultados da validação do ensaio estão descritas no item resultados e discussões. A fase móvel foi constituída de metanol com 0,1 % de trietilamina : etanol (75 : 25, v/v), com fluxo de 1,0 mL/min, em modo isocrático, com forno de coluna a 35 °C. O volume de injeção foi de 20 µL e a temperatura no injetor automático foi mantida a 15 °C para minimizar a degradação das

vitaminas. O tempo da análise cromatográfica foi de 25 min.

Cerca de 250 mg da amostra pulverizada foram pesadas em tubo de polipropileno com tampa rosqueada com capacidade de 50 mL. Foi adicionado 1 mL de HCl 0,1 M aos tubos, os quais foram sonicados a 40 kHz em banho ultrassônico por 15 min. A extração dos analitos foi realizada em três etapas utilizando 10, 10 e 5 mL de hexano respectivamente para a primeira, segunda e terceira extrações. Após cada adição de hexano, os tubos foram homogeneizados em agitador tipo Vortex por 1 min, colocados em banho ultrassônico por 5 min, agitados novamente em agitador tipo Vortex por 30 s e centrifugados a 10.000 rpm por 15 min a 4 °C. Após cada centrifugação, os extratos foram transferidos para balões volumétricos âmbar de 25 mL com auxílio de micropipeta, e o volume final foi completado com hexano. Alíquotas de 3 mL do extrato hexânico foram transferidos para tubos de vidro de 10 mL e colocados em concentrador de amostras por 10 min a 40 °C para evaporação do solvente. Quando foi observado algum resíduo líquido no tubo, este foi completamente seco com auxílio de nitrogênio. As amostras foram ressuspensas em 2 mL de álcool etílico com BHT a 0,3 mg/mL, filtrados em membranas de 0,45 µm (Millipore) para frascos tipo *vial* âmbar.

Para a análise dos suplementos com matriz oleosa, utilizou-se quantidade de amostra entre 150 e 400 mg, e para análise em matriz líquida, pipetou-se um volume entre 1 e 3 mL, dependendo da concentração de vitaminas declaradas na informação nutricional. A extração de vitaminas A e E e β-caroteno foi realizada seguindo o mesmo procedimento utilizado para as matrizes pulverizadas, excluindo-se a primeira etapa correspondente a adição de HCl 0,1 M com banho ultrassônico por 15 min.

Para a curva de calibração, os padrões de acetato e palmitato de retinol e acetato de α-tocoferol foram dissolvidos em álcool etílico e o padrão de β-caroteno foi dissolvido em hexano. As concentrações das soluções de estoque foram determinadas espectrofotometricamente pela Lei de Lambert-Beer, utilizando as seguintes absorvidades molares: 1560 dL/g.cm para acetato

de retinol a 325 nm, 1000 dL/g.cm para palmitato de retinol a 325 nm, 43,6 dL/g.cm para acetato de α-tocoferol a 284 nm e 2590 dL/g.cm para β-caroteno a 450 nm<sup>13,14</sup>.

As curvas de calibração foram construídas em cinco níveis nas seguintes faixas de concentração: 0,95 a 30,42 µg/mL para acetato de retinol; 36,68 a 586,81 µg/mL para acetato de α-tocoferol; 2,41 a 76,96 µg/mL para palmitato de retinol e 3,09 a 51,64 µg/mL para β-caroteno.

Para a expressão dos resultados foram utilizados os fatores 0,872, 0,546 e 0,167 respectivamente para acetato de retinol, palmitato de retinol e β-caroteno e o fator 0,91 para o acetato de α-tocoferol<sup>15,16</sup>. Uma porção corresponde à ingestão diária de suplemento recomendada pelo fabricante.

### Metodologia proposta para a determinação de vitaminas hidrossolúveis

A fase móvel foi constituída de metanol (A) e tampão fosfato de sódio 0,05 M (B), em modo de gradiente linear, iniciando com 98 % de A, passando para 40 % de A em 9 min, retornando para a condição inicial em 15 min, e mantendo-se nesta proporção até 25 min para equilíbrio da fase móvel, com fluxo de 0,8 mL/min. O volume de injeção foi de 10 µL e as temperaturas no injetor automático e no forno de coluna foram mantidas a 15 °C e 26 °C, respectivamente. O ácido pantotênico foi detectado a 209 nm, a tiamina, vitamina C, nicotinamida e ácido nicotínico a 254 nm, riboflavina a 268 nm e a piridoxina a 283 nm.

Cerca de 350 mg da amostra pulverizada foram pesadas em tubo de polipropileno com tampa rosqueada com capacidade de 50 mL. Foram adicionados 35 mL de solução tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 3,0) aos tubos, os quais foram agitados em agitador tipo Vortex por 20 s, filtrados em papel de filtro quantitativo, e em seguida em membranas de 0,22 µm (Millipore) para frascos tipo *vial* âmbar. As análises cromatográficas foram realizadas imediatamente após o preparo.

Para análise em matriz oleosa, pesou-se uma quantidade de amostra entre 150 e 400 mg, adicionou-se 5 mL de clorofórmio e foram realizadas

3 extrações com 10 mL de tampão fosfato. A cada adição de tampão, os tubos foram agitados em agitador tipo Vortex por 20 s. Após a separação das fases, a fase aquosa foi transferida para frasco de polipropileno com auxílio de pipeta automática. Cerca de 2 mL de fase aquosa foi filtrada em filtros de 0,22 µm (Millipore) para frascos tipo *vial* âmbar e analisadas imediatamente por CLAE.

Em matriz líquida, pipetou-se um volume entre 1 e 3 mL, seguindo o mesmo procedimento utilizado para as matrizes pulverizadas.

Os padrões das vitaminas hidrossolúveis foram dissolvidos em tampão fosfato de sódio 0,05 M e as curvas de calibração foram construídas em cinco níveis nas seguintes faixas de concentração: 11,1 a 177,6 µg/mL para nicotinamida; 29,8 a 476,9 µg/mL para vitamina C; 3,8 a 60,4 µg/mL para tiamina; 3,7 a 59,3 µg/mL para piridoxina; 3,7 a 59,3 µg/mL para ácido pantotênico e 10,4 a 166,3 µg/mL para ácido nicotínico. Os resultados foram expressos em miligramas (mg) de vitamina por porção de suplemento.

### Validação

As validações dos métodos foram realizadas de acordo com o documento de caráter orientativo da Coordenação Geral de Acreditação DOQ-CGCRE-008 - Orientação sobre validação de métodos analíticos do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO, 2011)<sup>17</sup>. Os seguintes parâmetros de desempenho foram determinados:

#### *Seletividade*

Para o estudo da seletividade, foram selecionadas amostras de suplementos vitamínicos e minerais com ausência do analito a ser estudado, os quais foram utilizados como o branco da amostra. Para a avaliação da seletividade foram realizados os ensaios em dois grupos de amostras de teste, um com a matriz (branco da amostra) e outro sem a matriz (branco do ensaio), seguindo a metodologia proposta. As análises foram realizadas em seis replicatas independentes para cada grupo, com adição de um nível de concentração do padrão do analito.

O efeito da matriz suplementos vitamínicos

e minerais foi verificado pelo teste F, para comprovar a homogeneidade das variâncias e pelo teste t, para a comparação das médias. Em cada grupo, foi verificada a existência de *outlier*, através do teste de Grubbs. Os seguintes critérios de aceitação foram utilizados: Se  $G_{calc} < 1,887$  não há *outlier*; se  $t_{calc} < t_{tab}$  e  $F_{calc} < F_{tab}$  não há efeito de matriz; se  $t_{calc} > t_{tab}$  e/ou  $F_{calc} > F_{tab}$  há necessidade da adição padrão.

#### *Linearidade e Faixa de Trabalho*

O estudo da linearidade foi realizado com cinco níveis de concentração. Os padrões foram preparados em triplicatas e os valores de suas áreas foram usados para a obtenção da equação de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. Um estudo da linearidade foi estabelecido para o método por meio do coeficiente de regressão linear (r) da reta. O coeficiente de correlação quadrado ( $r^2$ ) é normalmente mais utilizado porque fornece a ideia percentual de correlação dos pontos com a reta. Quanto mais próximo de 1 é o  $r^2$ , melhor é a representação do modelo matemático expresso pela equação de reta. Para o conjunto de dados obtidos foi calculado o valor de  $r^2$  e um valor maior que 0,995 foi requerido.

O método dos mínimos quadrados supõe que os resíduos têm a mesma variância. Na calibração isto significa que a dispersão das medidas é independente do valor da concentração. Esta condição de variância uniforme é chamada homocedasticidade. Para verificar se o sistema é homocedástico (variâncias iguais) ou heterocedástico (variâncias diferentes) foi aplicado o teste de Cochran, visando avaliar como é a variância ao longo da curva. Os valores dos resíduos foram lançados em gráfico e foi observada se a distribuição dos pontos era aleatória, livre de tendências.

#### *Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)*

Foram adicionadas pequenas concentrações dos analitos ao branco da amostra e utilizou-se como critério para determinação do limite de detecção, as concentrações que equivalassem a uma área de pico cerca de três vezes maiores que o ruído. Utilizando a fórmula  $LD = LQ/3,3$ ,



estabeleceu-se o LQ. A precisão e exatidão das áreas correspondentes ao LQ foram confirmadas, preparando seis replicatas nestas concentrações, e quantificando conforme os métodos analíticos estabelecidos.

#### *Exatidão*

A exatidão foi avaliada pelo teste de recuperação dos padrões adicionados nas matrizes de suplementos vitamínicos. Foram preparadas em triplicatas, amostras de suplementos com adição de padrão em três níveis de concentração, que foram quantificadas conforme os métodos analíticos estabelecidos. Além disso, foi analisado o material de referência SRM 3280 *Multivitamin/Multielement tablet* em 6 replicatas.

#### *Precisão*

Para a repetitividade, foram utilizados os resultados obtidos no teste de recuperação de amostras fortificadas, calculando-se o desvio padrão para cada nível de concentração e o desvio padrão relativo (RSD).

#### **Análise estatística**

Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão. O nível de significância estabelecido para os testes estatísticos aplicados na validação das metodologias foi de  $\alpha = 5\%$ . Todas as análises dos dados foram realizadas pelo programa Microsoft® Excel 2010.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Adequação da metodologia para determinação de vitaminas A e E e $\beta$ -caroteno**

#### *Condições cromatográficas*

O desenvolvimento da metodologia foi iniciado pelas condições cromatográficas de separação e de detecção do acetato de retinol, palmitato de retinol, acetato de  $\alpha$ -tocoferol e  $\beta$ -caroteno em CLAE utilizando detectores de arranjo de diodos e de fluorescência em série. Inicialmente, foi utilizada uma coluna de fase reversa C18, Shim-Pack VP-ODS-2 (250 mm x 4,6 mm, partículas de 5  $\mu$ m, marca Shimadzu) e fase móvel metanol com 0,05 % de trietilamina : acetonitrila

(96 : 4, v/v). Porém, nestas condições, não ocorreu eluição do  $\beta$ -caroteno em 60 min. Para uma eluição mais rápida do  $\beta$ -caroteno, havia a necessidade de se utilizar uma fase móvel menos polar. A escolha dos solventes da fase móvel foi baseada no método descrito por Kand'ar et al<sup>18</sup>, pois o uso de etanol apresenta a vantagem de ser menos tóxico e o metanol, por ser de baixo custo. Com esta fase móvel, foi necessária uma corrida de 45 min para a eluição de todos os analitos. Para redução do tempo de corrida, foi utilizada uma coluna de mesma composição, porém com comprimento de 150 mm, tornando possível a eluição e separação de todos os compostos de interesse em 25 min, permitindo boa resolução para todos os picos cromatográficos.

#### *Deteção*

Inicialmente, foi utilizado o detector de arranjo de diodos (DAD) para detecção do acetato e palmitato de retinol ( $\lambda = 325$  nm) e do  $\beta$ -caroteno ( $\lambda = 450$  nm), em série com o detector de fluorescência ( $\lambda_{ex} = 280$  nm e  $\lambda_{em} = 330$  nm) para detecção do acetato de  $\alpha$ -tocoferol. Para a análise simultânea das vitaminas A e E normalmente utilizam-se estes dois detectores, já que a intensidade de resposta dos tocoferóis no UV é relativamente menor quando comparado à intensidade de resposta dos retinóis. Ao analisar estes dois analitos em concentrações equivalentes, os picos cromatográficos ficaram desproporcionais, dificultando a quantificação dos tocoferóis pelo UV e levando à necessidade de uso do detector de fluorescência, o qual apresenta maior sensibilidade. Porém, nos suplementos vitamínicos a concentração de acetato de  $\alpha$ -tocoferol encontrada é cerca de 10 a 15 vezes maior que a concentração de acetato de retinol. Assim, a curva de calibração foi construída levando-se em consideração estas proporções, o que possibilitou a quantificação de ambas utilizando somente o DAD.

#### *Preparo de amostra e extração das vitaminas*

No método proposto por Thomas et al<sup>13</sup>, utilizaram-se 2 g de amostra e no mínimo 100 mL de solvente orgânico, e a etapa de extração das vitaminas foi realizada *overnight*, o que não se

mostrou muito prático. Assim, a extração foi realizada utilizando-se 0,2 a 0,3 g de amostra e reduzindo-se o volume de solvente para 25 mL. Porém, com a redução da quantidade de amostra foi necessária uma homogeneização adequada dos suplementos vitamínicos. O pó obtido após trituração dos comprimidos no moinho vibratório, utilizando vasos de moagem de 50 mL, com frequência de 20 Hz durante 1 min apresentou-se visualmente homogêneo, porém, após análise das vitaminas, observou-se que a homogeneização não foi suficiente para um resultado satisfatório, em relação ao acetato de retinol, o qual apresentou coeficiente de variação acima de 20 % para análise em quadruplicata. Para melhorar a homogeneização, a amostra pulverizada foi passada em tamis de 100 *mesh* e o resíduo retido foi novamente triturado em vasos de moagem de 10 mL por 30 s até que todo o pó passasse pelo tamis de 100 *mesh*. Com esta etapa de homogeneização foi possível obter resultados com coeficientes de variação menores que 10 %. Além disso, foi realizado teste de extração das amostras utilizando somente o Vortex por 1 min após adição de hexano, ou o Vortex por 1 min seguido de ultrassom por 5 min e novamente o Vortex por 30 s. A eficiência da extração foi confirmada pela quantificação dos analitos extraídos do resíduo após as três extrações, ou seja, realizando a quarta extração e verificando-se que as concentrações de vitaminas encontrados nesta última não foram significativas.

Nos suplementos vitamínicos, a vitamina A pode ser adicionada nas formas de acetato ou palmitato de retinol ou ainda como o  $\beta$ -caroteno, e as suas concentrações são expressas como  $\mu\text{g ER}$  (equivalentes de retinol) por porção. A vitamina E é adicionada na forma de acetato de  $\alpha$ -tocoferol e expressa como  $\text{mg } \alpha\text{-TE}$  (equivalentes de  $\alpha$ -tocoferol) por porção.

### **Adequação da metodologia para determinação de vitaminas hidrossolúveis**

#### *Condições cromatográficas*

Utilizou-se inicialmente as fases móveis tampão fosfato de sódio 0,05 M (A) e acetonitrila (B), em modo de gradiente, com fluxo de

1,0 mL/min. Foram testadas concentrações de acetonitrila entre 2 e 25 % nas condições iniciais, aumentando linearmente para 40 %, porém, não houve separação com boa resolução dos picos de piridoxina e nicotinamida. Ao substituir a acetonitrila pelo metanol, houve melhor separação dos compostos, sendo estabelecida a proporção de 2 % de metanol nas condições iniciais com fluxo de 0,8 mL/min.

#### *Preparo de amostra e extração das vitaminas*

Utilizou-se 350 mg de amostra com 35 mL de tampão fosfato, combinando-se agitação em Vortex e banho ultrassônico, testando-se a segunda extração para certificar-se de que a extração única era suficiente. A agitação por 1 min em Vortex, com 5 min em banho ultrassônico, seguido de 30 s de agitação em Vortex e centrifugação a 10.000 rpm por 10 min a 4 °C (Método A), mostrou-se satisfatória para a extração e quantificação das vitaminas B1, C, niacina, B6, riboflavina e ácido pantotênico em material de referência certificado. As análises em material de referência foram realizadas com seis repetições em dois dias distintos. As seis replicatas foram preparadas simultaneamente, assim, o tempo decorrido entre as injeções subsequentes foi de 25 min, tempo correspondente a uma análise. A média dos resultados para a vitamina C foi satisfatória, considerando a incerteza do valor certificado, porém, foi visível a sua degradação com o tempo (**Figura 1**). O preenchimento dos *vials* até a sua capacidade máxima para minimizar a ação do oxigênio, e o seu armazenamento em compartimento refrigerado do auto injetor, não foram suficientes para evitar a degradação da vitamina C.

Assim, verificou-se a necessidade de se realizar uma extração rápida, agitando-se o tubo com a amostra e a solução tampão fosfato somente em Vortex por 20 s. Para reduzir ainda mais o tempo de extração, optou-se por não centrifugar a amostra. A solução foi então filtrada primeiramente em filtro de papel quantitativo e em seguida em filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  e a análise cromatográfica foi realizada imediatamente após cada preparo. Desta forma, o tempo máximo a partir do início de preparo até a análise cromatográfica foi reduzido de 20 min

para cerca de 5 min (Método B). O material de referência foi também analisado por este método de extração em seis replicatas em dois dias distintos, e verificaram-se melhores resultados em relação à vitamina C (Figura 1). Com esta extração, a quantificação da riboflavina ficou prejudicada, provavelmente, porque esta vitamina tem baixa solubilidade em solução aquosa, e uma extração rápida não foi suficiente para a recuperação adequada desta vitamina. Porém, optou-se pelo método sem centrifugação para priorizar a análise de vitamina C, tendo em vista que esta vitamina é o componente mais abundante nas amostras de suplementos vitamínicos disponíveis no comércio. Esta extração se mostrou rápida e prática, apesar da necessidade de análise imediata no cromatógrafo após cada extração.

Ao analisar algumas amostras comerciais pelos dois métodos de extração (A e B), verificou-se que não havia um padrão para a velocidade de degradação da vitamina C. Ao comparar as concentrações de vitamina C analisadas por ambos os métodos, observou-se porcentagens de degradação entre 18 e 83 % nos resultados obtidos pelo método A quando comparado com o

resultado médio obtido pelo método B. O tempo decorrido após o início do preparo até a análise cromatográfica foi de 20 a 70 min no método A, enquanto no método B, todas as análises cromatográficas foram realizadas após cerca de 5 min do início do preparo.

### Validação das metodologias

Os parâmetros de validação avaliados foram a seletividade, linearidade e faixa de trabalho, limites de detecção e de quantificação, exatidão e precisão, e os resultados estão apresentados a seguir:

#### Seletividade

Os ensaios para avaliação da seletividade mostraram que não há *outlier* entre as replicatas, ou seja,  $G_{calc} < 1,887$ , e que não há efeito de matriz, pois  $t_{calc} < t_{tab}$  e  $F_{calc} < F_{tab}$  para todos os analitos, logo a adição de padrão não foi necessária, podendo ser utilizada a curva de calibração preparada sem a matriz.

Como os resultados mostraram que a matriz não interfere na análise, os estudos de linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão foram baseados na curva de calibração sem a matriz.

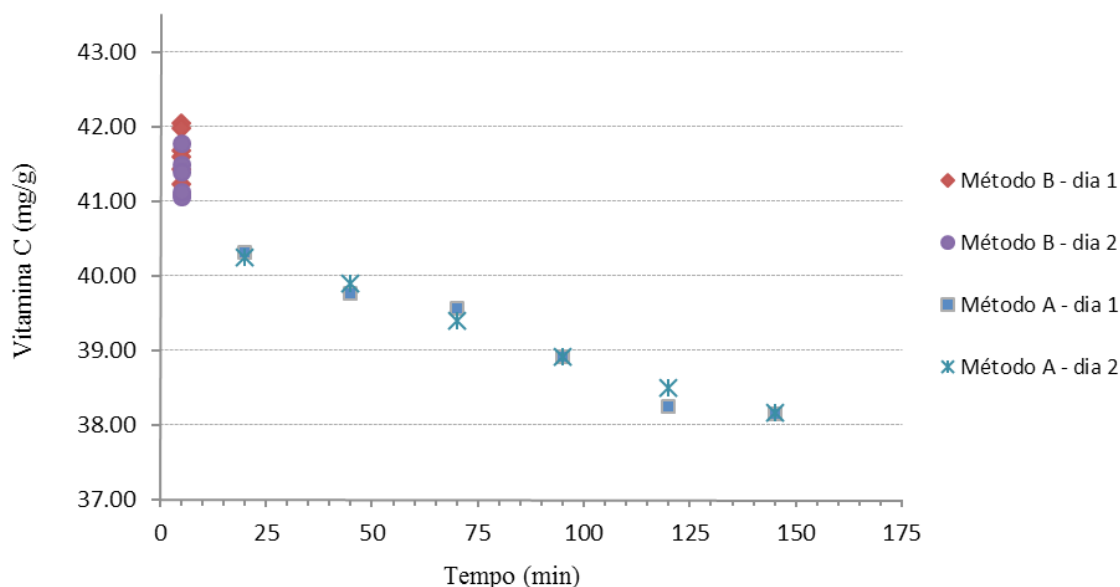


Figura 1. Concentrações de vitamina C determinadas em material de referência certificado SRM 3280 (Valor certificado =  $42,2 \pm 3,7$  mg/g), pela extração realizada com centrifugação (Método A) e sem centrifugação com injeção imediata (Método B)

### Linearidade e faixa de trabalho

De um modo geral, um coeficiente de correlação quadrado igual ou superior a 0,995 é utilizado para indicar métodos lineares, portanto, adotou-se este critério. Considerando os resultados obtidos, conclui-se que os coeficientes de correlação quadrado apresentaram valores superiores a 0,995, logo, a faixa de trabalho é linear nos intervalos apresentados na **Tabela 1**.

No teste de Cochran, o valor de  $C_{calc}$  foi menor que de  $C_{tab}$  (**Tabela 1**) para todos os analitos, logo, a curva de calibração apresenta comportamento homocedástico, ou seja, possui variâncias semelhantes ao longo da faixa de trabalho. Além disso, os gráficos de resíduos das curvas analíticas de calibração mostraram uma distribuição aleatória, livre de tendências, mostrando que o modelo matemático utilizado para obtenção da equação de reta é adequado.

### LD e LQ

Os valores dos limites de detecção e de quantificação estão apresentados na Tabela 1. Os valores de áreas obtidos para o limite de quantificação possuem precisão e exatidão adequados. O desvio padrão relativo entre as repetições apresentou um valor inferior a 10 %, indicando que as medições das áreas dos padrões no LQ possuem precisão adequadas, ou seja,

são repetitivas. A exatidão foi avaliada pela linearidade da resposta deste padrão com o primeiro ponto da curva de calibração, onde concentração e área aumentam na mesma proporção.

Os limites de detecção e quantificação não são críticos para esta metodologia, pois as concentrações normalmente encontradas destas vitaminas em suplementos permitem a obtenção de extratos relativamente concentrados e as curvas de calibração foram determinadas levando-se em consideração estes níveis.

### Exatidão

Os resultados dos ensaios de recuperação dos padrões de vitaminas e  $\beta$ -caroteno adicionados nas matrizes drágeas, comprimidos e cápsulas (pó), cápsulas gelatinosas (matriz oleosa) e nas matrizes líquidas estão listados na **Tabela 2**. De acordo com o guia de validação de métodos químicos da *Association of Official Analytical Chemists (AOAC)*, os valores aceitáveis de recuperação para o nível de concentração do acetato de  $\alpha$ -tocoferol, ácido pantotênico, nicotinamida, ácido nicotínico e vitamina C situam-se entre 90 e 108 % e para os demais analitos, entre 85 e 110 %<sup>19</sup>. A recuperação do padrão de  $\beta$ -caroteno em amostras líquidas apresentou valores entre 80 e 130 %. No entanto, foi verificado que este parâmetro seria desnecessário,

**Tabela 1.** Valores de  $r^2$  obtidos das curvas de calibração nas faixas de trabalho apresentadas, valores de  $C_{tab}$  e  $C_{calc}$  obtidos pelo teste de Cochran, LD e LQ dos analitos

Analito	Faixa de trabalho ( $\mu\text{g/mL}$ )	$r^2$	$C_{tab}/C_{calc}$	LD* ( $\mu\text{g/mL}$ )	LQ* ( $\mu\text{g/mL}$ )
Acetato de retinol	0,9 a 30,4	0,99999	0,684/0,666	0,1	0,5
Acetato de $\alpha$ -tocoferol	36,7 a 586,8	0,99997	0,684/0,467	3,0	9,9
Palmitato de retinol	2,4 a 76,9	0,99994	0,684/0,571	0,3	1,0
$\beta$ -caroteno	3,1 a 51,6	0,99808	0,684/0,534	0,3	1,0
Ácido pantotênico	21,4 a 342,8	0,99999	0,684/0,560	4,3	14,0
B1	3,8 a 60,4	0,99998	0,684/0,623	0,9	3,0
Nicotinamida	11,1 a 177,6	0,99999	0,684/0,602	2,5	8,1
Ácido nicotínico	10,4 a 166,2	0,99998	0,684/0,584	2,4	7,9
Vitamina C	29,8 a 476,9	0,99901	0,684/0,560	3,6	12,0
B6	3,7 a 59,3	0,99999	0,684/0,510	0,9	3,0

\* (n = 3)

**Tabela 2.** Resultados dos ensaios de recuperação de vitaminas e de β-caroteno adicionados em suplementos vitamínicos após extração e análise por CLAE-DAD

Análito	Pó			Óleosos			Líquidas		
	Adicionada*	Rec (%)**	RSD (%)***	Adicionada*	Rec (%)**	RSD (%)***	Adicionada*	Rec (%)**	RSD (%)***
Acetato de retinol	1,99	99,5 ± 5,6	5,6	2,28	96,5 ± 4,1	4,2	2,28	102,0 ± 4,2	3,7
	6,97	94,6 ± 1,7	1,8	14,26	97,2 ± 3,5	3,6	14,22	102,7 ± 2,3	0,2
	24,88	95,1 ± 0,7	0,8	27,38	97,7 ± 3,4	3,5	27,30	101,6 ± 3,6	1,6
Palmitato de retinol	1,22	94,7 ± 0,8	0,9	2,94	92,0 ± 1,8	1,9	14,40	96,0 ± 4,4	4,5
	19,52	96,3 ± 1,1	1,1	12,85	97,3 ± 3,0	3,1	48,00	100,7 ± 4,1	4,9
	78,08	104,1 ± 1,8	1,7	25,71	97,3 ± 1,1	1,1	96,00	96,1 ± 5,7	5,1
Acetato de α-tocoferol	36,55	98,5 ± 0,8	0,8	41,50	99,8 ± 6,6	6,6	35,63	98,9 ± 3,7	3,3
	73,11	100,2 ± 1,1	1,2	207,49	100,3 ± 5,5	5,5	178,14	101,5 ± 0,6	0,5
	219,32	101,5 ± 1,4	1,4	373,49	99,1 ± 4,4	4,4	356,28	101,1 ± 0,5	0,4
β-caroteno	4,10	100,4 ± 1	9,6	4,42	99,6 ± 8,0	8,0	-	-	-
	15,38	95,0 ± 5,8	9,6	27,63	108,1 ± 3,4	3,1	-	-	-
	36,63	101,9 ± 8,1	6,1	55,26	106,2 ± 5,2	4,9	-	-	-
Ácido pantotênico	25,1	92,9 ± 0,9	1,0	27,8	99,7 ± 4,0	4,0	24,2	103,4 ± 4,7	4,5
	100,3	95,3 ± 0,3	0,3	111,0	97,2 ± 1,7	1,8	96,9	97,2 ± 1,1	1,1
	200,7	94,1 ± 0,8	0,8	222,0	99,4 ± 1,3	1,4	193,8	98,1 ± 0,9	0,9
B1	5,1	105,7 ± 2,7	2,5	6,0	98,5 ± 1,7	1,7	5,1	95,7 ± 1,0	1,1
	20,6	105,7 ± 1,3	1,2	24,2	109,2 ± 3,6	3,3	20,3	103,2 ± 3,7	3,6
	41,1	104,4 ± 2,6	2,5	48,3	105,8 ± 1,0	0,9	40,7	103,2 ± 2,1	2,1
Nicotinamida	14,3	101,0 ± 3,3	3,2	17,3	94,9 ± 3,6	3,7	14,2	103,9 ± 2,7	2,6
	57,1	102,4 ± 0,9	0,8	69,1	105,0 ± 2,5	2,4	56,7	97,5 ± 3,6	3,7
	114,3	102,3 ± 1,2	1,2	138,2	99,1 ± 0,6	0,6	113,3	101,8 ± 0,4	0,4
Ácido nicotínico	14,2	95,8 ± 2,1	2,2	16,2	102,5 ± 1,4	1,4	14,3	93,6 ± 1,6	1,7
	56,7	99,0 ± 0,2	0,2	64,9	103,4 ± 3,0	2,9	57,0	98,4 ± 0,2	0,2
	113,3	97,4 ± 1,2	1,2	129,8	99,8 ± 0,7	0,7	114,1	103,0 ± 0,9	0,8
Vitamina C	44,8	98,7 ± 3,4	3,5	54,4	96,2 ± 4,7	4,8	44,9	97,1 ± 2,2	2,2
	134,3	100,5 ± 4,2	4,2	163,3	103,1 ± 2,0	1,9	134,8	98,5 ± 1,8	1,8
	310,6	99,8 ± 0,5	0,5	326,6	102,9 ± 1,3	1,3	269,6	101,5 ± 3,1	3,0
B6	5,1	100,5 ± 1,6	1,6	5,9	99,6 ± 1,8	1,8	5,1	97,3 ± 0,9	0,9
	20,6	94,4 ± 0,4	0,4	23,4	102,0 ± 2,3	2,3	20,3	96,9 ± 0,3	0,3
	41,1	92,7 ± 0,7	0,8	46,8	96,9 ± 0,5	0,5	40,6	99,8 ± 0,5	0,5

\*Concentração do padrão de vitamina (µg/mL) adicionado na amostra; \*\*Porcentagem de recuperação; Média ± Desvio Padrão (n = 3); \*\*\* Desvio Padrão Relativo: n=3; (-) Parâmetro não avaliado

já que não foram encontradas amostras líquidas contendo  $\beta$ -caroteno como fonte de vitamina A.

Na análise do material de referência, verificou-se menor recuperação dos analitos quando comparado com a análise em amostras fortificadas, porém, estes resultados também se mostraram satisfatórios, considerando a incerteza dos valores certificados. A exatidão dos resultados das análises no material de referência foi também confirmada pelo cálculo do Z-score, os quais apresentaram valores inferiores a dois, mostrando que a média das replicatas é estatisticamente equivalente ao valor de propriedade certificado (**Tabela 3**).

Os ensaios de recuperação em amostras fortificadas foram importantes para comprovar que não houve degradação significativa das vitaminas e do  $\beta$ -caroteno durante a extração, e as análises no material de referência demonstraram que a extração das vitaminas e do  $\beta$ -caroteno de uma matriz complexa foi efetiva, assegurando que o método apresenta recuperação adequada para todos os analitos.

#### Precisão

Os desvios padrão relativos variaram entre 0,2 e 9,6 % (**Tabela 2**), concluindo-se que os métodos atendem ao critério de repetitividade estabelecido em toda a faixa de trabalho, apresentando valores de RSD inferiores a 10 %.

#### Aplicação dos métodos validados em amostras comerciais

Foram analisadas dez amostras de suplementos vitamínicos comerciais, incluindo as matrizes drágeas, comprimidos, cápsulas gelatinosas duras e moles e soluções, de acordo com os métodos analíticos validados. Os picos cromatográficos foram identificados pelo tempo de retenção e confirmados pela comparação dos espectros de absorção das amostras com os dos padrões de cada vitamina (**Figura 2**). Ao comparar as concentrações de vitaminas analisadas em amostras comerciais com os valores declarados na informação nutricional da rotulagem, observaram-se discrepâncias até 64 % superiores e 89 % inferiores (**Tabela 4**). Dentre as vitaminas analisadas, as concentrações de vitamina B6 apresentaram maior nível de conformidade, onde a variação máxima entre os valores analisados e declarados foi de 20 %, tanto inferior quanto superior. As amostras em drágeas apresentaram valores analisados abaixo do declarado em quase todas as vitaminas, enquanto as amostras em comprimidos apresentaram valores próximos ou superiores aos declarados para a maioria das vitaminas. A sobredosagem de micronutrientes é permitida pela legislação para garantir as concentrações declaradas até o prazo final de validade<sup>20</sup>. Este fato pode justificar os valores acima do declarado em algumas amostras, porém, foram observadas amostras com concentrações abaixo dos valores declarados, principalmente para a vitamina A.

**Tabela 3.** Valores de referência, incerteza expandida (U), recuperação (%) e Z-score das análises em material de referência SRM 3280

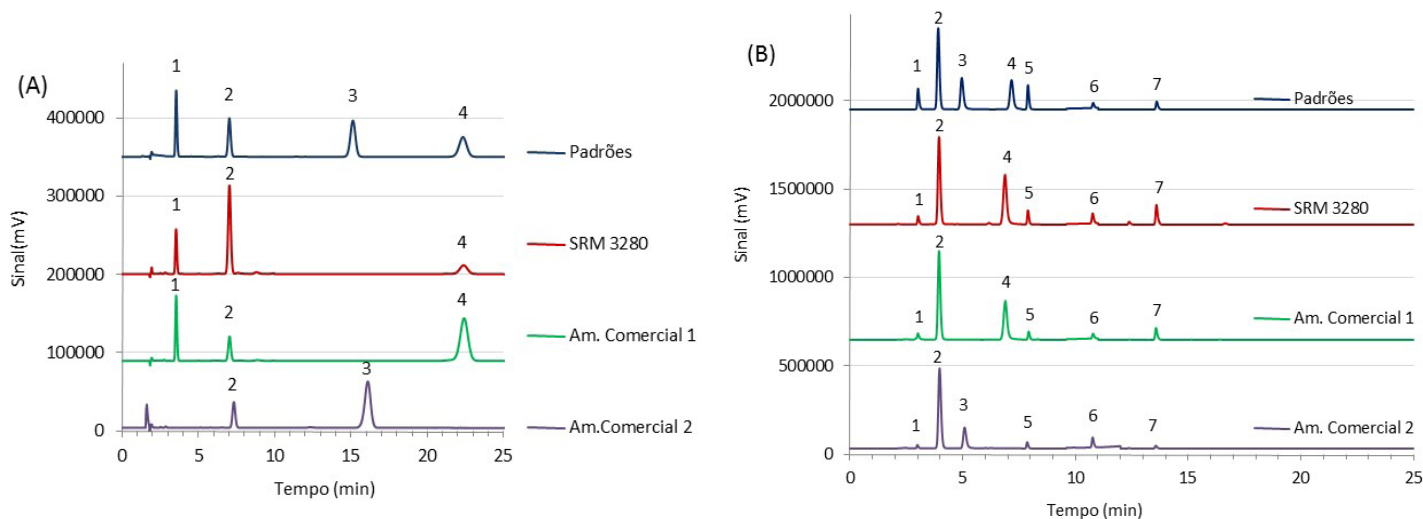
Analito	Valor de Referência	Incerteza do MRC	Valor analisado*	Recuperação*	Z-Score
Retinol ( $\mu\text{g/g}$ )	446	46	425,6 $\pm$ 12,8	95,9 $\pm$ 2,9	0,7986
$\alpha$ -Tocoferol (mg/g)	21,4	3,5	18,3 $\pm$ 0,5	85,6 $\pm$ 2,3	1,6197
$\beta$ -caroteno ( $\mu\text{g/g}$ )	420	100	394,3 $\pm$ 34,1	91,7 $\pm$ 8,1	0,8551
Ácido pantotênico (mg/g)	7,3	0,96	7,9 $\pm$ 0,04	107,7 $\pm$ 0,5	1,8843
B1 (mg/g)	1,06	0,12	1,15 $\pm$ 0,03	108,3 $\pm$ 2,8	1,6728
Nicotinamida (mg/g)	14,1	0,23	14,2 $\pm$ 0,3	100,5 $\pm$ 2,3	0,7865
Vitamina C (mg/g)	42,2	3,7	41,7 $\pm$ 0,3	98,7 $\pm$ 0,7	0,4629
B6 (mg/g)	1,81	0,17	1,94 $\pm$ 0,1	107,0 $\pm$ 3,2	1,3778

\*Média  $\pm$  Desvio Padrão (n = 6)

**Tabela 4.** Teores de vitaminas obtidos na análise e declarados em suplementos vitamínicos comerciais

Amostras	Vitaminas *													
	A	E	C	B1	B6	Ácido pantotênico	Nicotinamida	A	E	C	B1	B6	Ácido pantotênico	Nicotinamida
	va	vd	va	vd	va	vd	va	vd	va	vd	va	vd	va	vd
A - drágea	113,9 ± 0,5	ND	-	39,0 ± 0,3	-13	0,9 ± 0,02	-18	0,5 ± 0,01	0	2,3 ± 0,01	-54	11,9 ± 0,2	-8	
	600	nd	45	1,1	0,5	5	13							
B - drágea	66,2 ± 4,8	ND	-	33,7 ± 0,2	-25	0,8 ± 0,03	-27	0,4 ± 0,01	-20	1,6 ± 0,05	-68	11,8 ± 0,1	-9	
	600	nd	45	1,1	0,5	5	13							
C - caps gel dura	107,8 ± 11,1	7,8 ± 0,8	-22	42,4 ± 1,8	-6	1,2 ± 0,1	0	1,3 ± 0,01	0	5,3 ± 0,4	6	15,9 ± 0,3	-1	
	600	10	45	1,2	1,3	5	16							
D - comprimido	561,4 ± 11,4	9,6 ± 0,2	43	40,2 ± 1,7	-11	1,2 ± 0,04	0	1,4 ± 0,007	8	6,0 ± 0,1	20	14,0 ± 0,1	-13	
	400	6,7	45	1,2	1,3	5	16							
E - comprimido	705,2 ± 39,3	16,4 ± 0,7	64	45,7 ± 4,2	2	1,3 ± 0,08	8	1,3 ± 0,1	0	5,4 ± 0,5	8	14,6 ± 1,4	-9	
	600	10	45	1,2	1,3	5	16							
F - caps gel mole	358,8 ± 8,7	9,0 ± 0,3	34	45,9 ± 0,9	2	1,4 ± 0,03	17	1,29 ± 0,01	-1	4,9 ± 0,1	-2	6,9 ± 0,1	-57	
	400	6,7	45	1,2	1,3	5	16							
G - caps gel mole	109,9 ± 5,5	3,4 ± 0,1	-66	55,4 ± 0,9	23	1,6 ± 0,03	33	1,1 ± 0,08	-15	6,6 ± 0,2	32	ND	-	
	600	10	45	1,2	1,3	5	16							
H - caps gel mole	579,7 ± 25,7	8,3 ± 0,1	-17	43,2 ± 1,4	-4	ND	-	1,5 ± 0,03	20	5,4 ± 0,1	8	20,9 ± 0,8	31	
	600	10	45	nd	1,25	5	16							
I - solução	206,4 ± 9,8	2,3 ± 0,12	-8	20,5 ± 0,1	-32	0,6 ± 0,04	0	0,5 ± 0,001	-17	3,2 ± 0,1	7	8,9 ± 0,02	11	
	225	2,5	30	0,6	0,6	3	8							
J - solução	170,4 ± 7,0	ND	-	34,5 ± 0,8	15	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	
	200	nd	30	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	

va: valor obtido na análise (média ± dp, n=3); vd: valor declarado na informação nutricional; ≠ (%): porcentagem de diferença do valor analisado em relação ao valor declarado; ND: não detectado; nd: não declarado; porção: quantidade de suplemento/dia indicado pelo fabricante; \*µg RE/porção para vitamina A, mg α-TE/porção para vitamina E e mg/porção para outras vitaminas



**Figura 2.** (A) Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos padrões e de extratos de material de referência SRM 3280 e de amostras comerciais em etanol com BHT. Picos cromatográficos: (1) acetato de retinol monitorado a 325 nm, (2) acetato de  $\alpha$ -tocoferol monitorado a 284 nm, (3) palmitato de retinol monitorado a 325 nm e (4)  $\beta$ -caroteno monitorado a 450 nm. Condições cromatográficas descritas no item “metodologia”. (B) Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos padrões e de extratos de material de referência SRM 3280 e de amostras comerciais em tampão fosfato 0,05 M pH 3,0. Picos cromatográficos: (1) B1, (2) Vitamina C, (3) Ácido nicotínico, (4) Nicotinamida, monitorados a 254 nm, (5) B6 monitorado a 283 nm, (6) Ácido pantotênico monitorado a 209 nm, (7) B2 monitorado a 268 nm. Condições cromatográficas descritas no item “metodologia”

## CONCLUSÃO

A análise simultânea das vitaminas lipossolúveis acetato e palmitato de retinol e de  $\beta$ -caroteno se mostrou vantajosa, já que em muitas amostras de suplementos, o fabricante não declara qual é a fonte de vitamina A.

Foi possível quantificar simultaneamente quatro vitaminas hidrossolúveis normalmente presentes nos suplementos vitamínicos, utilizando uma técnica de extração simples e rápida para a quantificação da vitamina C.

Os métodos propostos se mostraram adequados para análise de vitaminas A, E, B1, C, nicotinamida, B6 e ácido pantotênico em diferentes matrizes de suplementos vitamínicos como comprimidos, drágeas, cápsulas duras, cápsulas gelatinosas moles e soluções.

Com o aumento da comercialização e do consumo de suplementos vitamínicos pela população, a implantação destes métodos será importante para a rotina de análise, tanto em laboratórios privados, para seu controle de qualidade, quanto em órgãos fiscalizadores, para monitoramento destes produtos.

## AGRADECIMENTO

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro (Processo nº 2013/23006-4).

## REFERÊNCIAS

1. Alves SCR, Navarro F. O uso de suplementos alimentares por frequentadores de academias de Potim/SP. *Rev Bras Nutr Esportiva*. 2010;4(20):139-46.
2. Fayh APT, Silva CV, Jesus FRD, Costa GK. Consumo de suplementos nutricionais por frequentadores de academias da cidade de Porto Alegre. *Rev Bras Ciênc Esporte*. 2013;35(1):27-37. [DOI: 10.1590/S0101-32892013000100004].



3. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 27, de 6 de agosto de 2010. Dispõe sobre as categorias de alimentos e embalagens isentos e com obrigatoriedade de registro sanitário. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 9 ago. 2010.
4. Abe-Matsumoto LT, Sampaio GR, Bastos DHM. Suplementos vitamínicos e/ou minerais: regulamentação, consumo e implicações à saúde. *Cad Saúde Pública*. 2015;31(7):1371-80. [DOI: 10.1590/0102-311X00177814].
5. Blake CJ. Status of methodology for the determination of fat-soluble vitamins in foods, dietary supplements, and vitamin premixes. *J AOAC Int*. 2007;90(4):897-910.
6. Blake CJ. Analytical procedures for water-soluble vitamins in foods and dietary supplements: a review. *Anal Bioanal Chem*. 2007;389:63-76. [DOI: 10.1007/s00216-007-1309-9].
7. Citová I, Havlíková L, Urbánek L, Solichová D, Nováková I, Solich P. Comparison of a novel ultra-performance liquid chromatographic method for determination of retinol and  $\alpha$ -tocoferol in human serum with conventional HPLC using monolithic and particulate columns. *Anal Bioanal Chem*. 2007;388(3):675-81. [DOI: 10.1007/s00216-007-1237-8].
8. Maldaner L, Jardim ICSF. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. *Quím Nova*. 2009;32(1):214-22. [DOI: 10.1590/S0100-40422009000100036].
9. Klimczak I, Gliszczynska-Świgło A. Comparison of UPLC and HPLC methods for determination of vitamin C. *Food Chem*. 2015;175:100-5. [DOI:10.1016/j.foodchem.2014.11.104].
10. Pei Chen P, Wolf WR. LC/UV/MS-MRM for the simultaneous determination of water-soluble vitamins in multi-vitamin dietary supplements. *Anal Bioanal Chem*. 2007;387:2441-8. [DOI: 10.1007/s00216-006-0615-y].
11. Wilson N, Shah N. P. Review Paper: Microencapsulation of Vitamins. *ASEAN Food Journal*. 2007;14(1):1-14.
12. National Institute of Standards and Technology – NIST. Standard Reference Material. [acesso 2015 Out 08]. Disponível em: [https://www-s.nist.gov/srmors/view\_detail.cfm?srm=3280].
13. Thomas JB, Sharpless KE, Yen JH, Rimmer CA. Determination of fat-soluble vitamins and carotenoids in standard reference material 3280 multivitamin/multielement tablets by liquid chromatography with absorbance detection. *J AOAC Int*. 2011;94(3):815-22.
14. Association of Official Analytical Chemists – AOAC. Official methods of analysis. 18<sup>th</sup> ed. Gaithersburg; 2005.
15. The United States Pharmacopeia – USP. 32<sup>nd</sup> ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention; 2009.
16. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005. Aprova o Regulamento Técnico sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de Proteína, Vitaminas e Minerais. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 23 set. 2005.
17. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO. DOQ-CGCRE-008-Orientação sobre validação de métodos analíticos. Rev 04. Rio de Janeiro (RJ): Coordenação Geral de Acreditação; 2011.
18. Kand'ár R, Novotná P, Drábková P. Determination of retinol,  $\alpha$ -tocopherol, lycopene, and  $\beta$ -carotene in human plasma using HPLC with UV-Vis detection: Application to a clinical study. *J Chem*. 2013; Article ID 460242, 7 p. [DOI: 10.1155/2013/460242].
19. Association of Official Analytical Chemists – AOAC. Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals, 2002. [acesso 2015 Mar 02]. Disponível em: [http://www.aoac.org/imis15\_prod/AOAC\_Docs/StandardsDevelopment/SLV\_Guidelines\_Dietary\_Supplements.pdf].
20. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 32, de 13 de janeiro de 1998. Aprova o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de suplementos vitamínicos e ou de minerais. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 15 jan. 1998.



# Pesquisa, identificação e perfil de suscetibilidade antimicrobiana de *Cronobacter* spp. em produtos destinados à alimentação infantil

## Detection, identification and antimicrobial susceptibility profile of *Cronobacter* spp. in products for infant feeding

RIALA6/1690

Gisele Olivieri Soares MEIER, Marcelo Luiz Lima BRANDÃO\*, Valéria de Mello MEDEIROS, Carla de Oliveira ROSAS, Débora Alves Ferreira da SILVA, Carla Trece CARVALHO, Cátia Cardoso da SILVA, Natália Scudeller UMEDA, Silvia Maria dos Reis LOPES

\*Endereço para correspondência: Laboratório de Alimentos e Saneantes, Setor de Alimentos, Departamento de Microbiologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Av. Brasil, 4365. Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, CEP: 21040-900. Tel: 21 3865 5161. E-mail: marcelollb8@gmail.com

Recebido: 18.09.2015 - Aceito para publicação: 05.01.2016

### RESUMO

*Cronobacter* spp. emergiu como perigo microbiológico em fórmulas infantis desidratadas (FID), responsável por infecções graves em neonatos. Contudo, muitos pacientes não ingeriram FID, o que indica que outros alimentos podem atuar como veículo do patógeno. Os objetivos deste estudo foram pesquisar *Cronobacter* spp. em alimentos infantis, identificar as espécies e avaliar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos das cepas isoladas. Foram analisadas 47 amostras pré-cozidas de cereais à base de grãos, amidos de milho e farinhas lácteas. A pesquisa foi realizada com pré-enriquecimento em água peptonada tamponada, enriquecimento seletivo no *Cronobacter* Screening Broth, isolamento por meio de *Enterobacter sakazakii* Isolation Agar e identificação no Vitek 2.0. A identificação das espécies foi realizada por reação em cadeia pela polimerase com alvo nos genes *rpoB* e *cgcA*. O antibiograma foi realizado pelo método de difusão em ágar (Kirby-Bauer). *Cronobacter* spp. foi identificada em 11 amostras (23,4 %). Oito cepas foram identificadas como *C. sakazakii* (72,7 %), duas como *C. malonaticus* (18,2 %) e uma como *C. dublinensis* (9,1 %). Apenas uma cepa de *C. malonaticus* apresentou resistência intermediária a ciprofloxacina. Os produtos destinados à alimentação infantil avaliados podem apresentar risco, no caso destes alimentos serem ingeridos por pacientes pertencentes ao grupo de risco, como neonatos e idosos.

**Palavras-chave.** *Cronobacter*, alimentos infantis, antibiograma, PCR.

### ABSTRACT

*Cronobacter* spp. emerged as a microbiological hazard in powdered infant formulas (PIF) causing severe infections in newborns. However, among these patients many of them had not ingested PIF indicating that other foods categories might be as the pathogen vehicle. This study aimed at investigating *Cronobacter* spp. in infant foods, identifying the species and evaluating the antimicrobial susceptibility profile of the isolated strains. Forty-seven samples of precooked grain-based cereals, corn starch and milk flours were analyzed. The microbiological analysis was performed with pre-enrichment in buffered peptone water, followed by selective-enrichment in *Cronobacter* Screening Broth, isolation in *Enterobacter sakazakii* Isolation Agar and identification in Vitek 2.0. The identification of species was performed by polymerase chain reaction targeting *rpoB* and *cgcA* genes. The antibiogram was carried out using the agar diffusion method (Kirby-Bauer). *Cronobacter* spp. was identified in 11 samples (23.4 %). Eight strains were identified as *C. sakazakii* (72.7 %), two as *C. malonaticus* (18.2 %) and one as *C. dublinensis* (9.1 %). Only one *C. malonaticus* strain showed an intermediate resistance to ciprofloxacin. The evaluated samples produced for infant feeding might cause hazard when ingested by patients belonging to the risk group as newborns and elderly.

**Keywords.** *Cronobacter*, infant food, antibiogram, PCR.

## INTRODUÇÃO

O gênero *Cronobacter* pertence à família *Enterobacteriaceae* e é composto por sete espécies: *Cronobacter sakazakii*, *Cronobacter malonaticus*, *Cronobacter dublinensis*, *Cronobacter turicensis*, *Cronobacter muytjensii*, *Cronobacter universalis* e *Cronobacter condimenti*<sup>1</sup>. Contudo, apenas as seis primeiras supracitadas foram associadas a casos de infecções<sup>2</sup>. *Cronobacter* spp. emergiu como perigo microbiológico em fórmulas infantis desidratadas (FID) causando infecções em crianças, particularmente em neonatos de baixo peso ou imunodeficientes<sup>3</sup>. As síndromes clínicas incluem enterocolite necrosante, bacteremia e meningite, com taxa de mortalidade variando de 10-41,9 % e os sobreviventes podem apresentar sequelas graves<sup>4</sup>.

A meningite bacteriana em neonatos necessita de tratamento rápido e eficiente, levando a uma preocupação quanto à suscetibilidade aos antimicrobianos nas infecções por *Cronobacter* spp.<sup>4,5</sup>. A antibioticoterapia utilizando as combinações ampicilina/gentamicina<sup>6</sup> ou meropenem/amicacina<sup>7</sup> são exemplos de procedimentos empíricos adotados no tratamento inicial de suspeita de infecção por *Cronobacter* spp. Entretanto, alguns autores já relataram o isolamento de cepas de *Cronobacter* spp. resistentes a essas drogas<sup>5,7,8</sup>. Cepas resistentes a outros antimicrobianos como cefalotina<sup>6</sup>, cefoxitina<sup>8</sup>, ceftazidima<sup>9</sup>, eritromicina<sup>10</sup> e tetraciclina<sup>10,11</sup> também já foram identificadas. Estes dados demonstram que existe variabilidade no perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos entre as cepas de *Cronobacter* spp., demonstrando a importância de se conhecer este perfil de resistência, de forma a identificar as classes de antimicrobianos que apresentem ação rápida e eficiente no tratamento das infecções.

Surtos causados por *Cronobacter* spp. já foram reportados em diversos países<sup>3</sup>, incluindo o Brasil<sup>9,12</sup>. Contudo, em muitos surtos o veículo de contaminação não pôde ser identificado e muitos pacientes não ingeriram FID, o que leva a crer que outras fontes poderiam ser o veículo de contaminação deste patógeno<sup>3,13</sup>. *Cronobacter*

spp. já foi isolada de uma série de produtos alimentícios, incluindo produtos destinados a alimentação infantil como cereais, amido de milho e outras misturas<sup>10,14,15</sup>.

Apesar das infecções por *Cronobacter* spp. estarem, a princípio, associadas a neonatos, já existem diversos relatos de casos de infecção em crianças com mais de seis meses e adultos<sup>13,16,17</sup>. Em um estudo realizado nos Estados Unidos, a incidência de casos de infecções por *Cronobacter* spp. foi estimada em 0,66 casos/100.000 habitantes, sendo crianças com idade menor de 5 anos e idosos os mais afetados<sup>16</sup>. O relato de casos de infecções nestes grupos sugere que existem potenciais fontes de contaminação por *Cronobacter* spp. nos alimentos ingeridos por estes indivíduos. Pacientes idosos, principalmente os que apresentam disfagia, ingerem alimentos semissólidos na sua dieta, como papas e mingaus de cereais<sup>17</sup>. Logo, a presença de *Cronobacter* spp. nestes tipos de alimentos pode representar um risco a estes indivíduos<sup>10,14,15</sup>. Outro problema é o uso incorreto destes produtos na alimentação de crianças com idade inferior a recomendada pelo fabricante, uma vez que muitas famílias não adquirem FID devido ao alto custo e/ou falta de conhecimento do risco do uso destes alimentos na idade inadequada<sup>18</sup>.

Devido a indicação de que outros alimentos infantis além das FID podem atuar como veículos de contaminação em casos de infecções por *Cronobacter* spp., os objetivos deste estudo foram pesquisar e identificar as espécies de *Cronobacter* em cereais pré-cozidos à base de grãos variados, farinhas lácteas e amidos de milho e avaliar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos das cepas isoladas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras

No período de março a maio de 2015, foram analisadas 47 amostras de alimentos industrializados destinados à alimentação infantil de 12 marcas distintas. As amostras foram coletadas de forma aleatória e em diferentes estabelecimentos comerciais (supermercados, drogarias, entre outros) localizados nos

municípios do Rio de Janeiro e Niterói do Estado do Rio de Janeiro. A escolha das marcas foi de acordo com a disponibilidade no comércio durante o período de análises. Deste total, 16 amostras eram à base de cereais variados (TU1-16), 11 de cereais à base de arroz (AR1-11), nove de cereais à base de milho (MI1-9), duas de cereais à base de aveia (AV1-2), quatro de farinhas lácteas (FL1-4) e cinco misturas para preparo de mingaus à base de amido de milho (AM1-5). As amostras foram mantidas em temperatura ambiente e enviadas para o laboratório para análise.

### Análise microbiológica

A pesquisa de *Cronobacter* spp. foi realizada de acordo com Iversen et al<sup>19</sup>. Vinte e cinco gramas da amostra foram pesados em um saco plástico *Whirl-Pak* (Nasco, EUA), seguido da adição de 225 mL de água peptonada tamponada (Merck, Alemanha) e homogeneização em *Stomacher* durante 60 s. Após incubação a 35 °C/24 h, uma alíquota de 0,1 mL foi adicionada a 10 mL de *Cronobacter Screening Broth* contendo vancomicina (CSB/v;Oxoid, Inglaterra) e este incubado a 42 °C/24-48 h. Posteriormente, as amostras que apresentaram alteração da coloração do meio para amarelo foram semeadas em *Enterobacter sakazakii Isolation Agar* (ESIA; AES-Chemunex, França) e as placas incubadas a 44 °C/24 h. As colônias características foram isoladas em ágar nutriente (BD, EUA) e submetidas à confirmação no sistema Vitek 2.0 (bioMérieux, França), de acordo com as instruções do fabricante.

As cepas de *C. sakazakii* ATCC 29544 (INCQS 00578) e de *Escherichia coli* ATCC 25922 (INCQS 00033) foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente, dos meios de cultivo utilizados nas análises microbiológicas. A cepa de *C. sakazakii* também foi utilizada como controle positivo dos testes utilizados na caracterização fenotípica.

### Identificação das espécies

Para a identificação das espécies de *Cronobacter* foram utilizados dois protocolos de reação em cadeia pela polimerase (PCR),

sendo um com alvo no gene *rpoB*<sup>20,21</sup> e outro *Multiplex* (M-PCR) com alvo no gene *cgcA*<sup>22</sup>. Os iniciadores, condições de amplificação e tamanho dos fragmentos amplificados para cada espécie estão descritos na **Tabela 1**.

A extração de DNA foi realizada com o kit *Dnasy Blood & Tissue* (Qiagen, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de DNA foi dosada em espectrofotômetro NanoDrop-2000c (ThermoScientific, EUA). As reações foram preparadas em um volume total de 25 µL contendo: 5 µL de DNA molde (20-60ng/µl), 5,0 pmol de cada iniciador e *PCR MasterMix1X* (ThermoScientific, EUA). A amplificação foi realizada no *Simpli Amp Thermal Cycler* (AppliedBiosystems, Singapore).

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5 % a 100 V/50 min. Após, o gel foi corado em solução de brometo de etídio 0,5 µg/mL (Sigma, EUA) por 15 min e visualizado em analisador de imagens (GE-Healthcare, Inglaterra).

Água livre de DNase/RNase (BioBasic, Canadá) foi utilizada como controle negativo em cada reação. O DNA extraído das cepas de referência *C. sakazakii* ATCC 29544 (INCQS 00578), *C. malonaticus* LMG 23826 (INCQS 00619), *C. turicensis* LMG 23827 (INCQS 00615), *C. muytjensii* ATCC 51329 (INCQS 00579), *C. dublinensis* LMG 23823 (INCQS 00618) e *C. universalis* NCTC 9529 (INCQS 00599) foi utilizado como controle positivo em cada reação específica.

### Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

As cepas identificadas como *Cronobacter* spp. foram avaliadas quanto ao perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos pelo método de difusão (Kirby-Bauer) em ágar Mueller-Hinton (Oxoid, Inglaterra) seguindo os critérios do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015)<sup>23</sup>. Foram testados os antimicrobianos (BIO-RAD Laboratories Inc, França) recomendados para avaliação de cepas da família *Enterobacteriaceae*, nas seguintes

**Tabela 1.** Iniciadores e condições de amplificação para pesquisa dos genes *rpoB* e *egcA* nas cepas de *Cronobacter* spp

Gene alvo	Micro-organismo alvo	Iniciadores	Condições de amplificação	Tamanho (pb)	Referência		
<i>rpoB</i>	<i>C. sakazakii</i> e <i>C. malonaticus</i>	Csakf: ACGCCAAGCCATATCTCCGGG Csakr: ACGGTTGGCGTCATCGTG	94 °C-5 min; 30x(94 °C-1 min, 67 °C-30 s, 72 °C-1 min); 72 °C-5 min	514	Stoop et al <sup>20</sup>		
	<i>C. malonaticus</i>	Cmalf: CGTCGTATCTCTGCTCTC Cmalr: AGGTTGGTGTTCGCCCTGA	94 °C-5 min; 30x(94 °C-1 min, 60 °C-30 s, 72 °C-30 s); 72 °C-5 min	251			
	<i>C. turicensis</i>	Cturf: CCGTAAAAGAGTTCTTCGGC Cturr: GTACCGCCACGTTTCGCC	94 °C-5 min; 30x(94 °C-1 min, 61 °C-30 s, 72 °C-1 min); 72 °C-5 min	628			
	<i>C. dublinensis</i>	Cdubl f: GCACAAGGTCGTATCTCC Cdubl r: TTGGCGTCATCGTGTCC	94 °C-5 min; 30x(94 °C-1 min, 62 °C-3 s, 72 °C-30 s); 72 °C-5 min	418			
	<i>C. muytjensii</i>	Cmuyf: TGTCCGTGTATGCCAGACC Cmuyr: TGTTCCGACCCATCAATGCG	94 °C-5 min; 30x(94 °C-1 min, 61 °C-30 s, 72 °C-30 s); 72 °C-5 min	289			
	<i>C. universalis</i>	Cgenom f: ACAAAAGTCGTATCTTGCG Cgenom r: AGCACGTTCCATACCGGTC	94 °C-5 min; 30x(94 °C-1 min, 61 °C-30 s, 72 °C-30 s); 72 °C-5 min	506			
	<i>C. condimentii</i>	Ccon-f: AACGCCAAAGCCAATCTCG Ccon-r: GTACCGCCACGTTTGTCT	95 °C-2 min; 30x(95 °C-1 min, 58 °C-30 s, 72 °C-1 min); 72 °C-5 min	689			
	<i>egcA</i>	<i>C. dublinensis</i>	Cdub-40F: GATACCTCTCTGGCCGCGCAGC Cdm-469R <sup>a</sup> : CCACATGGCCGATATGCACGCC			430	Lehner et al <sup>21</sup>
		<i>C. muytjensii</i>	Cmuy-209F: TTCTTCAGGGGGAGCTGACCT			260	
		<i>C. turicensis</i>	Cmstu-825F <sup>b</sup> : GGTGGCSGGGTATGACAAAAGAC Ctur-1036R: TCGCCATCGAGTGCAGCGTAT	94 °C-3 min; 25x(94 °C-30 s, 58 °C-30 s, 72 °C-1 min); 72 °C-5 min		211	
<i>C. universalis</i>			Cuni-1133R: GAAACAGGCTGTCCGGTCCAGC	308			
<i>C. sakazakii</i>		Csak-1317R: GGCGGACGAAGCCCTCAGAGAGT		492			
<i>C. malonaticus</i>		Cmal-1410R: GGTGACCACACCTTCAGGCAGAGA		585			

<sup>a</sup>- O iniciador Cdm-469R é utilizado no M-PCR em conjunto com os iniciadores Cdub-40F e Cmuy-209F para identificar as cepas de *C. dublinensis* e *C. muytjensii*, respectivamente;  
<sup>b</sup>- O iniciador Cmstu-825F é utilizado no M-PCR em conjunto com os iniciadores Ctur-1036R, Cuni-1133R, Csak-1317R e Cmal-1410R para identificar as cepas de *C. turicensis*, *C. universalis*, *C. sakazakii* e *C. malonaticus*, respectivamente.

concentrações: ampicilina-sulbactam (SAM; 10/10 µg), amoxicilina-clavulanato (AMC; 20/10 µg), ceftriaxona (CRO; 30 µg), tetraciclina (TE; 30 µg), ciprofloxacina (CIP; 5 µg) e sulfametoxazol-trimetoprima (SXT; 1,25/23,75 µg). O diâmetro da zona de inibição foi mensurado e as cepas classificadas como sensível, intermediária ou resistente de acordo com as recomendações do CLSI<sup>23</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

*Cronobacter* spp. foi detectada em 11 (23,4 %) das 47 amostras analisadas. A maior ocorrência foi observada em amostras à base de aveia (100,0 %) e arroz (54,5 %), seguido de farinha láctea (25,0 %) e de cereal à base de milho (11,1 %). Apenas uma amostra à base de cereais variados (TU1), composta por aveia e arroz, apresentou contaminação pelo micro-organismo. Nenhuma amostra de mistura à base de amido de milho apresentou contaminação (Tabela 2). O isolamento desta bactéria nestes tipos de alimentos já foi reportado anteriormente, com uma ocorrência variando de 11,2-45,0 %<sup>10,15,24</sup>. No Brasil, Freitas et al<sup>15</sup> isolaram *Cronobacter* spp. em amostras de alimentos infantis a base de farinha de milho, mas, em contraste, não detectaram em amostras à base de arroz e aveia.

O uso do CSB/v permite a decisão de liberar amostras negativas após 48 h do início do ensaio<sup>19</sup>. Neste estudo, 17 amostras não apresentaram viragem da coloração do meio

e, portanto, não foram submetidas à etapa de isolamento. Após a semeadura das amostras positivas no meio de cultura ESIA, observaram-se colônias características em 12 amostras e 11 foram confirmadas como *Cronobacter* spp. pelo Vitek 2.0. A cepa não confirmada foi isolada da amostra AR6 e identificada como *Enterobacter aerogenes* - bionúmero 0607736151720011. O isolamento de outras enterobactérias que também apresentam atividade α-glicosidase já foi relatado, o que demonstra a importância do uso de técnicas confiáveis para identificação de *Cronobacter* spp. após o isolamento nos meios cromogênicos<sup>19,25</sup>.

As instruções nos rótulos das amostras AR3, AR4, AR8, AR9, AR11, MI5, TU1, AV1 e AV2, que apresentaram contaminação por *Cronobacter* spp., informam que estes alimentos são pré-cozidos e não necessitam de aquecimento antes do consumo, indicando o uso de leite ou água para sua reconstituição. De acordo com Richard et al<sup>26</sup>, populações muito baixas de *Cronobacter* spp. podem se multiplicar rapidamente em cereais infantis à base de arroz reconstituídos com água ou leite. Desta forma, o risco aumenta se a mistura for preparada e mantida a temperatura ambiente por longos períodos. De acordo com a revisão na literatura realizada por Osaili e Forsythe<sup>27</sup>, bactérias do gênero *Cronobacter* quando presentes em produtos desidratados por longos períodos apresentam maior resistência à temperatura. Contudo, os trabalhos levantados

**Tabela 2.** Ocorrência de *Cronobacter* spp. em amostras de produtos destinados à alimentação infantil

Produto	CSB/v <sup>a</sup>	ESIA <sup>b</sup>	Vitek 2.0 <sup>c</sup>	N.º amostras positivas (%)
À base de cereais variados	8/16	1/8	1/1	1(6,3)
À base de arroz	9/11	7/9	6/7	6(54,5)
À base de milho	3/9	1/3	1/1	1(11,1)
À base de aveia	2/2	2/2	2/2	2(100,0)
Farinha láctea	4/4	1/4	1/1	1(25,0)
Amido de milho	4/5	0/4	NR <sup>d</sup>	0(0)
<b>Total</b>	<b>30/47</b>	<b>12/30</b>	<b>11/12</b>	<b>11(23,4)</b>

<sup>a</sup>n.º de amostras em que houve viragem da coloração do meio para amarelo/n.º total de amostras analisadas; <sup>b</sup>n.º de amostras que apresentaram colônias características/n.º amostras semeadas; <sup>c</sup>n.º de amostras confirmadas como *Cronobacter* spp./n.º amostras testadas; <sup>d</sup>não realizado

pelos autores mostram que *Cronobacter* spp. não sobrevive a tratamentos térmicos como de 58 °C por 32 s em FID reconstituídas artificialmente contaminadas. Estas características do micro-organismo sugerem que a contaminação nos produtos destinados a alimentação infantil analisados neste estudo possa ter ocorrido porque o binômio tempo/temperatura ou algum outro processo utilizado pelos produtores no pré-cozimento, como por exemplo, a extrusão, não seja suficiente para eliminação do patógeno. Outra possibilidade é que a contaminação ocorra em etapas após este tratamento térmico, uma vez que *Cronobacter* spp. já foi isolada de amostras de superfícies de ambientes de fábrica<sup>28</sup>, indicando que o micro-organismo pode estar presente nestes ambientes.

A ingestão de alimentos destinados à alimentação infantil, contaminados por *Cronobacter* spp., por indivíduos pertencentes ao grupo de risco (ex.: neonatos com menos de seis meses e idosos) representa um perigo em potencial. Logo, os consumidores devem estar atentos aos rótulos dos produtos para ofertá-los as crianças apenas da idade recomendada. A aplicação de um tratamento térmico antes do consumo poderia ser uma alternativa para tentar eliminar a contaminação pelo patógeno nestes produtos. Além disso, em ambientes que

se preparam diferentes categorias de alimentos infantis, como aqueles que são ofertados para crianças com menos de seis meses, cuidados devem ser tomados para evitar contaminação cruzada.

Das 11 cepas de *Cronobacter*, oito (72,7 %) foram identificadas como *C. sakazakii*, duas (18,2 %) como *C. malonaticus* e uma (9,1 %) como *C. dublinensis*. Ambos os protocolos da PCR apresentaram os mesmos resultados na identificação das espécies de *Cronobacter*. Estes resultados foram similares aos de outros estudos que também relataram maior ocorrência da espécie *C. sakazakii* em produtos alimentícios e em outras fontes<sup>10,24</sup>.

As cepas apresentaram nove fenótipos distintos baseados no perfil do Vitek 2.0. As cepas da espécie *C. sakazakii* foram agrupadas em sete fenótipos distintos (A, B, C, D, F, G e I), sendo as cepas C163 e C171 agrupadas no mesmo fenótipo. A cepa de *C. sakazakii* C168 apresentou o mesmo fenótipo da cepa C173 identificada como *C. malonaticus*. Este resultado não é incomum, pois estas duas espécies são muito próximas geneticamente e inicialmente foram descritas como pertencentes à mesma espécie<sup>2</sup>. A cepa *C. malonaticus* C177 e *C. dublinensis* C175 apresentaram fenótipos únicos (**Tabela 3**).

**Tabela 3.** Caracterização fenotípica e molecular dos isolados de *Cronobacter* spp

Amostra	Identificação do isolado	Perfil Vitek 2.0		Caracterização molecular	
		Bionúmero	Fenótipo	PCR <i>rpoB</i>	M-PCR <i>cgA</i>
TU1	C163	0625734151622010	A	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>
AR3	C167	0625734151722010	B	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>
AR4	C168	0607737151720010	C	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>
AR7	C171	0625734151622010	A	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>
AR8	C174	0607736151720011	D	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>
AR9	C175	0625734353722010	E	<i>C. dublinensis</i>	<i>C. dublinensis</i>
AR11	C176	0621736051222010	F	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>
AV1	C165	0621736053222010	G	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>
AV2	C177	0627734053622010	H	<i>C. malonaticus</i>	<i>C. malonaticus</i>
MI5	C169	0625736153222011	I	<i>C. sakazakii</i>	<i>C. sakazakii</i>
FL2	C173	0607737151720010	C	<i>C. malonaticus</i>	<i>C. malonaticus</i>

Na avaliação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos, das 11 cepas isoladas, 10 foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados. Somente a cepa *C. malonaticus* C173, isolada de amostra à base de farinha láctea (FL02), apresentou resistência intermediária a ciprofloxacina. Resultados similares foram relatados por outros autores que isolaram de alimentos cepas de *Cronobacter* spp. susceptíveis a maioria dos antimicrobianos testados<sup>14,29-31</sup>. Kilonzo-Nthenge et al<sup>11</sup> isolaram cepas da espécie *C. sakazakii* de cozinhas domésticas resistentes a ciprofloxacina. Os resultados do presente estudo sugerem que cepas de *Cronobacter* spp. isoladas de alimentos apresentam baixo potencial de resistência aos antimicrobianos.

## CONCLUSÃO

*Cronobacter* spp. foi detectada em produtos destinados a alimentação infantil com maior ocorrência em produtos à base de aveia e arroz. Foram identificadas três espécies de *Cronobacter*, sendo a maioria das cepas pertencentes a espécie *C. sakazakii*. Conclui-se que estes alimentos representam um risco caso sejam ingeridos por indivíduos como neonatos com menos de seis meses e idosos. No caso decorrer de uma investigação epidemiológica durante um surto causado por *Cronobacter* spp., estes tipos de alimentos devem ser considerados como uma fonte potencial de contaminação caso tenham sido ingeridos pelos indivíduos acometidos. Estudos futuros de análise de risco quanto à ingestão destes alimentos por indivíduos pertencentes ao grupo de risco devem ser considerados pelos órgãos de Vigilância em Saúde.

## AGRADECIMENTOS

Ao INCQS/Fiocruz pelo financiamento deste estudo e ao programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do INCQS/Fiocruz no qual Gisele Meier é residente.

## REFERÊNCIAS

1. Nomenclature-Genus *Cronobacter*. 2017. [acesso 2017 03 Jan]. Disponível em: [http://www.bacterio.net/cronobacter.html].
2. Joseph S, Sonbol H, Hariri S, Desai P, McClelland M, Forsythe SJ. Diversity of the *Cronobacter* genus as revealed by multi locus sequence typing. *J Clin Microbiol*. 2012;50(9):3031-9. [DOI: 10.1128/JCM.00905-12].
3. Food and Agricultural Organization/World Health Organization (FAO/WHO). *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in powdered follow-up formulae. Meeting Report. Microbiological Risk Assessment Geneva, WHO, 2008. (15),90 p.
4. Friedemann M. Epidemiological of invasive *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009;28(11):1297-304. [DOI: 10.1007/s10096-009-0779-4].
5. Lai KK. *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children and adults. Case reports and a review of the literature. *Medicine (Baltimore)*. 2001;80 (2):113-22.
6. Asato VC, Vilches VE, Pineda MG, Casanueva E, Cane A, Moroni MP, et al. First clinical isolates of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in Argentina: characterization and subtyping by pulsed-field gel electrophoresis. *Rev Argent Microbiol*. 2013;45(3):160-4.
7. Broge T, Lee A. A case of *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) bacteremia in a breastfed infant. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2013;2(4):e1-2. [DOI: 10.1093/jpids/pit021].
8. Kim JB, Cho SH, Park YB, Lee JB, Kim JC, Lee BK, et al. Surveillance of stool samples for the presence of *Enterobacter sakazakii* among Korean people. *Yonsei Med J*. 2008;49(6):1017-22. [DOI: https://doi.org/10.3349/ymj.2008.49.6.1017].
9. Barreira ER, Souza DC, Gois PF, Fernandes JC. Meningite por *Enterobacter sakazakii* em recém-nascido: relato de caso. *Pediatria (São Paulo)*. 2003;25(1/2):65-70.



10. Hochel I, Růžičková H, Krásný L, Demnerová K. Occurrence of *Cronobacter* spp. in retail foods. *J Appl Microbiol*. 2012; 112(6):1257-65. [DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05292.x].
11. Kilonzo-Nthenge A, Rotich E, Godwin S, Nahashon S, Chen F. Prevalence and antimicrobial resistance of *Cronobacter sakazakii* isolated from domestic kitchens in middle Tennessee, United States. *J Food Prot*. 2012;75 (8): 1512-7. [DOI: <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-442>].
12. Brandão ML, Umeda NS, Carvalho KR, Filippis I. Investigação de um surto causado por *Cronobacter malonicus* em um hospital maternidade em Teresina, Piauí: caracterização e tipificação por eletroforese em gel de campo pulsado. *Vigil Sanit Debate*. 2015;3(3):91-6. [DOI: <http://dx.doi.org/10.3395/2317-269x.00290>].
13. Tsai HY, Liao CH, Huang YT, Lee PI, Hsueh PR. *Cronobacter* infections not from infant formula, Taiwan. *Emerg Infect Dis*. 2013;19(1):167-9. [DOI: 10.3201/eid1901.120774].
14. Molloy C, Cagney C, O'Brien S, Iversen C, Fanning S, Duffy G. Surveillance and characterization by pulsed-field gel electrophoresis of *Cronobacter* spp. in farming and domestic environments, food production animals and retail foods. *Int J Food Microbiol*. 2009;136(2):198-203. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.007>].
15. Freitas LG, Ristori CA, Jakabi M, Paula AMR, Rowlands REG. Ocorrência de *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) em alimentos infantis adquiridos em um hospital público. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2011;70(4):548-53.
16. Patrick ME, Mahon BE, Greene SA, Rounds J, Cronquist A, Wymore K, et al. Incidence of *Cronobacter* spp. Infections, United States, 2003-2009. *Emerg Infect Dis*. 2014;20(9):1520-3. [DOI: 10.3201/eid2009.140545].
17. Gosney MA, Martin MV, Wright AE, Gallagher M. *Enterobacter sakazakii* in the mouths of stroke patients and its association with aspiration pneumonia. *Eur J Intern Med*. 2006;17(3):185-8. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejim.2005.11.010>].
18. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Edital de Chamamento n.º 2, de 29 de julho de 2014. Edital de Chamamento para coletar dados e informações a respeito do risco de infecções de lactantes maiores de seis meses por *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.). Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 30 de jul. 2014. Seção 3, nº144. p.92-93.
19. Iversen C, Druggan P, Schumacher S, Lehner A, Feer C, Gschwend K, et al. Development of a novel screening method for the isolation of "Cronobacter" spp. (*Enterobacter sakazakii*). *Appl Environ Microbiol*. 2008; 74 (8):2550-3. [DOI: 10.1128/AEM.02801-07].
20. Stoop B, Lehner A, Iversen C, Fanning S, Stephan R. Development and evaluation of rpoB based PCR systems to differentiate the six proposed species within the genus *Cronobacter*. *Int J Food Microbiol*. 2009;136(2):165-8. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.023>].
21. Lehner A, Fricker-Feer C, Stephan R. Identification of the recently described *Cronobacter condimenti* by an rpoB-gene-based PCR system. *J Med Microbiol*. 2012;61(Pt 7):1034-5. [DOI: 10.1099/jmm.0.042903-0].
22. Carter L, Lindsey LA, Grim CJ, Sathyamoorthy V, Jarvis KG, Gopinath G, et al. Multiplex PCR assay targeting a diguanylate cyclase-encoding gene, *cgcA*, to differentiate species within the genus *Cronobacter*. *Appl Environ Microbiol*. 2013;79(2):734-7. [DOI: 10.1128/AEM.02898-12].

23. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-Fifth Informational Supplement, Wayne, PA, USA. 2015;35(3):M100-S15.
24. Singh N, Goel G, Raghav M. Prevalence and characterization of *Cronobacter* spp. from various foods, medicinal plants, and environmental samples. *Curr Microbiol*. 2015;71(1):31-8. [DOI: 10.1007/s00284-015-0816-8].
25. Warnken MB, Brandao MLL, Souza AE, Romão CMCP, Nogueira ACMA, Destro MT. Phenotypic profiles and detection of target genes by PCR in isolates from different sources and reference strains, identified as *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*). *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2012;71 (1):21-31.
26. Richards, GM, Gurtler JB, Beuchat LR. Survival and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant rice cereal reconstituted with water, milk, liquid infant formula, or apple juice. *J Appl Microbiol*. 2005;99(4):844-50. [DOI: 10.1111/j.1365-2672.2005.02656.x].
27. Osaili T, Forsythe S. Desiccation resistance and persistence of *Cronobacter* species in infant formula. *Int J Food Microbiol*. 2009;136(2):214-20. [DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.006].
28. Jacobs C, Braun P, Hammer P. Reservoir and routes of transmission of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in a milk powder-producing plant. *J Dairy Sci*. 2011;94(8):3801-10. [DOI: http://dx.doi.org/10.3168/jds.2011-4318].
29. Lee YD, Park JH, Chang H. Detection, antibiotic susceptibility and biofilm formation of *Cronobacter* spp. from various foods in Korea. *Food Control*. 2012;24(1-2):225-30. [DOI: 10.1016/j.foodcont.2011.09.023].
30. Xu X, Li C, Wu Q, Zhang J, Huang J, Yang G. Prevalence, molecular characterization, and antibiotic susceptibility of *Cronobacter* spp. in Chinese ready-to-eat foods. *Int J Food Microbiol*. 2015;204:17-23. [DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.003].
31. Terragno R, Salve A, Pichel M, Epszteyn S, Brengi S, Binsztein N. Characterization and subtyping of *Cronobacter* spp. from imported powdered infant formulae in Argentina. *Int J Food Microbiol*. 2009;136(2):193-7. [DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.10.013].



# Microbiological quality of Brazilian artisanal cheese and fermented sausages

## Qualidade microbiológica de queijos e salames artesanais brasileiros

RIALA6/1691

Elisa Hizuru Uemura YAMANAKA<sup>1\*</sup>, Laura Lucia COGO<sup>2</sup>, Patrícia do Rocio DALZOTO<sup>3</sup>, Ida Chapaval PIMENTEL<sup>1</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia, Parasitologia e Patologia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba. Rua Professor Dário Veloso, 113, Ap. 401, Curitiba, PR, Brasil. CEP: 80320-050. Tel: 41 3078 5833; 99182 4575. E-mail: elisauem@gmail.com

<sup>2</sup>Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR

<sup>3</sup>Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR

Recebido: 07.07.2015 - Aceito para publicação: 04.02.2016

### ABSTRACT

Cheeses and sausages are ready-to-eat foods, and the products prepared by artisanal process are susceptible to microbial contamination. Few studies on the quality of foods from different Brazilian regions have been done. In this context, this study aimed at evaluating the microbiological quality of 32 cheese and 13 sausages samples purchased from artisanal food stores or producers markets located in the metropolitan areas of 10 capital cities of Brazilian states. Microbiological analyses were performed to determine the counts of microbial contamination indicators, including *Escherichia coli* and coagulase-positive staphylococci, as well as for evaluating the presence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. using bacteriological methods. *E. coli* was detected in 50.0 % of samples, coagulase-positive staphylococci in 34.4 %, and *Salmonella* spp. in 6.3 % of cheese samples. In fermented sausage samples, coagulase-positive staphylococci were isolated from 23.1 % samples and *Salmonella* spp. from 7.7 %. According to the Brazilian Sanitary Legislation, 63.0 % of cheese samples and 23.0 % of artisanal fermented sausage samples from the metropolitan areas of 10 Brazilian capital cities were unsuitable for consumption, indicating the importance of conducting the close monitoring of these foods and the application of the effective measures for preventing food-borne outbreaks.

**Keywords.** *Escherichia coli*, coagulase-positive *Staphylococcus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, food microbiology.

### RESUMO

Queijos e salames são alimentos prontos para consumo e quando artesanalmente produzidos são suscetíveis à contaminação microbiana. A importância deste estudo em dez capitais brasileiras deve-se à carência de dados obtidos simultaneamente abrangendo-se diferentes regiões do Brasil. O objetivo do presente trabalho foi de avaliar a qualidade microbiológica de 32 amostras de queijos e 13 de salames artesanais, adquiridos em casas de produtos artesanais ou feiras de produtores nas regiões metropolitanas de dez capitais brasileiras. Análises microbiológicas com as respectivas contagens de indicadores de contaminação microbiana, *Escherichia coli* e *Staphylococcus* coagulase positiva, e a pesquisa de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. foram realizadas por meio de métodos bacteriológicos. Nas amostras de queijos foram observadas *E. coli* em 50,0 %, *Staphylococcus* coagulase positiva em 34,4 % e *Salmonella* spp. em 6,3 %. Nas amostras de salames foram detectadas *Staphylococcus* coagulase positiva em 23,1 % e *Salmonella* spp. em 7,7 %. De acordo com a legislação sanitária brasileira, 63,0 % das amostras de queijos e 23,0 % das amostras de salames artesanais coletadas da Região Metropolitana de dez capitais brasileiras estavam impróprias para o consumo, o que demonstra a importância de realizar monitoramento próximo e efetivo para prevenir surtos de origem alimentar.

**Palavras-chave.** *Escherichia coli*. *Staphylococcus* coagulase positiva. *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, microbiologia de alimentos.

## INTRODUÇÃO

Artisanal cheeses are produced in many countries and they have specific properties depending on the region where they are made. Artisanal foods are prepared mainly by family labor to improve their income. In most of the cases, these families do not have sufficient resources to adapt their production facilities to improve the product quality, typically because of the lack of investments from the government agencies responsible for their development. Ready-to-eat (RTE) foods such as cheeses and fermented sausages are in a higher risk category than other foods prepared by using heating steps for cooking<sup>1</sup>. “Homemade” cheese was the second mostly common type reported among those outbreaks caused by cheeses made from unpasteurized milk, occurred from 1998 to 2011<sup>2</sup>.

The occurrence of food-borne diseases has been arising worldwide. Several factors contribute to the emergence of these diseases, such as the increased exposure of the population to RTE foods. Food-borne disease outbreak has been defined as the occurrence of two or more cases of a similar illness resulting from the ingestion of a common food<sup>2</sup>. From 1998 to 2011, 90 outbreaks to which the cheese was the implicated food were reported to the CDC.

These outbreaks resulted in 1882 illnesses, 230 hospitalizations, and six deaths<sup>2</sup>. In Brazil, the majority of the food-borne diseases have been caused by bacteria such as *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella* spp., *Bacillus cereus*, and *Clostridium perfringens*<sup>3</sup>.

In order to evaluate the microbiological quality of the food from animal origins, the quantification of *E. coli* and the detection of *Salmonella* are used, because these microorganisms are reliable indicators for evaluating the food quality and safety worldwide<sup>4</sup>. *E. coli* is a major commensal inhabitant of the intestine of humans and warm-blooded animals, and it does part of the essential microbiota that maintains the physiology of healthy hosts. This bacterium is also considered as a

microbiological indicator of fecal contamination or of processing quality; additionally, some *E. coli* strains can cause diarrhea<sup>4,6</sup>.

Coliforms are microbial indicators for hygiene in food processing and they might be influenced by factors like the quality of raw materials, failure during processing, or contamination during post-processing phase in pasteurized foods. They are easily destroyed by heat and they usually cannot survive the heat treatment<sup>6,7</sup>.

The presence of *S. aureus* in milk and its products suggests the use of raw materials from infected animals (mastitis) or a probable contaminating agent introduced by handlers who are asymptomatic carriers<sup>7</sup>. The causative agents of staphylococcal food poisoning include the staphylococcal enterotoxins (SEs) and the exotoxins pre-formed by *S. aureus* in food. SEs are produced when the pathogen population is higher than or equal to 5 log CFU.g<sup>-1</sup> (Colony Forming Unit) of food<sup>7</sup>.

Salmonellosis is a zoonosis of great importance and a major public health concern worldwide<sup>8-10</sup>. The most prevalent serovars of *Salmonella* spp. vary geographically and over time<sup>8</sup>. Overall, in the USA, the salmonellosis incidence has not decreased over the past several decades; the incidence has substantially increased for some serotypes and decreased for others<sup>4,8</sup>.

Food processors, particularly those producing RTE products, should be vigilant to *Listeria monocytogenes*, the causative pathogen of listeriosis<sup>11,12</sup>. *Listeria monocytogenes* is ubiquitous in the environment and it can survive for long periods of time in seemingly inhospitable environments such as the food processing facilities because of its ability to resist various stresses and to form biofilms. *L. monocytogenes* is capable to replicate at refrigeration temperatures, and thus it is of a particular concern in products with a long shelf-life<sup>12</sup>. From the public health perspective, *L. monocytogenes* shows the strongest impact in immunocompromised individuals, and it is a food-borne pathogen with the highest mortality rate (28.0 %) <sup>13,14</sup>. No compulsory notification

for listeriosis cases is needed in Brazil, but in order to monitor and to ensure the safety of RTE products from animal origin, the Brazilian Ministry of Agriculture, Cattle Raising, and Supply<sup>11</sup> established the criteria and procedures for *L. monocytogenes* control. The Brazilian National Health Surveillance Agency also establishes the absence of this pathogen in 25 g of cheese sample<sup>11,15</sup>.

The present investigation is crucial as the few studies have been conducted simultaneously and covering different regions of Brazil. The metropolitan areas were included in the analysis mostly because some municipal health monitoring services are effective for the artisanal foods sale.

ISO methods for microbial analysis were performed for carrying out the earlier isolation of characteristic colonies onto the surface of the primary agar plates. On the contrary when the conventional methods as the multiple tube technique is used, it takes longer. In general, the chromogenic media are able to isolate and to distinguish the bacteria species from the others, and it allows a more rapid detection, for example, and distinguishing *L. monocytogenes* from other *Listeria* sp<sup>16</sup>.

Fermented sausages and cheese samples were analyzed because of their animal origin, and they are artisanal RTE foods, which do not require any thermal treatment before consumption, and the probability of isolating potential pathogenic microorganisms from them is high.

The aim of this study was to determine the microbial quality of the Brazilian RTE artisanal foods such as cheeses and fermented sausages, which are commercially available at artisanal food houses or at producer fairs in the metropolitan areas of the capital cities of ten Brazilian States. Microbiological indicators such as the hygienic sanitary quality of raw material and the processes or detection of pathogenic bacteria, such as coliforms, *E.coli* and coagulase-positive staphylococci were evaluated, and the occurrence of pathogenic bacteria *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* was determined.

## MATERIAL AND METHODS

### Sample collection and identification

A total of 45 samples of RTE artisanal foods, including 32 cheese samples and 13 fermented sausage samples, were purchased from February to May 2013 at artisanal food houses or producer fairs in the metropolitan areas of the capital cities of the ten States of Brazil. The number of samples from each city was as follows (cheese/fermented sausage): Porto Alegre (3/3), Curitiba (4/3), São Paulo (3/3), Belo Horizonte (4/1), Salvador (3/0), Recife (3/0), Natal (3/0), Fortaleza (3/3), Manaus (3/0), and Brasília (3/0). The samples were obtained from different producers, and none of them had the sanitary inspection seal.

The microbial quantification results are expressed as log CFU.g<sup>-1</sup>, and the presence of pathogens per 25 g is indicated as 1 log.

### Microbiological analysis

Microbial quantification of indicators, including *E. coli* and coagulase-positive staphylococci, and microbial studies of pathogenic bacteria *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. were performed as described below. Coliforms were quantified in order to complement the data of contamination levels using microbial indicators of hygiene<sup>7</sup>.

To quantify coliforms, *E. coli*, and coagulase-positive staphylococci, the aliquots of 25 g of cheese or fermented sausages samples were homogenized with 225 mL of sterile water containing 0.1 % peptone, and decimal dilutions were prepared using the same diluent<sup>17</sup> (Laborclin, Pinhais, Brazil).

*E. coli* and coliforms were determined by following the ISO 4832<sup>18</sup> and ISO 16649-2<sup>19</sup> methods on a Compass<sup>®</sup> ECC chromogenic agar (Biokar Diagnostics, Paris, France) surface, followed by incubation at 35 ± 1 °C for 24 ± 2 h<sup>18</sup>. This medium included two chromogenic substrates, rose-galactoside and X-glucuronide, for simultaneously detecting coliforms and *E. coli*. The rose colonies were considered to indicate the occurrence of coliforms possessing β-galactosidase activity and the dark blue colonies as *E. coli* possessing β-galactosidase and

$\beta$ -glucuronidase activities<sup>19,20</sup>.

Three colonies suspected to contain *E. coli* for each sample were confirmed by purification on Cromoclin US agar (Laborclin) and they were phenotypically identified using Bactray<sup>®</sup> 1 and 2 systems (Laborclin).

The microbiological samples processing for isolating coagulase-positive staphylococci was conducted using the ISO 6888-1 method<sup>21</sup> with Baird Parker agar (Laborclin) followed by incubation at  $35 \pm 1$  °C for 24 – 48 h. Strains of coagulase-positive staphylococci were identified upon observation of catalase- and coagulase-positive Gram-positive cocci.

*Listeria* was detected following the ISO BS EN ISO 11290-1<sup>22</sup> method, which included homogenization of 25 g of the sample with 225 mL Demi Fraser broth, (BD Diagnostics, Sparks, USA). The enrichment broth was incubated at  $30 \pm 1$  °C for 24 h. Primary Fraser broth cultures were transferred to secondary Fraser broth (Laborclin) and streaked onto Palcam agar (Laborclin) and ALOA (Agar *Listeria* according to Ottaviani and Agosti) agar (Laborclin). Fraser broth and agar plates were incubated at  $35 \pm 1$  °C for  $48 \pm 2$  h. Secondary Fraser broth was streaked on Palcam agar and ALOA agar plates and incubated at  $35 \pm 1$  °C for  $48 \pm 2$  h. All of the plates were analyzed for detecting the occurrence of *Listeria* colonies, which appeared as small dark brown colonies on Palcam agar, and small blue colonies on ALOA agar, with or without a surrounding opaque zone. The purified isolates, which included those that were blue on Cromoclin USagar, the Gram-positive coccobacilli showed positive catalase activity with 3 % hydrogen peroxide. Those presenting in the motility test at 25 °C with a typical umbrella shape in SIM medium (Laborclin), they were identified as *Listeria* spp. Carbohydrate fermentation tests were conducted in purple carbohydrate broth (Laborclin) containing xylose and rhamnose, and *L. monocytogenes* ferments rhamnose, but not xylose.

*Salmonella* was detected by following ISO 6579<sup>23</sup> method after pre-enrichment in buffered peptone-water and enrichment in Muller Kauffmann Tetrathionate Novobiocine (MKTTh)

broth (Laborclin) and Rapaport-Vassiliadis Soy (RVS) broth (Laborclin), and incubating at  $37 \pm 1$  °C and  $41.5 \pm 1$  °C for 24 h, respectively. Enrichment cultures were streaked onto XLD agar (Laborclin) and chromogenic *Salmonella* agar (Laborclin). The plates were incubated at  $37 \pm 1$  °C for  $24 \pm 2$  h. Purified isolates, which were white on Cromoclin US agar, were identified using the miniaturized system Bactray<sup>®</sup> (Laborclin). Serological assays such as polyvalent flagellar (H) and polyvalent somatic (O) tests were performed by using anti-*Salmonella* agglutinating sera (Probac, São Paulo, Brazil).

### Colony purification

Although the ISO methods suggest to use nutrient agar for colony purification, the suspected colonies on primary media were inoculated on the surface of Cromoclin US agar (Laborclin) before performing the phenotypic identification, because this nutrient medium was added with chromogenic substrate to facilitate the visualization of characteristic colonies. On this chromogenic media, coliforms appear as dark blue colonies owing to X-glucoside and rose-galactoside consumption, *E. coli* consumes rose-glucuronide and rose-galactoside, where as *Enterococcus* spp. and *Listeria* spp. consume X-glucoside, and their color is light blue. Rose colonies in the Baird Parker agar were discharged because of the galactosidase activity of *Staphylococcus*. Coagulase-positive staphylococci and *Salmonella* spp. cannot consume these substrates and they appear as white to yellowish colonies. In the present study, this medium enabled to distinguish *Proteus* spp. from XLD agar and chromogenic *Salmonella* agar, which appeared as brown colonies owing to the tryptophanase activity.

## RESULTS

The populations of coliforms, *E. coli*, coagulase-positive staphylococci, *Salmonella* spp., and *Listeria* spp. isolated from artisanal cheese and fermented sausage samples purchased in the metropolitan areas of ten Brazilian States capitals are reported in [Table 1](#).

**Table 1.** Populations of coliforms, *E. coli*, coagulase-positive staphylococci, *Salmonella* spp. and *Listeria* spp. from artisanal cheese and fermented sausages samples bought in metropolitan areas of ten Brazilian cities

Sample	Region	City	Coliforms (log CFU.g <sup>-1</sup> )	<i>E. coli</i> (log CFU.g <sup>-1</sup> )	Coagulase-positive staphylococci (log CFU.g <sup>-1</sup> )	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Listeria</i> spp.	Improper sample <sup>a</sup>
<b>Cheese</b>								
<b>Reference values<sup>b,c</sup></b>			-	2.7 <sup>d</sup>	2.7 <sup>d</sup>	absence	-	-
1	South	1	<2	<2	<2	absence	absence	No
2	South	1	7.66	6.30	<2	absence	presence	Yes
3	South	1	8.56	6.08	<2	absence	absence	Yes
4	South	2	5.32	2.48	<2	absence	absence	No
5	South	2	7.08	5.69	5.59	absence	absence	Yes
6	South	2	4.38	3.85	3.95	absence	absence	Yes
7	South	2	5.54	<2	<2	absence	absence	No
8	Southeast	3	<2	<2	<2	absence	absence	No
9	Southeast	3	6.63	<2	<2	absence	absence	No
10	Southeast	3	<2	<2	<2	absence	absence	No
11	Southeast	4	4.60	4.00	<2	absence	absence	Yes
12	Southeast	4	<2	<2	<2	absence	absence	No
13	Southeast	4	<2	<2	6.58	absence	absence	Yes
14	Southeast	4	4.40	<2	<2	absence	absence	No
15	Northeast	5	3.30	<2	<2	absence	absence	No
16	Northeast	5	6.16	<2	<2	absence	absence	No
17	Northeast	5	3.90	<2	5.31	absence	absence	Yes
18	Northeast	6	4.88	3.78	<2	absence	absence	Yes
19	Northeast	6	6.67	5.97	5.46	absence	absence	Yes
20	Northeast	6	6.43	<2	<2	absence	absence	No
21	Northeast	7	5.37	5.13	6.00	presence	absence	Yes
22	Northeast	7	3.00	<2	4.85	absence	absence	Yes
23	Northeast	7	6.22	6.16	<2	absence	absence	Yes
24	Northeast	8	4.90	4.15	3.78	absence	absence	Yes
25	Northeast	8	4.93	4.62	<2	absence	absence	Yes
26	Northeast	8	5.44	5.16	4.95	absence	absence	Yes
27	North	9	4.60	4.00	<2	presence	absence	Yes
28	North	9	4.66	4.56	4.00	absence	absence	Yes
29	North	9	3.20	2.60	3.85	absence	absence	Yes
30	West-centre	10	6.51	6.09	<2	absence	absence	Yes
31	West-centre	10	<2	<2	<2	absence	absence	No
32	West-centre	10	6.35	5.78	<2	absence	presence	Yes
<b>Fermented Sausage</b>								
<b>Reference values<sup>b</sup></b>			-	3.0 <sup>d</sup>	3.7	absence	-	-
33	South	1	<2	<2	<2	absence	absence	No
34	South	1	<2	<2	<2	absence	absence	No
35	South	1	<2	<2	<2	absence	absence	No
36	South	2	<2	<2	<2	absence	presence	No
37	South	2	4.91	<2	6.00	presence	presence	Yes
38	South	2	4.60	<2	<2	absence	presence	No
39	Southeast	3	4.32	<2	<2	absence	presence	No
40	Southeast	3	<2	<2	4.60	absence	absence	Yes
41	Southeast	3	<2	<2	5.52	absence	absence	Yes
42	Southeast	4	<2	<2	<2	absence	absence	No
43	Northeast	8	<2	<2	<2	absence	absence	No
44	Northeast	8	<2	<2	<2	absence	absence	No
45	Northeast	8	<2	<2	<2	absence	absence	No

a. Improper sample: Containing *E. coli*, coagulase-positive staphylococci, and/or *Salmonella* spp. above the counts permitted by regulation; b. Reference values in accordance to the Brazilian Health Regulatory Laws<sup>15</sup>; c. Cheese with very high humidity (>55 %); d. Considered data from coliforms at 45 °C<sup>15</sup>

Among the 45 samples acquired from the artisanal food houses or producer fairs in the metropolitan areas of ten Brazilian States capital cities, 62.5 % of artisanal cheeses samples (20/32) and 23.1 % of artisanal fermented sausage samples (3/13) were inadequate for human consumption. In accordance with the Brazilian Health Regulatory Legislation<sup>15</sup>, 51.1 % of the samples (23/45) were not suitable for consumption due to the presence of *E. coli* and/or coagulase-positive staphylococci and/or *Salmonella* spp. at levels higher than those allowed by legislation.

The coagulase-positive staphylococci counting was higher than the maximum allowed values of 3.7 log CFU.g<sup>-1</sup> and 2.7 log CFU.g<sup>-1</sup> in 23.1 % for the fermented sausage samples (3/13) and in 34.4 % cheese samples (11/32), respectively, at very high humidity (>55.0 %); and these values were not in agreement with the Brazilian Regulatory Legislation<sup>15</sup>.

Coliforms were isolated from 81.25 % of the cheese samples (26/32) with counts of 3.0–8.5 log CFU.g<sup>-1</sup> and from 23.1 % of fermented sausage samples (3/13) with 4.3–4.9 log CFU.g<sup>-1</sup> counting.

Although *E. coli* was not isolated from fermented sausages samples, 56.3 % of cheese samples (18/32) showed values between 2.4 and 6.3 log CFU.g<sup>-1</sup>. Considering that *E. coli* belongs to the coliform group at 45 °C<sup>6</sup>, and being 2.7 log CFU.g<sup>-1</sup> the maximum allowed value for the very high humidity cheeses<sup>15</sup>, 50.0 % of cheese samples (16/32) were improper for consumption.

*Salmonella* spp. was isolated from 6.3 % of cheese samples (2/32) and 7.7 % of fermented sausages samples (1/13).

*Listeria* spp. was isolated from 6.3 % of cheese samples (2/32) and from 30.8 % of fermented sausages samples (4/13); however, the presence of *L. monocytogenes* was not confirmed.

## DISCUSSION

*E. coli*, coagulase-positive staphylococci, and/or *Salmonella* spp. were found in the analyzed samples, corroborating the results reported by Almeida et al<sup>24</sup>. These investigators found that

these microorganisms were among the most common etiological agents detected in the positive samples from patients during the food-borne disease outbreaks occurred in Parana state, Brazil.

In the present study, the found results for coagulase-positive staphylococci were comparable to those of previous studies performed by Evêncio-Luz et al<sup>25</sup>, who reported the occurrence of these bacteria in Salvador and Recife. A total of 21.0 % (16/75) and 31.2 % (20/65) of *coalho* type cheese samples were improper for human consumption.

Among 30 samples, Visotto et al<sup>7</sup> found four samples (13.3 %), being two industrialized and two artisanal varieties were contaminated with coagulase-positive staphylococci above 5 log CFU.g<sup>-1</sup>. The results detected in the present study are in accordance with the findings reported by those authors<sup>7</sup>, as among 32 cheese analyzed samples, four (12.5 %) contained coagulase-positive staphylococci above 5 log CFU.g<sup>-1</sup>. Borelli et al<sup>26</sup> found *Staphylococcus* spp. at levels higher than 5.0 log CFU.g<sup>-1</sup> in all of the analyzed cheese samples from the Serra da Canastra region, Minas Gerais State, and among them 93.3 % were capable to produce the staphylococcal enterotoxins.

For coliforms, this study found similar results to those detected in cheese by Visotto et al<sup>7</sup>, showing that 90.0 % of the analyzed samples (27/30) contained populations higher than 3.0 log MPN.g<sup>-1</sup> (Most Probable Number). The authors stated that the high occurrence of these microbial indicators suggested that the cheeses were produced with poor-quality raw materials or that failures had occurred during the manufacture and storage processes.

In a previous study, the evaluated cheese samples were deemed improper for consumption because of *E. coli* contamination as reported by Visotto et al<sup>7</sup>. These authors observed that 50.0 % of artisanal cheese samples (4/8) and 54.5 % of industrial cheese samples (12/22) purchased in Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil contained thermotolerant coliform populations at levels above those permitted by the Regulations. Borelli et al<sup>26</sup> found high levels of thermotolerant coliforms in cheese samples from Serra da



Canastra region, Minas Gerais state and reported the presence of this microorganism in all of the water samples used for cheese production.

In contrast to the results reported by Osailli et al<sup>27</sup> who isolated *Listeria* spp. from 27.1 % cheese samples and *L. monocytogenes* from 39 (11.1 %) Brined White Cheese samples in Jordan, the present study isolated *Listeria* spp. but not *L. monocytogenes*.

*Salmonella* spp. and *Listeria* spp. isolated in the present study raises the concerns regarding the risks to human health. Gould et al<sup>2</sup> reported outbreaks attributed to cheese in the USA from 1998 to 2011, wherein three deaths were associated with cheeses made from unpasteurized milk contaminated with *Listeria* (two fatal cases) and with *Salmonella* serotype Typhimurium. Three deaths occurred in outbreaks resulting from cheeses made from *Listeria* contaminated-pasteurized milk. Kottwitz et al<sup>8</sup> reported that meat derivatives and cheese were among the foods associated with human salmonellosis outbreaks in Parana between 1999 and 2008, wherein a total of 286 outbreaks were analyzed; and 14.0 % of outbreaks were associated with meat derivatives and 1 % with cheese.

The low occurrence of *Salmonella* spp. and the absence of *L. monocytogenes* in cheese samples evaluated in the present study could be explained based upon the findings reported by Visotto et al<sup>7</sup> and Silva et al<sup>28</sup>. These authors presented data showing that *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* might be absent in cheese samples due to the occurrence of autochthonous microbiota. This microbiota might constrain the growth of pathogenic microorganisms by lowering the competitive ability of such species over other bacteria occurring in the cheeses and/or by producing antagonistic molecules.

In the fermented sausages evaluated in the present study, the absence of *L. monocytogenes* and *E. coli*, and the low occurrence of *Salmonella* spp. might be explained based on the results showed by Lindqvist et al<sup>29</sup> and Porto-Fett et al<sup>30</sup>. Lindqvist et al<sup>29</sup> included a maturation period at temperatures above refrigeration before distribution, and it reduced the *L. monocytogenes*

and *E. coli* counts in the fermented sausage. Porto-Fett et al<sup>30</sup> reported that fermentation in pH 4.8 and storage at 21 °C were effective for reducing the numbers of *L. monocytogenes* (2.54 log CFU.g<sup>-1</sup> reduction) and *Salmonella* serotype Typhimurium ( $\geq 5.23$  log CFU.g<sup>-1</sup> reduction).

The results obtained in different regions suggest that the northeast region includes the largest number of samples improper for consumption, wherein 75.0 % of analyzed cheese samples (9/12) were noncompliant with the Brazilian Health Regulatory Legislation<sup>15</sup>. Only a few Brazilian states and/or municipalities have compiled statistics and data regarding the most common etiologic agents, being the foods commonly involved in outbreaks, the population at high risk, and the factors contributing to food-borne diseases<sup>3</sup>. To improve the quality of artisanal Minas cheese, the government of Minas Gerais has instituted the State Regulatory Standards for establishing the physicochemical and microbiological parameters to which these cheeses must comply with<sup>1</sup>.

## CONCLUSION

The high occurrence of microorganisms detected in the microbiological analyses performed in some of the ten states capital cities indicated the low hygienic sanitary quality of the produced cheese samples. The occurrence of pathogens in some samples represents a potential risk to consumer health, emphasizing the importance of the close and effective monitoring by the Health Surveillance service to prevent food-borne outbreaks. The rapid detection of pathogenic bacteria in food is crucial and it is fundamental for preventing the food-borne illness outbreaks.

---

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Laborclin PLTIP program for supporting the research and training by donating the culture media.

---

## REFERENCES

1. Martins JM, Galinari E, Pimentel-Filho NJ, Ribeiro JI Jr, Furtado MM, Ferreira CL. Determining the minimum ripening time of artisanal Minas cheese, a traditional Brazilian cheese. *Braz J Microbiol*. 2015;46(1):219-30. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-838246120131003>].
2. Gould LH, Mungai E, Behravesch CB. Outbreaks attributed to cheese: differences between outbreaks caused by unpasteurized and pasteurized dairy products, United States, 1998-2011. *Foodborne Pathog Dis*. 2014;11(7):545-51. [DOI: 10.1089/fpd.2013.1650].
3. Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual Integrado de Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas por Alimentos. [Accessed 2015 Nov 21]. Available at: [[http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_integrado\\_prevencao\\_doencas\\_alimentos.pdf](http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/manual_integrado_prevencao_doencas_alimentos.pdf)]. 4
4. Silva FFP, Horvath MB, Silveira JG, Pieta L, Tondo EC. Occurrence of *Salmonella* spp. and generic *Escherichia coli* on beef carcasses sampled at a Brazilian slaughterhouse. *Braz J Microbiol*. 2014;45(1):17-23. [DOI: 10.1590/S1517-83822014005000037].
5. Puño-Sarmiento J, Gazal LE, Medeiros LP, Nishio EK, Kobayashi RK, Nakazato G. Identification of diarrheagenic *Escherichia coli* strains from avian organic fertilizers. *Int J Environ Res Public Health*. 2014;11(9):8924-39. [DOI: 10.3390/ijerph110908924].
6. Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA, Taniwaki M, Santos RFS, Gomes RAR. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água. 4ª ed. São Paulo: Livraria Varela; 2010. 317 p. illus.
7. Visotto RG, Oliveira MA, Prado SPT, Bergamini AMM. Queijo Minas Frescal: perfil higiênico-sanitário e avaliação da rotulagem. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2011;70(1):8-15.
8. Kottwitz LBM, Oliveira TCRM, Alcocer I, Farah S, Abrahão WS, Rodrigues DP. Avaliação epidemiológica de surtos de salmonelose ocorridos no período de 1999 a 2008 no Estado do Paraná, Brasil. *Acta Sci Health Sci*. 2010;32(1):9-15. [DOI: <http://dx.doi.org/10.4025/actascihealthsci.v32i1.6340>].
9. Tadesse G, Gebremedhin EZ. Prevalence of *Salmonella* in raw animal products in Ethiopia: a meta-analysis. *BMC Res Notes*. 2015;8:163. [DOI:10.1186/s13104-015-1127-7].
10. Elhadi N, Aljindan R, Aljeldah M. Prevalence of nontyphoidal *Salmonella* serogroups and their antimicrobial resistance patterns in a university teaching hospital in Eastern Province of Saudi Arabia. *Infect Drug Resist*. 2013;6:199-205. [DOI:10.2147/IDR.S51184].
11. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 9, de 8 de abril de 2009. Institui os Procedimentos de Controle da *Listeria monocytogenes* em produtos de origem animal, prontos para o consumo. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 09 abr. 2009, Seção 1, nº 68. p.9.
12. Leong D, Alvarez-Ordóñez A, Jordan K. Monitoring occurrence and persistence of *Listeria monocytogenes* in foods and food processing environments in the Republic of Ireland. *Front Microbiol*. 2014;5:436. [DOI: 10.3389/fmicb.2014.00436].
13. Vallim DC, Barroso Hofer C, Lisbôa RC, Barbosa AV, Alves Rusak L, Reis CM, et al. Twenty years of *Listeria* in Brazil: occurrence of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* serovars in food samples in Brazil between 1990 and 2012. *Biomed Res Int*. 2015; 2015:540204. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/540204>].
14. Kramarenko T, Roasto M, Meremäe K, Kuningas M, Pölsama P, Elias T. *Listeria monocytogenes* prevalence and serotype diversity in various foods. *Food Control*. 2013;30:24-29. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.06.047>].
15. 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.

16. Law JW, Ab-Mutalib NS, Chan KG, Lee LH. An insight into the isolation, enumeration, and molecular detection of *Listeria monocytogenes* in food. *Front Microbiol*. 2015;6:1227. [DOI: 10.3389/fmicb.2015.01227].
17. Taylor TM, Sofos JN, Bodnaruk P, Acuff GR. Sampling Plans, Sample Collection, Shipment, and Preparation for Analysis. In: *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 5<sup>th</sup> ed. Washington: American Public Health Association (APHA); 2015. Chapter 2.
18. ISO 4832:2006. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coliforms – Colony-count technique. 2006.
19. ISO 16649-2:2001. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of  $\beta$ -glucuronidase-positive *Escherichia coli*. 2001.
20. Manafí M, Kneifel W, Bascomb S. Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostics. *Microbiol Rev*. 1991;55(3):335-48.
21. ISO 6888-1:1999. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species).
22. BS EN ISO 11290-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Detection Method. 1996, amendment 1:2004.
23. ISO 6579:2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.
24. Almeida JC, Paula CMS, Svoboda WK, Lopes MO, Pilonetto MP, Abrahão WM, et al. Perfil epidemiológico de casos de surtos de doenças transmitidas por alimentos ocorridos no Paraná, Brasil. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*. 2013;34(1):97-106. [DOI: <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0367.2013v34n1p97>].
25. Evêncio-Luz L, Lima-Filho JV, Evêncio-Neto, J. Occurrence of *Salmonella* sp. and coagulase-positive staphylococci in raw eggs and coalho cheese: comparative study between two cities of Brazil's northeast. *Braz J Microbiol*. 2012;43(4):1463-6. [DOI: 10.1590/S1517-838220120004000030].
26. Borelli BM, Ferreira EG, Lacerda ICA, Santos DA, Carmo LS, Dias RS, et al. Enterotoxigenic *Staphylococcus* spp. and other microbial contaminants during production of Canastra cheese, Brazil. *Braz J Microbiol*. 2006;37:545-50. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822006000400026>].
27. Osaili TM, Al-Nabulsi AA, Taha MH, Al-Holy MA, Alaboudi AR, Al-Rousan WM, et al. Occurrence and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from brined white cheese in Jordan. *J Food Sci*. 2012;77(9):M528-32. [DOI: 10.1111/j.1750-3841.2012.02877.x].
28. Silva MCD, Ramos ACS, Moreno I, Moraes JO. Influência dos procedimentos de fabricação nas características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas de queijo de coalho. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2010;69(2):214-21.
29. Lindqvist R, Lindblad M. Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* in fermented sausages during maturation/storage. *Int J Food Microbiol*. 2009;129(1):59-67. [DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.11.011].
30. Porto-Fett AC, Hwang CA, Call JE, Juneja VK, Ingham SC, Ingham BH, et al. Viability of multi-strain mixtures of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, or *Escherichia coli* O157:H7 inoculated into the batter or onto the surface of a soudjouk-style fermented semi-dry sausage. *Food Microbiol*. 2008;25(6):793-801. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2008.04.012>].



# Elaboração de biscoito *cream cracker* adicionado de farinha de linhaça e com teor reduzido de sódio: avaliação físico-química e sensorial

## Physical-chemical and sensorial evaluation of the linseed flour added-cream cracker biscuit and with reduced sodium contents

RIALA6/1692

Ana Raíssa ORLOSKI<sup>1</sup>, José Ranieri Mazile Vidal BEZERRA<sup>2</sup>, Mirelly Marques ROMEIRO<sup>3</sup>, Camila Jordão CANDIDO<sup>2</sup>, Elisvânia Freitas dos SANTOS<sup>3</sup>, Daiana NOVELLO<sup>1\*</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Setor de Ciências da Saúde, Departamento de Nutrição, Universidade Estadual do Centro-Oeste, Caixa Postal 35, Guarapuava, PR, Brasil, CEP: 85010-000. Tel: 42 3629 8182. E-mail: nutridai@gmail.com

<sup>2</sup>Setor de Ciências Exatas e de Tecnologia, Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, PR

<sup>3</sup>Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS

Recebido: 23.10.2015 - Aceito para publicação: 29.03.2016

### RESUMO

Foram verificadas a aceitabilidade e a composição físico-química de biscoitos *cream cracker* contendo farinha de linhaça e diferentes teores de cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl) e glutamato monossódico (GM). Na *Etapa 1* avaliaram-se cinco formulações com NaCl e KCl (0 a 2 %). Na *Etapa 2* foram analisadas as mesmas formulações, porém com GM (0,3 %). Não houve diferença entre as formulações quanto à aparência, aroma, textura, cor, aceitação global e intenção de compra (*Etapa 1*). Contudo, a amostra com 2 % de KCl apresentou menor aceitação para sabor e sabor residual. O GM não alterou as notas dos atributos (*Etapa 2*). O produto padrão (100 % de NaCl) apresentou os seguintes teores 4,91 ± 0,04 %, 3,78 ± 0,02 g.100g<sup>-1</sup>, 11,95 ± 0,06 g.100g<sup>-1</sup>, 14,48 ± 0,07 g.100g<sup>-1</sup>, 68,62 ± 0,28 g.100g<sup>-1</sup> e 449,43 ± 0,85 kcal.100g<sup>-1</sup>, respectivamente, para umidade, cinzas, proteínas, lipídios, carboidratos e calorias. O teor de sódio reduziu 66,56 % (*Etapa 1*) na amostra com maior teor de KCl (1,5 %) e com aceitabilidade similar ao padrão. É viável restringir o teor de NaCl em biscoitos *cream cracker*, principalmente pela utilização conjunta de NaCl (0,5 %) e KCl (1,5 %). O GM não foi relevante neste estudo, dispensando-se o seu emprego na produção de biscoitos.

**Palavras-chave.** tecnologia de alimentos, biscoitos, sal.

### ABSTRACT

Were verified acceptability and the physical-chemical composition of cream cracker biscuits containing linseed flour and varied quantities of sodium chloride (NaCl), potassium chloride (KCl) and monosodium glutamate (MG). In Step 1 five formulations with NaCl and KCl (0 % to 2 %) were evaluated. In Step 2, the same formulations were analyzed, but MG (0.3 %). No difference among the formulations was found as for appearance, aroma, texture, color and overall acceptance and purchase intent (Step 1). Sample containing 2 % KCl showed the lowest acceptance for taste and aftertaste. The MG did not alter the notes of the attributes (Step 2). The standard product (100 % NaCl) showed the contents of 4.91 ± 0.04 %, 3.78 ± 0.02 g.100g<sup>-1</sup>, 11.95 ± 0.06 g.100g<sup>-1</sup>, 14.48 ± 0.07 g.100g<sup>-1</sup>, 68.62 ± 0.28 g.100g<sup>-1</sup>, 449.43 ± 0.85 kcal.100g<sup>-1</sup>, for moisture, ash, protein, lipids, carbohydrates and calories, respectively. Sodium contents reduced 66.56 % (Step 1) in sample with the highest KCl concentration (1.5 %), being the acceptability similar to the standard. It is feasible to restrict the NaCl contents in cream cracker biscuits, mainly by the jointed use of NaCl (0.5 %) and KCl (1.5 %). The MG was not relevant in this study, and their use in biscuits might be excluded.

**Keywords.** food technology, cookies, salt.

## INTRODUÇÃO

O sódio é o principal íon do líquido extracelular no organismo. Entretanto, um excesso no consumo deste mineral pode elevar a volemia e, conseqüentemente, a pressão arterial. Assim, há aumento na resistência vascular, o que mantém os níveis de pressão elevados, podendo desencadear a hipertensão arterial sistêmica (HAS)<sup>1</sup>. Segundo o Ministério da Saúde<sup>2</sup>, as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) são as causadoras das maiores taxas de morbimortalidade no Brasil. Dentre elas, a HAS é responsável por 7,5 milhões de mortes/ano, já que é fator de risco para doenças cardiovasculares. A prática de atividades físicas e uma alimentação saudável são os principais fatores que podem colaborar para reduzir o risco dessa patologia<sup>3</sup>.

A recomendação de sódio para adultos (20 a 59 anos) de ambos os gêneros é de 2 g/dia (5 g de sal/dia)<sup>4</sup>. Porém, sabe-se que o consumo atual no Brasil é bem mais elevado (4,1 g de sódio/dia e 10,25 g de sal/dia)<sup>5</sup>. Os principais alimentos que contribuem para uma maior ingestão de sódio são os produtos processados, tais como: pães, biscoitos, sanduíches, pizzas, carnes processadas (presuntos, salames, mortadela, entre outros), queijos e refrigerantes<sup>6</sup>. Já o grupo dos cereais representa aproximadamente 35 % do consumo diário de sódio<sup>7</sup>. Destaca-se que o excesso de sódio na alimentação é um dos principais contribuintes para o aumento do risco de desenvolvimento da HAS<sup>8</sup>. Diante deste contexto, o Ministério da Saúde e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) firmaram um acordo, com intuito de reduzir o consumo excessivo de sódio, com o compromisso de monitorar e avaliar o impacto desta redução sobre a ocorrência de doenças crônicas na população brasileira<sup>9</sup>.

Dentre as metas públicas propostas para a redução do consumo de sódio recomenda-se: aumentar a oferta de alimentos saudáveis, como frutas e verduras; reformular os alimentos processados, para que seja adicionada uma menor quantidade de NaCl; comunicar, educar e sensibilizar a população e os profissionais

da saúde para um menor consumo de sódio e; orientar os indivíduos sobre a leitura do rótulo nutricional de produtos industrializados<sup>9</sup>.

Desde o ano de 2007, o Ministério da Saúde e a Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação (ABIA) trabalham novas propostas para a reformulação de alimentos processados. Inicialmente tratou-se da redução de gorduras *trans*, a qual obteve sucesso<sup>10</sup>. A questão do sódio vem sido discutida a partir de 2010, sendo que as metas para a redução anual vão de 2011 a 2016, inicialmente. Por exemplo, em relação ao biscoito *cream cracker*, objeto da pesquisa, a proposta é para se obter uma redução de 13 % ao ano até 2014<sup>9</sup>.

Considerando-se a necessidade do consumo de uma alimentação mais saudável, muitos ingredientes estão sendo utilizados pelas indústrias para melhorar o perfil nutricional de seus produtos, como por exemplo, os alimentos funcionais, os quais apresentam componentes possíveis de fornecer benefícios à saúde<sup>11</sup>. Dentre estes cita-se a linhaça (*Linum Usitatissimum* L.), que é muito apreciada devido à presença de elevadas quantidades de ácidos graxos ômega 3 (n-3), sendo a maior fonte dentre os cereais. Em sua composição química são encontradas, também, fibras alimentares (28 a 40 %) solúveis e insolúveis, vitaminas E e B, potássio, fósforo, dentre outras vitaminas e minerais<sup>12,13</sup>.

Um produto em destaque pelo elevado consumo e aceitação pela população é o biscoito *cream cracker*. É composto basicamente por carboidratos (68,7 g/100g) e lipídeos (14,4 g/100g)<sup>14</sup>, além de um elevado teor de NaCl (média 793 mg/100g), podendo variar de 683 mg até 919 mg/100g, dependendo da marca comercial<sup>15</sup>. Devido a isso, esse biscoito está dentre os alimentos prioritários para pactuação e monitoramento da redução do teor de sódio<sup>10</sup>. Além disso, é um produto de fácil preparação e com elevado potencial para a adição de ingredientes funcionais e redução de sódio.

Apesar da grande relevância da redução de NaCl em alimentos, este mineral é responsável por garantir várias características tecnológicas no produto final, uma vez que afeta as

propriedades estruturais e funcionais<sup>16</sup>. Além da contribuição no sabor, favorece a formação da rede de glúten e o controle na atividade de água, promovendo a segurança microbiológica do produto, sendo que todos esses fatores dificultam o sucesso para se obter uma redução de sódio significativa. Apesar disso, a substituição parcial de sódio (30 %) em pães, demonstrou boa aceitação sensorial e manutenção das propriedades reológicas do produto<sup>17</sup>. Nesse contexto, estudos que avaliem a qualidade de produtos com teores reduzidos de sódio são fundamentais para garantir sua qualidade final.

O cloreto de potássio (KCl) é um dos substitutos mais utilizados para o NaCl em produtos alimentícios. É considerado como um ingrediente seguro e apresenta características antimicrobiológicas semelhantes ao NaCl<sup>17</sup>. Além disso, no organismo o potássio pode auxiliar na redução do risco de doenças cardiovasculares e HAS, uma vez que pode diminuir a pressão sanguínea. Sua deficiência também pode aumentar a excreção urinária de cálcio, contribuindo para o aparecimento da osteoporose e formação de cálculos renais<sup>18</sup>. Apesar dos benefícios verificados com o uso do KCl, seu consumo excessivo pode originar alguns problemas tecnológicos em alimentos. Exemplos são a redução do sabor salgado, introdução de sabores amargos, metálicos e adstringentes, anormalidades na cor e textura, dentre outros<sup>17</sup>.

Visando melhorar o aspecto de sabor dos alimentos adicionados de KCl, em geral são utilizados os realçadores de sabor, como o Glutamato Monossódico (GM). Este aditivo é um dos mais apreciados, pois promove o sabor “umami”, melhorando o sabor e o aroma natural dos alimentos<sup>19</sup>. Apesar dos aspectos tecnológicos positivos do GM, alguns estudos demonstraram que o seu consumo excessivo pode aumentar o risco de doenças cardiovasculares<sup>20</sup>.

Para que novos produtos sejam oferecidos aos consumidores é necessária uma avaliação constante de suas características sensoriais. O uso de testes sensoriais implica no desenvolvimento de maior variedade de alimentos, aumentando a chance de sua comercialização.

Fornecem, portanto, suporte para pesquisas, industrialização, marketing e controle de qualidade<sup>21</sup>. Nesse aspecto, o objetivo deste trabalho foi verificar a aceitabilidade sensorial de biscoitos *cream cracker* adicionados de farinha de linhaça e de diferentes teores de NaCl, KCl e GM e avaliar a composição físico-química dos produtos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Matéria-prima

Os ingredientes básicos utilizados para as formulações foram adquiridos em supermercados do município de Guarapuava, PR.

Os sais foram doados por empresas parceiras e apresentavam a seguinte classificação: NaCl (para análise, P.A.), peso molecular 58,44; KCl (P.A.), peso molecular 74,55. O GM utilizado na pesquisa foi um produto comercial, contendo 12.300 mg Na/100g.

A linhaça da variedade dourada foi adquirida em fornecedores especializados da cidade de Guarapuava, PR, durante os meses de agosto a dezembro de 2014, sempre se observando um prazo de validade maior que 12 meses como critério de obtenção.

### Preparo da farinha de linhaça

Para a elaboração da farinha de linhaça, 50 g de sementes inteiras foram removidas de embalagens individuais de 200 g, sendo homogeneizadas. A seguir, as sementes foram moídas por 30 segundos em processador (Britânia®, Brasil) na função pulsar (3.500 rpm), com intervalos a cada 3 segundos. A farinha foi imediatamente utilizada nas preparações.

### Preparo das formulações

O preparo dos produtos foi realizado no Laboratório de Panificação do Curso de Engenharia de Alimentos da UNICENTRO. Na *Etapa 1* foram elaboradas 5 formulações de biscoitos *cream cracker* com diferentes teores de NaCl e KCl. Na *Etapa 2* utilizaram-se as mesmas porcentagens de adição de sais da *Etapa 1*, porém acrescentou-se a cada amostra 0,3 % de GM, totalizando-se mais 5 formulações.

Para fins de comparação as formulações F1 (*Etapa 1 e 2*) foram consideradas como padrão. Os ingredientes e quantidades utilizados para as formulações dos biscoitos estão descritos na **Tabela 1**. Os níveis de adição estabelecidos nas *Etapas 1 e 2* foram definidos por meio de testes sensoriais preliminares realizados com o produto.

Para elaboração dos biscoitos, seguiu-se o procedimento descrito por Tozatti et al<sup>22</sup>. Primeiramente foi preparada a “esponja”, em que foram misturadas, manualmente, a farinha de trigo (35,11 %), a gordura vegetal hidrogenada (4,31 %), a farinha de linhaça e o fermento biológico seco. Em seguida, adicionou-se a água morna (18,70 %), misturando-se até completa homogeneização.

A massa permaneceu em repouso em um recipiente fechado, sob temperatura ambiente (22 °C) por 6 horas. Após este período, foram adicionados e misturados à “esponja” os seguintes ingredientes: farinha de trigo (21,5 %), gordura vegetal hidrogenada (4,64 %), água morna (6,77 %), açúcar, bicarbonato de sódio, lecitina de soja e os sais NaCl, KCl e GM, conforme as porcentagens

de adição citadas na **Tabela 1**. Logo após, as formulações permaneceram em repouso por mais 5 horas. Finalizado este período, as massas foram cilindradas, aproximadamente 30 vezes, em máquina elétrica (G. Paniz<sup>®</sup>, Brasil) até atingir espessura de 2 mm. Cada formulação foi cortada em aproximadamente 60 quadrados (4 x 4 cm), sendo perfurados com palitos e dispostos em fôrmas de alumínio (61 x 41 x 4 cm). Os biscoitos foram assados em forno industrial a gás (Tedesco<sup>®</sup>, Brasil) pré-aquecido, por aproximadamente 30 minutos em temperatura de 150 °C.

### Análise Sensorial

A avaliação sensorial foi realizada no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Engenharia de Alimentos da UNICENTRO, em cabines individuais e com iluminação de cor branca. Participaram da pesquisa 204 provadores não treinados (60 indivíduos em cada teste sensorial - dois testes hedônicos e dois de ordenação), sendo estudantes e funcionários do Campus Cedeteg de ambos os gêneros, com idade de 20 a 59 anos.

**Tabela 1.** Ingredientes utilizados para a elaboração dos biscoitos *cream craker*, *Etapas 1 e 2*

Ingredientes	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)	F4 (%)	F5 (%)
<i>Formulação base</i>					
Farinha de trigo	56,64	56,64	56,64	56,64	56,64
Água	25,47	25,47	25,47	25,47	25,47
Gordura vegetal hidrogenada	8,95	8,95	8,95	8,95	8,95
Farinha de linhaça	4,97	4,97	4,97	4,97	4,97
Áçúcar	1,27	1,27	1,27	1,27	1,27
Bicarbonato de sódio	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38
Fermento biológico seco	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Lecitina de soja	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
<i>Etapa 1</i>					
NaCl	2,00	1,50	1,00	0,50	0,00
KCl	0,00	0,50	1,00	1,50	2,00
<i>Etapa 2</i>					
NaCl	2,00	1,50	1,00	0,50	0,00
KCl	0,00	0,50	1,00	1,50	2,00
GM	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30

NaCl (Cloreto de sódio), KCl (Cloreto de potássio), GM (Glutamato monossódico)

Nos dois testes hedônicos foram avaliados os atributos de aparência, aroma, sabor, sabor residual, crocância e cor para ambas as *Etapas 1 e 2*, as quais ocorreram em dias alternados. As amostras foram analisadas por meio de uma escala hedônica estruturada de 9 pontos, variando de desgostei muitíssimo (nota 1) a gostei muitíssimo (nota 9). Foram aplicadas também questões de aceitação global com auxílio de uma escala hedônica estruturada de 9 pontos e intenção de compra, utilizando-se uma escala estruturada de 5 pontos (1: certamente não compraria, 5: certamente compraria)<sup>21</sup>.

Os julgadores receberam uma porção de cada amostra (aproximadamente 5 g), em pratos plásticos brancos codificados com números de três dígitos, de forma balanceada, acompanhada de água para limpeza do palato. As formulações foram oferecidas aos julgadores de forma monádica sequencial.

Os dois testes de ordenação foram aplicados em dias alternados, tanto para *Etapas 1* como para *Etapas 2*. O intuito desta avaliação era comparar as diferenças entre as amostras em atributo específico de sabor salgado, já que os biscoitos foram reduzidos em NaCl. Os provadores classificaram as amostras em ordem crescente de sabor salgado, sendo da menos salgada para a mais salgada<sup>21</sup>.

### Índice de aceitabilidade (IA)

O cálculo do índice de aceitabilidade (IA) foi realizado segundo a fórmula:  $IA (\%) = A \times 100/B$  ( $A = \text{nota média obtida para o produto}$ ;  $B = \text{nota máxima dada ao produto}$ )<sup>21</sup>.

### Composição físico-química

As análises físico-químicas foram realizadas no Laboratório de Físico-Química da Unidade de Tecnologia de Alimentos e Saúde Pública (UTASP) da UFMS. As seguintes determinações foram realizadas nas formulações, em triplicata: *Umidade*: determinada em estufa (105 °C)<sup>23</sup> nas formulações padrão com e sem adição de GM; *Cinzas*: analisadas em mufla (550 °C)<sup>23</sup> nas formulações padrão com e sem adição de GM; *Lipídios totais*: utilizou-se o método de extração a quente (Soxhlet)<sup>23</sup> para a avaliação

da formulação padrão sem adição de GM; *Proteínas*: a formulação padrão sem adição de GM foi avaliada através do teor de nitrogênio total da amostra, pelo método Kjeldahl (nível semimicro com fator de conversão de nitrogênio de 6,25)<sup>24</sup>; *Fibra alimentar*: realizou-se o cálculo teórico<sup>13</sup> para análise da formulação padrão sem adição de GM; *Carboidratos*: calculados teoricamente (por diferença) nos resultados da formulação padrão sem adição de GM, conforme a fórmula:  $\% \text{ Carboidratos} = 100 - (\% \text{ umidade} + \% \text{ proteína} + \% \text{ lipídios} + \% \text{ cinzas} + \% \text{ fibra alimentar})$ ; *Valor calórico*: o teor de calorias da formulação padrão sem adição de GM foi calculado utilizando-se os seguintes valores: lipídios (8,37 kcal/g), proteína (3,87 kcal/g), carboidratos (4,11 kcal/g)<sup>24</sup>.

Para a determinação dos teores de sódio e potássio as amostras passaram inicialmente por digestão com HNO<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A quantificação foi determinada por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado-ICP OES (Thermo Fisher Scientific®, Inglaterra), modelo iCAP 6300 Duo.

### Determinação do Valor Diário de Referência (VD)

O VD foi calculado em relação a 30 g da amostra (7 biscoitos), com base nos valores médios preconizados para adultos (20 a 59 anos)<sup>25</sup>, resultando em: 2.004,87 kcal/dia, 254,77 g/dia de carboidratos, 73,43 g/dia de proteínas, 73,33 g/dia de lipídios e 14,49 g/dia de fibra alimentar. O VD para os micronutrientes foi calculado considerando-se 2.000 mg/dia de sódio<sup>4</sup> e 2.581,3 mg/dia de potássio<sup>25</sup>.

### Análise estatística

Os dados foram avaliados por meio da análise de variância (ANOVA), utilizando-se o teste de Tukey e *t* de *student* para comparação de médias. Na análise sensorial foram empregados também o Teste de Friedman e a Tabela de Christensen, que indicaram a diferença mínima significativa (DMS) entre as amostras testadas e o número de julgamentos para o teste de ordenação<sup>21</sup>. Todos os testes foram analisados em nível de 5 % de significância, com auxílio do



software *Statgraphics plus*<sup>®</sup>, versão 5.1.

### Questões éticas

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNICENTRO, parecer nº 345.569/2013. Entretanto, como critérios de exclusão foram considerados os seguintes fatores: possuir alergia a algum ingrediente utilizado na elaboração dos biscoitos; aqueles que não aceitaram participar da pesquisa e/ ou que não assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Análise Sensorial

Na **Tabela 2** verificam-se as médias do teste sensorial afetivo, intenção de compra, ordenação e IA dos biscoitos *cream cracker* reduzidos em NaCl (*Etapa 1*) e com adição de GM (*Etapa 2*).

Na *Etapa 1* não houve diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre as formulações nos atributos aparência, aroma, crocância, cor e para aceitação global e intenção de compra. No atributo sabor, F1 e F2 apresentaram maiores notas que F5 ( $p<0,05$ ), sem diferença estatística entre as demais amostras, enquanto para o sabor residual, F1, F2 e F3 tiveram maior aceitabilidade que F5, sem diferença entre as demais formulações. Resultados semelhantes foram observados por Ignácio et al<sup>17</sup>, avaliando pão francês adicionado de KCl (0,6 %). Esse efeito pode ser explicado, pois maiores concentrações de potássio podem proporcionar um sabor metálico e/ou amargo residual aos produtos<sup>17</sup>. Outro fator relevante é que a redução gradual de sódio nos alimentos é melhor aceita pelos consumidores do que uma redução total, visto que já existe um limiar de consumo deste mineral, principalmente naqueles que ingerem maiores quantidades<sup>26</sup>.

A adição de GM (*Etapa 2*) não alterou de forma significativa ( $p>0,05$ ) as notas conferidas aos atributos, comparando-se as *Etapas 1* e *2*. Contudo, quando avaliou-se apenas as notas da *Etapa 2*, o GM melhorou a aceitabilidade do atributo sabor para F5, sendo similar a F1. Destaca-se que o GM visa melhorar o sabor dos alimentos, permitindo a substituição do

NaCl em 30 a 40 %<sup>27</sup>. Assim, seu efeito realçador e sua interação com os receptores gustativos podem reduzir a percepção do gosto amargo<sup>17</sup>, o que pode explicar o aumento das notas para o sabor na *Etapa 2*. Dessa forma, a utilização de combinações de NaCl com KCl são as mais indicadas, por reforçarem a salinidade e reduzirem sabores desagradáveis<sup>28</sup>.

Apesar de ter melhorado a aceitabilidade da amostra F5 na *Etapa 2*, sugere-se que a utilização do GM seja realizada com cautela pelas indústrias alimentícias. Isso porque algumas pesquisas demonstraram possíveis associações do realçador com o aumento da pressão arterial<sup>29</sup> e obesidade<sup>20</sup>, dentre outras patologias.

Na *Etapa 1*, a maioria das formulações, em todos os atributos, apresentaram IA elevados (igual ou acima de 70 %), classificando as amostras com boa aceitabilidade<sup>21</sup>. Entretanto, a formulação F5 obteve IA's mais baixos nos atributos sabor, sabor residual e aceitação global. Ressalta-se que para a intenção de compra, todas as amostras tiveram IA's abaixo de 70 %. Este efeito justifica-se, pois além do sabor amargo produzido pelo potássio, pode haver também a formação de outros gostos metálicos e/ou adstringentes<sup>17</sup>, que podem prejudicar a aceitação dos produtos. Além disso, os indivíduos tendem a preferir alimentos com maiores teores de sódio devido aos seus hábitos alimentares<sup>15</sup>, visto que o sal realça o sabor<sup>30</sup>.

Na *Etapa 2*, a adição de GM às formulações promoveu um aumento dos IA's, das formulações. Entretanto, IA's menores que 70 % foram constatados para o sabor residual (F5) e intenção de compra (F1, F4 e F5). Estes resultados corroboram com Yeomans et al<sup>31</sup>, em que o GM (0,5 %) adicionado em sopas proporcionou melhor aceitabilidade para o sabor em comparação as amostras que não foram acrescidas de GM.

As interações do sódio com o GM visam intensificar o sabor global dos produtos, favorecendo a palatabilidade<sup>27</sup>. Entretanto, apesar da adição de GM na *Etapa 2*, não se verificou aumento do sabor salgado dos biscoitos, sendo que todas as formulações com potássio apresentaram menores notas que a padrão (teste de ordenação). Bertino et al<sup>32</sup> demonstraram

**Tabela 2.** Médias dos testes sensorial afetivo, intenção de compra, ordenação (sabor salgado) e índice de aceitabilidade (IA) realizados para as formulações de biscoitos *cream cracker* adicionadas de cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl) e glutamato monossódico (GM)

Amostras/Atributos	F1	F2	F3	F4	F5
	Média ± EPM	Média ± EPM	Média ± EPM	Média ± EPM	Média ± EPM
<i>Etapa 1</i>					
Aparência	7,65 ± 0,13 <sup>aA</sup>	7,45 ± 0,18 <sup>aA</sup>	7,53 ± 0,18 <sup>aA</sup>	7,62 ± 0,16 <sup>aA</sup>	7,53 ± 0,19 <sup>aA</sup>
IA (%)	85,00	82,78	83,67	84,67	83,67
Aroma	7,52 ± 0,14 <sup>aA</sup>	7,32 ± 0,17 <sup>aA</sup>	7,57 ± 0,13 <sup>aA</sup>	7,67 ± 0,14 <sup>aA</sup>	7,37 ± 0,20 <sup>aA</sup>
IA (%)	83,55	81,33	84,11	85,22	81,89
Sabor	6,95 ± 0,20 <sup>aA</sup>	7,00 ± 0,16 <sup>aA</sup>	6,63 ± 0,19 <sup>abA</sup>	6,67 ± 0,17 <sup>abA</sup>	6,07 ± 0,26 <sup>bA</sup>
IA (%)	77,22	77,78	73,66	74,11	67,44
Sabor residual	6,70 ± 0,22 <sup>aA</sup>	6,67 ± 0,19 <sup>aA</sup>	6,65 ± 0,19 <sup>aA</sup>	6,38 ± 0,19 <sup>abA</sup>	5,80 ± 0,25 <sup>bA</sup>
IA (%)	74,44	74,11	73,89	70,89	64,44
Crocância	6,36 ± 0,24 <sup>aA</sup>	6,38 ± 0,22 <sup>aA</sup>	6,30 ± 0,24 <sup>aA</sup>	6,37 ± 0,25 <sup>aA</sup>	6,83 ± 0,27 <sup>aA</sup>
IA (%)	70,67	70,88	70,00	70,78	75,89
Cor	7,60 ± 0,17 <sup>aA</sup>	7,57 ± 0,18 <sup>aA</sup>	7,53 ± 0,18 <sup>aA</sup>	7,90 ± 0,15 <sup>aA</sup>	7,63 ± 0,15 <sup>aA</sup>
IA (%)	84,44	84,11	83,67	87,78	84,78
Aceitação Global	6,47 ± 0,23 <sup>aA</sup>	6,60 ± 0,21 <sup>aA</sup>	6,37 ± 0,20 <sup>aA</sup>	6,57 ± 0,19 <sup>aA</sup>	6,25 ± 0,24 <sup>aA</sup>
IA (%)	71,89	73,33	70,78	73,00	69,44
Intenção de Compra	3,40 ± 0,15 <sup>aA</sup>	3,45 ± 0,13 <sup>aA</sup>	3,35 ± 0,14 <sup>aA</sup>	3,35 ± 0,14 <sup>aA</sup>	3,22 ± 0,18 <sup>aA</sup>
IA (%)	68,00	69,00	67,60	67,60	64,40
Somatório de notas*	229 <sup>a</sup>	209 <sup>ab</sup>	189 <sup>b</sup>	144 <sup>c</sup>	129 <sup>c</sup>
<i>Etapa 2</i>					
Aparência	7,58 ± 0,17 <sup>aA</sup>	7,56 ± 0,15 <sup>aA</sup>	7,51 ± 0,18 <sup>aA</sup>	7,67 ± 0,16 <sup>aA</sup>	7,54 ± 0,17 <sup>aA</sup>
IA (%)	84,22	84,00	83,44	85,22	83,77
Aroma	7,45 ± 0,14 <sup>aA</sup>	7,24 ± 0,15 <sup>aA</sup>	7,33 ± 0,14 <sup>aA</sup>	7,32 ± 0,16 <sup>aA</sup>	7,31 ± 0,16 <sup>aA</sup>
IA (%)	82,77	80,44	81,44	81,33	81,22
Sabor	6,99 ± 0,19 <sup>aA</sup>	7,14 ± 0,16 <sup>aA</sup>	6,84 ± 0,19 <sup>aA</sup>	6,78 ± 0,21 <sup>aA</sup>	6,59 ± 0,25 <sup>aA</sup>
IA (%)	77,67	79,33	76,00	75,33	73,22
Sabor residual	6,99 ± 0,17 <sup>aA</sup>	6,84 ± 0,17 <sup>aA</sup>	6,95 ± 0,18 <sup>aA</sup>	6,68 ± 0,19 <sup>abA</sup>	6,13 ± 0,23 <sup>bA</sup>
IA (%)	77,67	76,00	77,22	74,22	68,11
Crocância	6,43 ± 0,26 <sup>aA</sup>	6,84 ± 0,25 <sup>aA</sup>	6,48 ± 0,26 <sup>aA</sup>	6,76 ± 0,25 <sup>aA</sup>	6,86 ± 0,24 <sup>aA</sup>
IA (%)	71,44	76,00	72,00	75,11	76,22
Cor	7,73 ± 0,14 <sup>aA</sup>	7,68 ± 0,15 <sup>aA</sup>	7,60 ± 0,14 <sup>aA</sup>	7,78 ± 0,15 <sup>aA</sup>	7,76 ± 0,13 <sup>aA</sup>
IA (%)	85,89	85,33	84,44	86,44	86,22
Aceitação Global	6,66 ± 0,18 <sup>aA</sup>	7,03 ± 0,16 <sup>aA</sup>	6,79 ± 0,19 <sup>aA</sup>	6,79 ± 0,19 <sup>aA</sup>	6,43 ± 0,23 <sup>aA</sup>
IA (%)	74,00	78,11	75,44	75,44	71,44
Intenção de Compra	3,39 ± 0,13 <sup>aA</sup>	3,56 ± 0,12 <sup>aA</sup>	3,52 ± 0,14 <sup>aA</sup>	3,41 ± 0,13 <sup>aA</sup>	3,31 ± 0,15 <sup>aA</sup>
IA (%)	67,80	71,20	70,40	68,20	66,20
Somatório de notas*	241 <sup>a</sup>	201 <sup>b</sup>	168 <sup>bc</sup>	148 <sup>c</sup>	142 <sup>c</sup>

Letras diferentes na linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) entre as amostras considerando os atributos da mesma *Etapa*; Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa pelo teste de *t* de *student* ( $p < 0,05$ ) entre o mesmo atributo comparando as *Etapas 1 e 2*; EPM: Erro Padrão da Média; *Etapa 1*: F1 (2 % de NaCl), F2 (1,5 % de NaCl e 0,5 % de KCl), F3 (1 % de NaCl e 1 % de KCl), F4 (0,5 % de NaCl e 1,5 % de KCl) e F5 (2 % de KCl); *Etapa 2*: F1 (2 % de NaCl + 0,3 % de GM), F2 (1,5 % de NaCl e 0,5 % de KCl + 0,3 % de GM), F3 (1 % de NaCl e 1 % de KCl + 0,3 % de GM), F4 (0,5 % de NaCl e 1,5 % de KCl + 0,3 % de GM) e F5 (2 % de KCl + 0,3 % de GM); \*Diferença mínima significativa (DMS) entre as amostras com valor  $\geq 34$  apresentam diferença estatística ( $p < 0,05$ ), segundo a Tabela de Christensen<sup>21</sup> para 60 julgamentos e 5 amostras

que a preferência pelo sal em alimentos varia conforme seu consumo habitual, porém sua ingestão pode ser reduzida gradualmente.

### Composição físico-química

Na **Tabela 3** está descrita a composição físico-química e os valores diários recomendados (VD) do biscoito padrão comparado com um produto de referência.

Os teores de umidade e cinzas de F1 (*Etapas 1*) foram  $4,91 \pm 0,04\%$  e  $3,78 \pm 0,02\%$ , respectivamente, enquanto na *Etapas 2* os valores foram de  $4,06 \pm 0,03\%$  e  $3,92 \pm 0,02\%$ , respectivamente (*t* de student,  $p < 0,05$ ). Esses resultados se devem ao conteúdo de sódio (13 %) presente no GM<sup>33</sup>. Com isso, eleva-se o teor de minerais presentes no produto e reduz-se a quantidade de água, devido ao poder desidratante do sal<sup>34</sup>. O teor de umidade das formulações F1 (*Etapas 1* e *2*) se apresentou conforme o recomendado pela legislação brasileira para biscoitos (máximo de 14 %)<sup>35</sup>. Fato que colabora para o baixo crescimento de microrganismos e maior *shelf life* dos produtos<sup>36</sup>. Entretanto, o conteúdo de cinzas ultrapassou a recomendação máxima de 3 %<sup>35</sup>, o que se deve a adição de linhaça aos biscoitos, a qual possui maior teor de minerais em sua composição (3,7 g/100g), quando comparada a farinha de trigo (0,8 g/100g)<sup>14</sup>.

Os teores de proteínas e lipídeos foram similares entre F1 e o produto comercial. Entretanto, maiores conteúdos de carboidratos

e calorias e menores de fibras foram constatados em F1. Esses resultados são explicados devido ao biscoito referência apresentar em sua composição, além da linhaça, o farelo de trigo e fibra de aveia, os quais justificam os maiores teores de fibras e menores de carboidratos. Porém, o biscoito *cream cracker* em estudo pode ser considerado como um produto fonte de fibra alimentar, visto que possui um valor muito próximo (2,97 g/100g) ao recomendado pela legislação brasileira (3,0 g/100g)<sup>37</sup>.

Em relação ao teor lipídico, vale ressaltar que a linhaça é um grão composto por um alto teor de gorduras monoinsaturadas (7,1 g/100g), poliinsaturadas (25,3 g/100g) e ácidos graxos n-3 (19,81 g/100g) e n-6 (5,42 g/100g)<sup>14</sup>. Estes nutrientes não são sintetizados pelo organismo e, assim, necessitam ser ingeridos pela dieta<sup>1</sup>, pois apresentam importantes funções como a modulação da resposta inflamatória e imunológica<sup>38</sup>. Assim, uma porção de 30 g de biscoito *cream cracker* adicionado de farinha de linhaça, forneceria 5,95 g/dia de ácido graxo  $\alpha$ -linolênico (C18:3, n-3), o que ultrapassa a recomendação que é 2,22 g/dia (dieta de 2.000 kcal/dia)<sup>39</sup>. Estes maiores níveis de ácidos graxos n-3 nos produtos avaliados trazem uma significativa contribuição para uma dieta saudável.

A **Tabela 4** apresenta os teores médios de sódio e potássio das cinco formulações de biscoito avaliadas.

**Tabela 3.** Composição físico-química e valores diários recomendados – VD\* (porção média de 30 g) do biscoito *cream cracker* padrão (F1) sem glutamato monossódico, comparados com um produto comercial de referência\*\*

Avaliação	F1		Referência**
	Média $\pm$ DP	VD (%)*	
Proteínas (g.100g <sup>-1</sup> )***	11,95 $\pm$ 0,06	4,88	11,00
Lipídios (g.100g <sup>-1</sup> )***	14,48 $\pm$ 0,07	5,92	15,00
Carboidratos (g.100g <sup>-1</sup> )***	68,62 $\pm$ 0,28	8,08	60,00
Calorias (kcal.100g <sup>-1</sup> )***	449,43 $\pm$ 0,85	6,72	420,00
Fibra alimentar (g.100g <sup>-1</sup> )****	2,97	6,15	11,00

\*VD: nutrientes avaliados pela média da DRI<sup>25</sup>, com base numa dieta de 2.004,87 kcal/dia; \*\*Valores comparados com um produto similar vendido comercialmente; \*\*\*Valores calculados em base úmida; \*\*\*\*cálculo teórico<sup>14</sup>; DP: desvio padrão da média

**Tabela 4.** Composição química em 100 g de produto (sódio - Na e potássio - K) e valores diários recomendados - VD (porção média de 30 g) das formulações de biscoito *cream cracker*, *Etapas 1 e 2*

	F1 (mg/100g) Média ± DP	VD (%)	F2 (mg/100g) Média ± DP	VD (%)	F3 (mg/100g) Média ± DP	VD (%)	F4 (mg/100g) Média ± DP	VD (%)	F5 (mg/100g) Média ± DP	VD (%)
<i>Etapa 1</i>										
Na	905,23 ± 0,05 <sup>a</sup>	13,58	702,87 ± 0,09 <sup>b</sup>	10,54	503,45 ± 0,04 <sup>c</sup>	7,55	302,74 ± 0,07 <sup>d</sup>	4,54	105,14 ± 0,02 <sup>e</sup>	1,58
% redução Na	0,00		22,35		44,38		66,56		88,39	
K	131,57 ± 0,08 <sup>e</sup>	1,53	393,32 ± 0,02 <sup>d</sup>	4,57	655,07 ± 0,03 <sup>c</sup>	7,61	916,82 ± 0,05 <sup>b</sup>	10,65	1.178,57 ± 0,02 <sup>a</sup>	13,70
% aumento K	0,00		198,94		397,88		596,83		795,77	
<i>Etapa 2</i>										
Na	942,13 ± 0,04 <sup>a</sup>	14,13	740,75 ± 0,08 <sup>b</sup>	11,11	541,78 ± 0,03 <sup>c</sup>	8,13	345,54 ± 0,06 <sup>d</sup>	5,18	143,15 ± 0,05 <sup>e</sup>	2,15
% aumento/redução Na	4,08 <sup>u</sup>		18,17 <sup>β</sup>		40,15 <sup>β</sup>		62,83 <sup>β</sup>		84,19 <sup>β</sup>	

Resultados em base úmida; Letras diferentes na linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ); DP: Desvio Padrão da Média; VD: nutrientes avaliados considerando-se um consumo diário de 2.000 mg de Na<sup>+</sup> e 2.581,3 mg de K<sup>+</sup>; <sup>u</sup>%, <sup>β</sup>% de aumento em relação à F1 (*Etapa 1*); <sup>α</sup>% de redução em relação à F1 (*Etapa 1*); *Etapa 1*: F1 (2 % de NaCl), F2 (1,5 % de NaCl e 0,5 % de KCl), F3 (1 % de NaCl e 1 % de KCl), F4 (0,5 % de NaCl e 1,5 % de KCl) e F5 (2 % de NaCl e 0,3 % de GM), F2 (1,5 % de NaCl e 0,5 % de KCl + 0,3 % de GM), F3 (1 % de NaCl e 1 % de KCl + 0,3 % de GM), F4 (0,5 % de NaCl e 1,5 % de KCl + 0,3 % de GM) e F5 (2 % de NaCl + 0,3 % de GM)

Tanto na *Etapa 1* como na *Etapa 2*, o teor de sódio foi reduzindo significativamente, conforme se aumentou o conteúdo de potássio nas formulações. Entretanto, na *Etapa 2* houve um aumento de Na nos produtos, já que o GM contém, 13 % de sódio em sua composição<sup>33</sup>.

Considerando-se que a amostra F4 foi aquela com maior teor de KCl (*Etapa 1* e *2*) e com aceitação sensorial similar ao biscoito padrão em todos os atributos (Tabela 2), foi possível uma redução média de 66,56 % de sódio (302,74 mg/100g) em relação ao padrão. Este efeito corrobora com a meta nacional para redução de sódio em biscoitos *cream cracker* de até 699 mg/100g, a qual havia sido proposta até o ano de 2014<sup>40</sup>. Resultados semelhantes foram observados por Ignácio et al<sup>17</sup>, que verificaram uma redução de 42,5 % de sódio em pão francês.

O teor de sódio do produto comercial utilizado para comparação (Tabela 3) corresponde a 883,33 mg/100g, bastante similar ao produto padrão (905,23 mg/100g) em estudo. Segundo o Informe Técnico 69/2015 da Anvisa, que trata sobre o teor de sódio nos alimentos processados no Brasil<sup>15</sup>, a média de sódio em biscoitos *cream cracker* é de 793 mg/100g (variando de 683 até 919 mg/100g). Assim, constata-se que as amostras F1 e F2 (*Etapas 1* e *2*) corroboram com os resultados verificados no referido documento. Contudo, F3, F4 e F5, em ambas as *Etapas*, apresentaram quantidades de sódio inferiores ao Informe Técnico<sup>15</sup>.

O NaCl possui várias funções nos produtos de panificação, além de significativa contribuição no sabor. Na presente pesquisa, a sua redução foi perceptível pelos consumidores apenas com a substituição completa pelo KCl. Este efeito comprova que existem dificuldades para a restrição total este mineral nos produtos<sup>17</sup>, o que demonstra a necessidade de mais pesquisas e investimentos nesta área. Apesar disso, os resultados deste trabalho contribuem para as metas preconizadas em relação à redução de sódio no país, auxiliando na prevenção e controle das doenças crônicas não transmissíveis, em especial à HAS<sup>3,18</sup>.

## CONCLUSÃO

Foi possível reduzir o teor de NaCl e elevar o conteúdo de KCl nas formulações de biscoitos *cream cracker*, sem interferir na aceitação sensorial, com um nível de adição de até 1,5 % de KCl (redução de 75 % de NaCl).

A adição de GM apresenta pouca influência na aceitabilidade dos produtos, não justificando sua utilização em biscoitos. Assim sendo, é possível restringir o teor de NaCl em biscoitos *cream cracker*, principalmente por meio de sua utilização conjunta com o KCl.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

## REFERÊNCIAS

1. Mahan LK, Escott-Stump S. Krause: Alimentos, Nutrição e Dietoterapia. 12ª ed. Rio de Janeiro (RJ): Elsevier; 2010.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Diretrizes e recomendações para o cuidado integral de doenças crônicas não transmissíveis: promoção da saúde, vigilância, prevenção e assistência. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2008.
3. World Health Organization – WHO. Global status report on non communicable diseases 2010. Geneva; 2011.
4. World Health Organization – WHO. Guideline: sodium intake for adults and children. Geneva; 2012.
5. Sarno F, Claro RM, Levy RB, Bandoni DH, Monteiro CA. Estimativa de consumo de sódio pela população brasileira, 2008-2009. *Rev Saude Publica*. 2013;47(3):571-8. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-8910.2013047004418>].

6. Ni Mhurchu C, Capelin C, Dunford EK, Webster JL, Neal BC, Jebb SA. Sodium content of processed foods in the United Kingdom: analysis of 44,000 foods purchased by 21,000 households. *Am J Clin Nutr*. 2011;93(3):594-600. [DOI: 10.3945/ajcn.110.004481].
7. Angus F. Dietary salt intake: Sources and targets for reduction. In: *Reducing Salt in Foods*. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd; 2007. p.3-17.
8. Zhao D, Qi Y, Zheng Z, Wang Y, Zhang XY, Li HJ, et al. Dietary factors associated with hypertension. *Nat Rev Cardiol*. 2011;8(8):456-65. [DOI: 10.1038/nrcardio.2011.75].
9. Nilson EA, Jaime PC, Resende DO. Iniciativas desenvolvidas no Brasil para a redução do teor de sódio em alimentos processados. *Rev Panam Salud Publica*. 2012;32(4):287-92. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1020-49892012001000007>].
10. Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação (ABIA). Relatório anual 2010. [acesso 2014 Mar 28]. Disponível em: [<http://http://www.abia.org.br/anexos/RelatorioAnualABIA2010.pdf>].
11. Crowe KM, Francis C. Position of the academy of nutrition and dietetics: functional foods. *J Acad Nutr Diet*. 2013;113(8):1096-103. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jand.2013.06.002>].
12. Costa NMB, Rosa COB. Alimentos Funcionais – Componentes bioativos e efeitos fisiológicos. 1ª ed. Rio de Janeiro (RJ): Rubio; 2010.
13. Mueller K, Eisner P, Yoshie-Stark Y, Nakada R, Kirchhoff E. Functional properties and chemical composition of fractionated brown and yellow linseed meal (*Linum usitatissimum* L.). *J Food Eng*. 2010;98(4):453-60. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.01.028>].
14. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO). Núcleo de Estudos e Pesquisas em alimentação - NEPA/UNICAMP. 4ª ed. Campinas (SP): NEPA/ UNICAMP; 2011.
15. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Teor de sódio nos alimentos processados. Informe técnico n. 69/2015. [acesso 2016 Fev 27]. Disponível em: [<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388729/Informe+T%C3%A9cnico+n%C2%BA+69+de+2015/85d1d8f0-5761-4195-9aee-e992abd29b3e>].
16. Broch AN, Carvalho CB, Madrona GS. Análise Sensorial de Queijo Mussarela com Reduzido Teor de Sódio. *Rev GEINTEC*. 2014;4(2):841-9. [DOI: 10.7198/S2237-0722201400020011].
17. Ignácio AKF, Rodrigues JTD, Niizu PY, Chang YK. Efeito da substituição de cloreto de sódio por cloreto de potássio em pão francês. *Braz J Food Technol*. 2013;16(1):1-11. [DOI: 10.1590/S1981-67232013005000010].
18. Silva SMCS, Mura JDP. Tratado de Alimentação, Nutrição & Dietoterapia. 2ª ed. São Paulo (SP): Roca; 2014.
19. Garcia RG, Santos VMO, Caldara FR, Paz ICLA, Nääs IA, Simm S., et al. Qualidade de filés de peito de frango de corte marinados e maturados. *Rev Agrarian*. 2012;5(16):166-73.
20. Insawang T, Selmi C, Chaon U, Pethlert S, Yongvanit P, Areejitranusorn P, et al. Monosodium glutamate (MSG) intake is associated with the prevalence of metabolic syndrome in a rural Thai population. *Nutr Metab*. 2012; 9(1):50. [DOI: 10.1186/1743-7075-9-50].
21. Dutcosky SD. Análise sensorial de alimentos. 3ª ed. Curitiba (PR): Champagnat; 2011.
22. Tozatti P, Rigo M, Bezerra JRMV, Córdova KRV, Teixeira AM. Utilização de Resíduo de Laranja na Elaboração de Biscoitos Tipo Cracker. *Rev Cienc Exatas Nat*. 2013;15(1):135-50. [DOI:10.5935/RECEN.2013.01.08].
23. Official Methods of Analysis of AOAC International (AOAC). 18<sup>th</sup> ed (rev 4). Gaithersburg: AOAC; 2011.

24. Merrill AL, Watt BK. Energy values of foods: basis and derivation. *Agricultural Handbook*. Washington (DC): USDA; 1973.
25. Dietary Reference Intakes (DRI). Dietary Reference Intakes for Water, Potassium, Sodium, Chloride, and Sulfate. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Washington (DC): National Academy Press; 2005.
26. Bobowski N, Rendahl A, Vickers Z. Preference for salt in a food may be alterable without a low sodium diet. *Food Qual Prefer*. 2015;39:40-5. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodqual.2014.06.005>].
27. Yamaguchi S, Takashi C. Interactions of monosodium glutamate and sodium chloride on saltiness and palatability of clear soup. *J Food Sci* 1984;49(1):82-5. [DOI: [10.1111/j.1365-2621.1984.tb13675.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1984.tb13675.x)].
28. Keast RSJ, Hayes JE. Successful sodium reduction. The world of food ingredients. *Food Ingr*. 2011;1(1):10-3.
29. Shi Z, Yuan B, Taylor AW, Dai Y, Pan X, Gill TK, et al. Monosodium glutamate is related to a higher increase in blood pressure over 5 years: findings from the Jiangsu Nutrition Study of Chinese adults. *J Hypertens*. 2011;29(5):846-53. [DOI: [10.1097/HJH.0b013e328344da8e](https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e328344da8e)].
30. Soares DCM, Miguel DP, Borges DO. Elaboração de Queijo Minas Frescal com substituição parcial e total de cloreto de sódio (NaCl) por cloreto de potássio (KCl). *Cad. Pós Grad FAZU*. 2011; 2(1):1-5.
31. Yeomans MR, Gould NJ, Mobini S, Prescott J. Acquired flavor acceptance and intake facilitated by monosodium glutamate in humans. *Physiol Behav*. 2008;93(4-5): 958-66. [DOI: [10.1016/j.physbeh.2007.12.009](https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.12.009)].
32. Bertino M, Beauchamp GK, Engelman K. Long-term reduction in dietary sodium alters the taste of salt. *Am J Clin Nutr*. 1982;36(6):1134-44.
33. Branen AL, Davidson PM, Salminen S, Thomgate III JH. *Food Additives*. 2<sup>nd</sup> ed. New York (NY): Marcel Dekker; 2002.
34. Schneider IS. A aplicação do sal como conservador de alimentos. Curso de Especialização em Higiene da Carne. São Paulo (SP): Departamento de Inspeção e Tecnologia de Produtos de Origem Animal; 1969.
35. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução CNNPA nº 12, de março de 1978. Aprova o regulamento técnico para biscoitos e bolachas. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 24 jul. 1978. Seção 1.
36. Jay JM. *Microbiologia de alimentos*. 6<sup>a</sup> ed. Porto Alegre (RS): Artmed; 2005.
37. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n. 54, de 12 de novembro de 2012. Dispõe sobre o Regulamento Técnico sobre Informação Nutricional Complementar. [acesso em 2015 Ago]. Disponível em: [[http://bvsm.sau.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0054\\_12\\_11\\_2012.html](http://bvsm.sau.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0054_12_11_2012.html)].
38. Carmo MCNS, Correia MITD. A Importância dos Ácidos Graxos Ômega-3 no Câncer. *Rev Bras Cancerol*. 2009;55(3):279-87.
39. Simopoulos AP, Leaf A, Salem JrN. Essentiality of and recommended dietary intakes for omega-6 and omega-3 fatty acids. *Ann Nutr Metab*. 1999;43(2):127-30. [DOI: [10.1159/000012777](https://doi.org/10.1159/000012777)].
40. Brasil. Ministério da Saúde. Termo de Compromisso entre o Ministério da Saúde e as Associações Brasileiras das indústrias de Alimentação, das indústrias de Massas Alimentícias, da indústria de trigo e da indústria de Panificação e Confeitaria, de 13 de dezembro de 2011. [acesso em 2016 fev]. Disponível em: [[http://189.28.128.100/dab/docs/portaldab/documentos/termo\\_5\\_dez\\_2011.pdf](http://189.28.128.100/dab/docs/portaldab/documentos/termo_5_dez_2011.pdf)].



# Efeitos da modificação por ácidos orgânicos e do processo de secagem sobre as propriedades de expansão do amido de mandioca

## Effects of modification by organic acids and the drying process on the expansion properties of cassava starch

RIALA6/1693

Vanessa Maria GERVIN, Ana Carolina Moura de Sena AQUINO, Edna Regina AMANTE\*

\*Endereço para correspondência: Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Rodovia Admar Gonzaga, 1346, CEP 88034-001, Florianópolis, SC, Brasil. Tel: 48 3721 5371. E-mail: e.amante@ufsc.br

Recebido: 14.04.2016 - Aceito para publicação: 23.06.2016

### RESUMO

O amido fermentado de mandioca, polvilho azedo, possui ampla aplicação em produtos de panificação, devido à propriedade de expansão, sem fermento e sem glúten, o que alavancou a comercialização dos amidos substituintes modificados por ácido. O polvilho azedo é fermentado e seco ao sol, com a geração de ácidos: acético, butírico, láctico e propiônico, enquanto os amidos modificados por ácido não são fermentados. Neste trabalho foi produzido o polvilho azedo, seco ao sol e em estufa e amidos modificados pelos ácidos prevalentes na fermentação, secos em UVC. Todos os amidos foram comparados, quanto aos ácidos orgânicos, dos amidos secos em diferentes condições e apenas fermentados, sem secagem, bem com quanto às características físico-químicas e reológicas. Ficou comprovado que a secagem solar favorece um produto mais ácido e de maior expansão. O maior volume específico foi observado para a amostra fermentada seca ao sol, seguida das modificadas por ácido láctico 0,5 % e ácido acético 0,5 % e ácido láctico 1 %. A baixa expansão da amostra fermentada e seca em estufa (E) mostrou que apenas a presença dos ácidos orgânicos não é suficiente para expansão e que a radiação UV (artificial ou solar) influencia diretamente nessa característica.

**Palavras-chave.** polvilho azedo, secagem, amido modificado, UVC.

### ABSTRACT

The fermented cassava starch, polvilho azedo, has wide application in bakery products, due to expansion property without yeast and gluten, which leveraged the marketing of starches modified by acid. The cassava starch is fermented and sun dried, with the generation of acids: acetic, butyric, lactic and propionic, while starches modified by acid are not fermented. In this work was produced cassava starch, dried in the sun and under oven, and modified by the acids of cassava starch fermentation, dried in UVC. All starches were compared, as the organic acids, dry starches in different conditions and only fermented without drying, as well as with the physicochemical and rheological characteristics. It was proven that solar drying favors a more acidic product and expansion property. The higher specific volume was observed for the sample fermented sun dried, followed by modified by 0.5 % lactic acid and 0.5 % acetic acid and lactic acid 1 %. The low expansion of the fermented sample and dried in an oven showed that only organic acids is not sufficient for expansion and that UV radiation (solar or artificial) directly influences this characteristic.

**Keywords.** fermented cassava starch, drying, modified starch, UVC.



## INTRODUÇÃO

O polvilho azedo é o amido de mandioca modificado por processo de fermentação natural e secagem solar, apresentando características diferentes do amido de mandioca nativo. É um produto regional e de preparo artesanal, sendo fabricado por um grande número de indústrias rurais de pequeno porte, com destaque no Brasil, em microrregiões produtoras dos Estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul<sup>1</sup>.

Embora seja um produto típico do Brasil, seu valor comercial e demanda, vêm crescendo, como uma alternativa para a população celíaca, devido à ausência de glúten, o que tem inserido no mercado os amidos modificados por ácido e não fermentados, sendo este aspecto desconhecido pela maioria dos consumidores, apesar da indicação de amidos modificados como ingredientes em alimentos embalados<sup>2</sup>.

As modificações decorrentes tanto do processo fermentativo, quanto da secagem ao sol, têm sido estudadas por mais de quatro décadas, com muitos trabalhos publicados<sup>3-8</sup>. Apesar disso, o setor não tem mudado as suas características de produção artesanal, o que acarreta uma grande diferença de outros produtos fermentados como, por exemplo, derivados do leite, da uva, da cana-de-açúcar, ou mesmo da carne, onde, como benefícios científicos as teorias são aplicadas e os produtos vêm evoluindo e atingindo padrões de qualidade regulares e reconhecidos.

A falta de aplicações do polvilho azedo não constitui justificativa plausível para a estagnação do setor. Muitos produtos típicos da indústria de panificação brasileira têm o polvilho azedo como principal ingrediente. Este é um produto que confere crescimento às massas, sem adição de fermento e sem a presença de glúten, o que o torna interessante para muitos consumidores, principalmente para os celíacos. A demanda pelo polvilho azedo é tão expressiva que as indústrias de amido modificado por ácido ofertam a este mercado um substituto, com menor preço, que também apresenta propriedade de expansão, mas não apresenta as características

do produto tradicional. Este cenário inexistente em trabalhos publicados, apenas em declaração de inúmeros produtores que se sentem lesados por esta oferta com grande capacidade de inserção comercial.

Portanto, a pequena e a média indústria tradicional e artesanal do polvilho azedo convivem com a concorrência das grandes empresas, que produzem em larga escala e que oferecem substitutos de menor preço e o consumidor, por sua vez, vem consumindo o amido modificado por ácido comercializado como polvilho azedo. Ocorre que o substituto não é fermentado e não possui as características sensoriais típicas do polvilho azedo, atribuídas à geração de compostos resultantes das fermentações envolvidas no processo produtivo. Portanto, aromas e sabores desenvolvidos durante o processo fermentativo são incomparáveis aos dos amidos modificados quimicamente. Durante a fermentação, predominam os ácidos láctico, acético, butírico e propiônico, além de outros compostos derivados da degradação da amilose e da amilopectina dos grânulos de amido, como consequência tanto da fermentação quanto da radiação ultravioleta, uma vez que a secagem ao sol corresponde à etapa final do processo produtivo do polvilho azedo. Ao mesmo tempo, as condições climáticas prevalentes nas regiões produtoras vêm requerer estudos sobre os efeitos da radiação UVC artificial. Portanto, o objetivo desse trabalho foi estudar os efeitos da adição dos principais ácidos (láctico, acético, propiônico e butírico), que também são formados na fermentação natural, sobre a propriedade de expansão do polvilho azedo seco ao sol e sob radiação UVC artificial.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras

Foi utilizado amido de mandioca nativo comercial, tanto para os tratamentos com fermentação, quanto para os com modificações ácidas.

O amido de mandioca foi submetido à fermentação em laboratório, em triplicata e em temperatura ambiente, durante os meses de

junho e agosto de 2014 em tanques de polietileno de alta densidade com capacidade de 20 litros, adicionado de inóculo (amido de mandioca fermentado seco) na proporção de 7,5 % (m/m)<sup>9</sup>, e homogeneizado com água mineral sem gás em quantidade suficiente até atingir uma lâmina de 10 cm sobre a massa de amido. A fermentação foi acompanhada com análises de pH, acidez total titulável (ATT) nas águas sobrenadantes e medições da temperatura e da umidade relativa do ambiente. Após a fermentação por 60 dias, a água do processo fermentativo foi drenada e os amidos de mandioca fermentados foram secos por dois métodos: secagem ao sol (SS) e secagem em estufa (SE).

Para a realização da modificação por ácidos foi utilizado o mesmo amido nativo utilizado no processo fermentativo. Amostras de 200 g de amido foram suspensas em soluções de ácidos orgânicos na proporção de 1:5 ácido e água (p/p)<sup>10</sup>, por quatro horas. Foram realizados 15 tratamentos

de modificação com os ácidos láctico, acético, propiônico e butírico (**Tabela 1**). Sendo que, para uma posterior caracterização, foram selecionados os que apresentaram maiores e menores expansões (dois tratamentos de cada) dos biscoitos produzidos com essas amostras.

Após o tratamento, as amostras T1 a T15 foram recuperadas por filtração a vácuo e submetidas à radiação artificial, com duas lâmpadas de radiação UVC (254 nm, Philips), dispostas a uma distância de aproximadamente 8 cm da amostra, por 30 minutos sendo revolvidas a cada 10 min. Em seguida, foram secos a 45 °C em estufa com circulação e renovação de ar até umidade inferior a 14 g/100 g<sup>11,12</sup>. Após a secagem, as amostras foram moídas em processador doméstico (Philips Walita, RI7625/71, China), acondicionadas em saco de polietileno de baixa densidade, devidamente identificados e armazenados em recipientes fechados até o momento das análises.

**Tabela 1.** Descrição das amostras de amido obtidas por modificação ácida

Amostras	Tratamentos
T1	ácido láctico 1 %
T2	ácido acético 1 %
T3	ácido propiônico 1 %
T4	ácido butírico 1 %
T5	ácido láctico 0,5 % + ácido acético 0,5 %
T6	ácido láctico 0,5 % + ácido propiônico 0,5 %
T7	ácido láctico 0,5 % + ácido butírico 0,5 %
T8	ácido acético 0,5 % + ácido propiônico 0,5 %
T9	ácido acético 0,5 % + ácido butírico 0,5 %
T10	ácido propiônico 0,5 % + ácido butírico 0,5 %
T11	ácido láctico 0,33 % + ácido acético 0,33 % + ácido propiônico 0,33 %
T12	ácido láctico 0,33 % + ácido propiônico 0,33 % + ácido butírico 0,33 %
T13	ácido acético 0,33 % + ácido propiônico 0,33 % + ácido butírico 0,33%
T14	ácido láctico 0,33 % + ácido acético 0,33 % + ácido butírico 0,33 %
T15	ácido láctico 0,25 % + ácido acético 0,25 % + ácido propiônico 0,25 % + ácido butírico 0,25 %

### Caracterização físico-química

O pH foi determinado por leitura direta do líquido sobrenadante, após mistura de 10 g de amostra de amido em 100 mL de água destilada utilizando potenciômetro (marca Quimis, modelo Q400A, Diadema, Brasil). A acidez titulável por titulação de NaOH 0,1 mol/L até atingir pH 8,2 a 8,3, utilizando solução alcoólica de fenolftaleína para determinação da mudança de cor e foi expressa em mL de NaOH 1 mol/L por 100 g de matéria seca. A análise de umidade foi realizada através de secagem em estufa a 105 °C<sup>13</sup>.

### Propriedade de expansão

Foram elaborados biscoitos através da formulação proposta por Nunes e Cereda<sup>3</sup>, onde se misturou 50 g de amido de mandioca modificado com 40 mL de água fervente. A massa foi modelada em cinco biscoitos redondos de aproximadamente 10 g cada, os quais foram distribuídos em assadeira e levados ao forno elétrico termostatizado a temperatura de 200 °C, por 25 min. O índice de expansão foi determinado através do método proposto por Maeda e Cereda<sup>1</sup>. O diâmetro médio dos biscoitos foi medido com paquímetro digital (Lee Tools, China) antes e após o forneamento. Os biscoitos depois de assados e resfriados foram pesados e avaliados pelo método de deslocamento de sementes de painço, sendo as sementes deslocadas medidas em proveta. O resultado da razão entre o volume das sementes deslocadas e o peso dos biscoitos após o forneamento foi expresso em volume específico (mL/g)<sup>14</sup>. A avaliação dos biscoitos por perda de peso (percentagem de perda após o forneamento), foi realizada de acordo com Marcon et al.<sup>15</sup>

### Propriedades de pasta

Foram determinadas utilizando o analisador rápido de viscosidade (RVA - *Rapid Visco Analyser 4000* - Perten Instruments), através do programa *Thermocline for Windows*, onde 2,5 g de amostra foram dispersos em 25 g de água, com correção para 14 % de umidade. A programação utilizada foi um tempo total de corrida de 13 min, iniciando com temperatura de 50 °C mantida por 1 min, aquecimento até 95 °C por 6 min, seguido

de resfriamento até 50 °C por 6 min. A rotação iniciou em 960 rpm por 10 s e diminuiu para 160 rpm no decorrer da análise. A partir dos amilogramas obtidos foram avaliadas as seguintes características: viscosidade máxima (RVU), *breakdown* ou quebra (RVU), viscosidade final (RVU), *setback* ou tendência à retrogradação (RVU) e temperatura de pasta (°C).

### Determinação e quantificação de ácidos orgânicos

As amostras fermentadas, com e sem secagem, e modificadas por ácidos, submetidas à radiação artificial UVC e secas em estufa, foram preparadas de acordo com Demiate et al.<sup>5</sup>, sendo que 15 g foram suspensos em 30 mL de solução de ácido sulfúrico 0,005 mol/L por um período de 24 h em temperatura ambiente com agitação ocasional. Essas suspensões foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 min e a 6000 rpm por 20 min e, em seguida, filtradas em membrana de politetrafluoretileno (PTFE) de 0,22 µm (Allcrom, São Paulo, Brasil) para posterior injeção no cromatógrafo líquido de alta eficiência.

Os experimentos foram conduzidos de acordo com Aquino et al.<sup>16</sup>. O sistema de cromatografia líquida consistiu em um módulo de separação, equipado com uma bomba quaternária e um desgaseificador (LC-20AT), um injetor automático (SIL-10A) com um *loop* de 20 µL, um detector de arranjo de diodos (SPD-M20A) com faixa de trabalho de comprimento de onda 190-230 nm, controlados por uma estação de trabalho (CBM-20A), com sistema de aquisição de dados LC Solutions *software*, todos fabricados pela Shimadzu Corporation (Kyoto, Japão). Para fase estacionária foi utilizada uma coluna C18, Hichrom (150 x 4,6 mm - Berkshire, UK), sendo o fluxo isocrático de 0,6 mL/min para as fases móveis.

As fases móveis utilizadas foram constituídas por solução de fosfato de potássio monobásico -  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Proquimios, Rio de Janeiro, Brasil) 0,02 mol/L com pH 2,88 ± 0,02 ajustado com ácido fosfórico (Nuclear, São Paulo, Brasil) e 2 % de metanol para os ácidos láctico, acético e propiônico<sup>17</sup>, e por solução de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

0,02 mol/L com pH  $2,88 \pm 0,02$  (ajustado com ácido fosfórico) e 40 % de metanol para o ácido butírico.

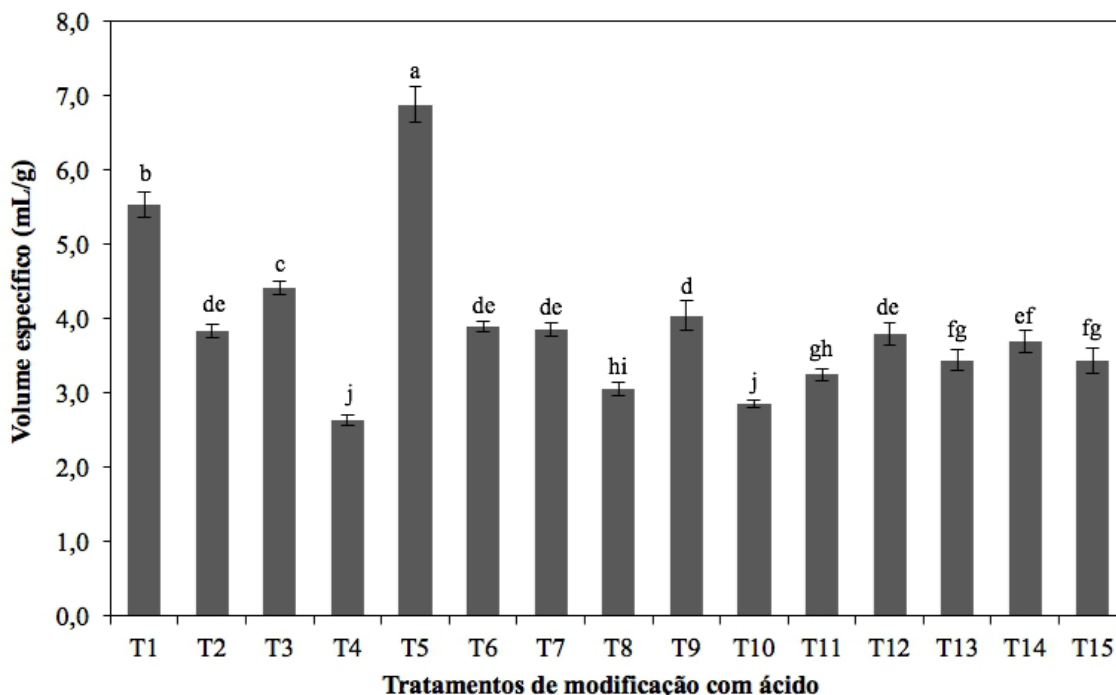
Os ácidos foram identificados nas amostras com base nos seus tempos de retenção e pela comparação entre os espectros, na região do ultravioleta, dos compostos nas soluções padrões e dos picos detectados nas amostras. Para a quantificação foi selecionado o comprimento de onda de 220 nm.

### Análise estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata ( $n=3$ ) e os resultados expressos como média e desvio padrão. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste de comparação de médias (Tukey, nível de significância de 5 %). Todo tratamento estatístico dos dados foi realizado utilizando o programa *Statistica*® versão 7.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante a fermentação do amido de mandioca por 60 dias, os valores médios da temperatura ambiente e da umidade relativa do ar foram 21 °C e 75 %, respectivamente. Dos 15 tratamentos de modificação ácida aplicados, os resultados de volume específico foram utilizados para verificar os tratamentos que resultaram em maiores e menores expansões dos biscoitos elaborados com as amostras. Observou-se que, de acordo com a **Figura 1**, as amostras T1 e T5 apresentaram expansões significativamente ( $p<0,05$ ) maiores ( $5,54 \pm 0,17$  mg/L e  $6,88 \pm 0,24$  mg/L, respectivamente), enquanto que as amostras T4 e T10 resultaram em expansões significativamente ( $p<0,05$ ) menores ( $2,64 \pm 0,07$  mg/L e  $2,85 \pm 0,05$  mg/L, respectivamente).



**Figura 1.** Volume específico dos biscoitos elaborados com os amidos de mandioca modificados por ácido. Letras iguais sobre as barras de erro entre as amostras, nos diferentes tratamentos, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. T1: ácido láctico 1 %; T2: ácido acético 1 %; T3: ácido propiônico 1 %; T4: ácido butírico 1 %; T5: ácido láctico 0,5 % + ácido acético 0,5 %; T6: ácido láctico 0,5 % + ácido propiônico 0,5 %; T7: ácido láctico 0,5 % + ácido butírico 0,5 %; T8: ácido acético 0,5 % + ácido propiônico 0,5 %; T9: ácido acético 0,5 % + ácido butírico 0,5 %; T10: ácido propiônico 0,5 % + ácido butírico 0,5 %; T11: ácido láctico 0,33 % + ácido acético 0,33 % + ácido propiônico 0,33 %; T12: ácido láctico 0,33 % + ácido propiônico 0,33 % + ácido butírico 0,33 %; T13: ácido acético 0,33 % + ácido propiônico 0,33 % + ácido butírico 0,33 %; T14: ácido láctico 0,33 % + ácido acético 0,33 % + ácido butírico 0,33 %; T15: ácido láctico 0,25 % + ácido acético 0,25 % + ácido propiônico 0,25 % + ácido butírico 0,25 %.

Diante destes resultados, os tratamentos T1, T4, T5 e T10 foram repetidos a fim de caracterizar as amostras e de comparar o efeito das modificações ácidas e da radiação UVC com as amostras de amido de mandioca nativo e de amido de mandioca fermentado seco ao sol e em estufa.

### Caracterização físico-química e propriedades de pasta

As amostras estudadas obtiveram valores de umidade entre 9,49 e 12,65 g/100g (**Tabela 2**). A legislação vigente<sup>16</sup> não estabelece parâmetros de qualidade para o polvilho azedo, apenas para o amido de mandioca, sendo o limite máximo permitido de 18 g/100g. O valor de 11,32 g/100g encontrado para o amido nativo está de acordo com o verificado por Aplevicz e Demiate<sup>18</sup> que encontraram valores variando de 10,70 a 12,39 g/100g para amidos de mandioca comerciais. O valor de pH (6,47) do amido nativo ficou próximo da neutralidade, com uma acidez total titulável de 0,42 mL de NaOH/100g, apresentando uma baixa acidez, característica dessa amostra. Esse valor de pH está de acordo com os encontrados por Garcia e Leonel<sup>12</sup> ao analisarem amostras de amido de batata-doce (6,09), de biri (6,40), de mandioca (6,44) e de taioba (6,25).

Para os amidos fermentados (E e SS) os valores de pH e acidez titulável, respectivamente, para as duas secagens estudadas foram 3,94 e 3,70 mL NaOH/100g em estufa e 4,00 e 2,48 mL NaOH/100g por secagem solar. Demiate et al.<sup>5</sup> estudando diferentes amostras de amidos fermentados comerciais (polvilho azedo), encontraram valores de pH variando de 2,92 a 4,03 e altos valores de acidez (3,10 a 8,63 mL NaOH/100g). As diferenças nos valores de pH e acidez verificados para amostras de amido de mandioca fermentado se devem às variações nas condições de fermentação (matéria prima, tempo, temperatura e outros fatores).

Como esperado, a modificação ácida promoveu uma redução do pH e um aumento da acidez. A amostra T1 (ácido láctico 1 %) foi a que apresentou o valor mais baixo de pH (3,32) e o mais elevado de acidez (6,77 mL NaOH/100g), seguida da amostra T5 (ácido láctico 0,5 % e ácido acético 0,5 %) com valor de pH 3,47 e acidez

de 5,78 mL de NaOH/100g. Quanto ao pH, as amostras T4 (ácido butírico 1 %) e T10 (ácido propiônico 0,5 % e ácido butírico 0,5 %) não diferiram estatisticamente entre si  $p \geq 0,05$  como também da amostra de amido de mandioca fermentado seco ao sol.

Para os amidos modificados por ácidos orgânicos, é possível observar (**Tabela 2**) que a viscosidade máxima das amostras diminuiu consideravelmente quando comparada ao amido nativo. Das quatro amostras ácido-modificadas, as duas que obtiveram maiores valores de expansão dentre as modificações químicas (T1 e T5) apresentaram os menores valores de viscosidade máxima, 199,25 RVU para a amostra modificada com ácido láctico 1 % (T1) e 178,20 RVU para a amostra modificada com ácido láctico 0,5 % e ácido acético 0,5 % (T5), o que está de acordo com Martinez-Bustos et al.<sup>27</sup> que investigando a hidrólise do amido de mandioca utilizando ácidos orgânicos obtiveram pastas com um decréscimo na viscosidade máxima quando comparadas com as pastas de amido nativo. Bertolini et al.<sup>25</sup>, realizando um tratamento com ácido láctico, também obtiveram valores reduzidos para o parâmetro de viscosidade máxima, sugerindo que isso possivelmente ocorre porque o amido sofreu alterações na sua reologia pela ação do ácido.

As amostras T4 e T10 apresentaram maiores valores de viscosidade máxima, de 247,17 e 230,92 RVU, respectivamente, sendo que foram essas amostras que apresentaram menores valores de volume específico.

De acordo com diversos estudos<sup>24-26</sup>, o perfil de viscosidade do amido fermentado difere do amido nativo, sendo que a fermentação ocasionou um pico de viscosidade menor e também uma menor tendência à retrogradação (*setback*). Mestres e Rouau<sup>23</sup> e Demiate et al.<sup>9</sup> sugeriram que as modificações oxidativas como a despolimerização e a foto-oxidação favorecem um pico menor para o amido fermentado e seco ao sol. A viscosidade máxima diminuiu de 264,67 RVU na amostra de amido nativo para 203,80 e 235,33 RVU para o amido fermentado seco em estufa e seco ao sol, respectivamente, indicando que os grânulos da amostra AN não

**Tabela 2.** Propriedades viscoamilográficas e características físico-químicas das amostras de amido nativo, amidos fermentados secos ao sol e em estufa e amidos modificados por ácidos<sup>1,2</sup>

Amostras	Propriedades viscoamilográficas					Características físico-químicas			
	Viscosidade máxima (RVU)	Breakdown (RVU)	Viscosidade final (RVU)	Setback (RVU)	Temperatura de pasta (°C)	Umidade (g/100g)	pH	Acidez titulável (mL NaOH/100g)	
AN	264,67 ± 0,20 <sup>a</sup>	163,75 ± 0,20 <sup>a</sup>	184,13 ± 0,37 <sup>a</sup>	82,78 ± 0,03 <sup>a</sup>	71,38 ± 0,02 <sup>b</sup>	11,32 ± 0,02 <sup>c</sup>	6,47 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,42 ± 0,05 <sup>f</sup>	
E	203,80 ± 0,10 <sup>e</sup>	126,71 ± 0,03 <sup>f</sup>	117,42 ± 0,07 <sup>e</sup>	39,88 ± 0,58 <sup>d</sup>	72,23 ± 0,06 <sup>a</sup>	10,74 ± 0,19 <sup>d</sup>	3,94 ± 0,01 <sup>c</sup>	3,70 ± 0,05 <sup>d</sup>	
SS	235,33 ± 0,75 <sup>e</sup>	140,71 ± 0,10 <sup>c</sup>	133,33 ± 0,18 <sup>d</sup>	39,63 ± 0,04 <sup>d</sup>	72,32 ± 0,05 <sup>a</sup>	10,26 ± 0,05 <sup>e</sup>	4,00 ± 0,00 <sup>b</sup>	2,48 ± 0,09 <sup>e</sup>	
T1	199,25 ± 0,20 <sup>f</sup>	138,46 ± 0,10 <sup>d</sup>	88,38 ± 0,31 <sup>f</sup>	27,88 ± 0,19 <sup>e</sup>	72,33 ± 0,06 <sup>a</sup>	12,65 ± 0,04 <sup>a</sup>	3,32 ± 0,01 <sup>e</sup>	6,77 ± 0,12 <sup>a</sup>	
T4	247,17 ± 0,68 <sup>b</sup>	145,67 ± 0,20 <sup>b</sup>	157,58 ± 0,20 <sup>b</sup>	56,05 ± 0,71 <sup>e</sup>	71,40 ± 0,04 <sup>b</sup>	12,01 ± 0,03 <sup>b</sup>	4,00 ± 0,00 <sup>b</sup>	4,19 ± 0,10 <sup>c</sup>	
T5	178,20 ± 0,04 <sup>g</sup>	122,71 ± 0,03 <sup>g</sup>	82,86 ± 0,28 <sup>g</sup>	27,27 ± 0,28 <sup>e</sup>	72,25 ± 0,00 <sup>a</sup>	10,41 ± 0,13 <sup>de</sup>	3,47 ± 0,00 <sup>d</sup>	5,78 ± 0,13 <sup>b</sup>	
T10	230,92 ± 0,82 <sup>d</sup>	135,17 ± 1,09 <sup>e</sup>	143,25 ± 0,47 <sup>c</sup>	48,75 ± 0,82 <sup>b</sup>	71,35 ± 0,04 <sup>b</sup>	9,49 ± 0,25 <sup>f</sup>	4,02 ± 0,00 <sup>b</sup>	4,35 ± 0,09 <sup>c</sup>	

<sup>1</sup>Média ± Desvio Padrão; <sup>2</sup>Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem entre si, a 5 % de significância pelo teste Tukey.

AN: amido nativo; E: amido fermentado seco em estufa; SS: amido fermentado seco ao sol; T1: amido modificado com 1% de ácido láctico + UVC; T4: amido modificado com 1% de ácido butírico + UVC; T5: amido modificado com 0,5% de ácido láctico e 0,5% de ácido acético + UVC; T10: amido modificado com 0,5% de ácido acético + UVC, T10: amido modificado com 0,5% de ácido butírico e 0,5% de ácido propiônico + UVC

sofreram degradação como das amostras de amido fermentado, E e SS. As avaliações do comportamento reológico dos amidos estudados, comprovam que a propriedade de expansão é inversamente proporcional à viscosidade, tendo os amidos com maior expansão apresentado as menores viscosidades e menores tendência à retrogradação, o que é importante parâmetro no emprego do amido fermentado em panificação, em formulações sem glúten com amido com baixa tendência a retrogradação, onde têm sido empregados tanto o polvilho azedo quanto os amidos modificados por ácido em substituição a estes.

### Propriedades de expansão

Como se observa na **Tabela 3**, os biscoitos produzidos a partir do amido de mandioca fermentado e seco ao sol (SS) foram os que apresentaram maior volume específico (6,89 mL/g,  $p < 0,05$ ) seguido dos tratamentos T5 (5,75 mL/g) e T1 (5,38 mL/g). Considerando a classificação da expansão do polvilho azedo proposta por Nunes e Cereda<sup>3</sup>, baseada no volume específico dos biscoitos, os amidos SS, T1 e T5 foram classificados como de expansão média (de 5,0 a 10,0 mL/g) e os demais (AN, E, T4 e T10) como pequena ( $< 5,0$  mL/g). O valor para o amido fermentado seco ao sol (6,89 mL/g) foi superior ao encontrado por Pereira et al<sup>20</sup> avaliando amidos de diferentes origens submetidos à fermentação e secagem ao sol, sendo que para o amido de mandioca o valor foi de 4,75 mL/g, próximo ao encontrado por Machado et al<sup>21</sup> que foi de 4,76 mL/g. Os biscoitos elaborados com o amido de mandioca nativo mostraram uma baixa capacidade de expansão, com volume específico de 1,37 mL/g, valor esse inferior ao observado por Aquino et al<sup>8</sup> para uma amostra de amido de mandioca comercial (2,53 mL/g). Capacidades de expansão com a seguinte ordem: amostras não fermentadas (AN)  $<$  fermentada seca em estufa  $<$  fermentada seco ao sol observadas neste trabalho também foram verificadas por outros autores<sup>7,22</sup>, confirmando que a propriedade de expansão tem relação com a fermentação e o tipo de secagem, sendo que a secagem solar se mostra fundamental para o desenvolvimento

dessa característica como já citado em outros estudos, visto que segundo esses autores a exposição do amido à radiação ultravioleta leva a uma despolimerização das moléculas de amilose e amilopectina, afetando positivamente a propriedade de expansão<sup>6,7,23</sup>.

**Tabela 3.** Propriedades de expansão dos biscoitos elaborados com amido nativo, amidos fermentados secos ao sol e amidos modificados por ácidos<sup>1,2</sup>

Amostras	Volume específico (mL/g)	Perda de peso (%)
AN	1,37 ± 0,02 <sup>d</sup>	27,54 ± 0,35 <sup>d</sup>
E	2,77 ± 0,01 <sup>c</sup>	35,91 ± 0,27 <sup>ab</sup>
SS	6,89 ± 0,24 <sup>a</sup>	37,18 ± 0,17 <sup>a</sup>
T1	5,38 ± 0,08 <sup>b</sup>	36,30 ± 0,35 <sup>ab</sup>
T4	2,64 ± 0,08 <sup>c</sup>	30,54 ± 0,32 <sup>c</sup>
T5	5,75 ± 0,11 <sup>b</sup>	35,33 ± 0,22 <sup>b</sup>
T10	3,07 ± 0,02 <sup>c</sup>	30,96 ± 0,63 <sup>c</sup>

<sup>1</sup>Média ± Desvio Padrão; <sup>2</sup>Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem entre si, a 5% de significância pelo teste Tukey.

AN: amido nativo; E: amido fermentado seco em estufa, SS: amido fermentado seco ao sol; T1: amido modificado com 1 % de ácido láctico + UVC; T4: amido modificado com 1 % de ácido butírico + UVC; T5: amido modificado com 0,5 % de ácido láctico e 0,5 % de ácido acético + UVC; T10: amido modificado com 0,5 % de ácido butírico e 0,5 % de ácido propiônico + UVC

Os valores de volume específico dos amidos modificados por ácido com maior expansão, T1 e T5, ficaram próximos aos do valor da amostra SS, confirmando a importância da presença dos ácidos láctico e acético e a necessidade da radiação UVC, mas mesmo com valores de volume específico de 5,38 e 5,75 mL/g, respectivamente, diferenciaram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) da amostra SS, confirmando que o processo de modificação química por ácido não foi tão eficiente quanto à ação conjunta da fermentação natural e da posterior secagem solar.

A perda de peso dos biscoitos durante o forneamento apresenta uma relação positiva com o volume específico, o que também foi observado por Vatanasuchart et al<sup>24</sup> estudando

amidos modificados com ácido láctico seguido de radiação artificial. É possível observar que a amostra de amido fermentado seco ao sol (SS), a qual apresentou maior volume específico, teve a maior perda de peso (37,18 %) e a amostra de amido nativo (AN), com menor volume específico, apresentou a menor perda de peso (27,54 %). Marcon et al<sup>15</sup> realizando um estudo comparativo entre amidos fermentados em laboratório, encontraram valores de perda de peso para o amido nativo de 30,83 %, amido de mandioca fermentado em laboratório de baixa performance 32,78 %, amido de mandioca fermentado em laboratório de alta performance 40,73 % e afirmam ser possível estabelecer uma relação entre a perda de peso e a propriedade de expansão.

#### Determinação e quantificação de ácidos orgânicos

A concentração de ácido láctico foi superior para as amostras de amido fermentado seco ao sol (2336,23 mg/kg) e seco em estufa (1246,10 mg/kg), sendo esses ainda superiores ( $p < 0,05$ ) ao verificado para a amostra fermentada sem secagem (870,59 mg/kg) ( $p < 0,05$ ) (Tabela 4).

Quanto ao ácido láctico, a amostra de amido fermentado com secagem em estufa apresentou um aumento de 43,13 % em relação à amostra de amido fermentado sem secagem, enquanto que para a amostra seca ao sol esse aumento foi estatisticamente superior (268,35 %,  $p < 0,05$ ).

Para os demais ácidos analisados, todos eles apresentaram uma redução do seu valor inicial (amido fermentado sem secagem) em comparação aos amidos secos em estufa e ao sol, sendo os ácidos acético (64,45 % em estufa e 78,07 % ao sol) e propiônico (63,04 % em estufa e 78,64 % ao sol) aqueles com as maiores reduções. O ácido butírico representou 62,16 % dos ácidos analisados na amostra de amido fermentado sem secagem, mostrando a prevalência da fermentação butírica.

A amostra T1 apresentou uma concentração de 10176,70 mg/kg de ácido láctico, esse alto valor é decorrente da modificação com 1 % desse ácido, enquanto que a T5 apresentou 5636,85 mg/kg de ácido láctico, praticamente 50 % do valor observado para a amostra T1, e 2669,51 mg/kg de ácido acético, sendo coerente já que essa amostra foi modificada com 0,5 % de ácido láctico e 0,5 % de ácido acético.

**Tabela 4.** Quantificação dos ácidos orgânicos nas amostras de amido nativo, amidos fermentados secos ao sol e amidos modificados por ácidos

Amostras	mg.kg <sup>-1</sup>			
	Ácido láctico	Ácido acético	Ácido propiônico	Ácido butírico
AN	870,59 ± 19,69 <sup>c</sup>	1779,99 ± 17,99 <sup>b</sup>	545,33 ± 15,14 <sup>a</sup>	5249,22 ± 23,12 <sup>a</sup>
E	1246,10 ± 5,64 <sup>d</sup>	632,78 ± 0,75 <sup>c</sup>	201,54 ± 2,09 <sup>b</sup>	3031,38 ± 29,32 <sup>c</sup>
SS	2336,23 ± 0,51 <sup>c</sup>	390,41 ± 2,62 <sup>d</sup>	116,44 ± 2,62 <sup>c</sup>	2582,01 ± 53,55 <sup>d</sup>
T1	10176,70 ± 83,02 <sup>a</sup>	< LOD	< LOD	< LOD
T4	< LOD	< LOD	< LOD	2627,19 ± 67,00 <sup>d</sup>
T5	5636,85 ± 69,75 <sup>b</sup>	2669,51 ± 44,42 <sup>a</sup>	< LOD	< LOD
T10	< LOD	< LOD	< LOQ	4217,29 ± 29,79 <sup>b</sup>

\*Média ± Desvio Padrão (base seca)

\*\*Letras comparam médias na mesma coluna. Letras diferentes diferem significativamente pelo Teste de Tukey a 5 % de probabilidade

\*\*\*LOD: limite de detecção, LOQ: limite de quantificação

AN: amido nativo; E: amido fermentado seco em estufa; SS: amido fermentado seco ao sol; T1: amido modificado com 1 % de ácido láctico + UVC; T4: amido modificado com 1 % de ácido butírico + UVC; T5: amido modificado com 0,5 % de ácido láctico e 0,5 % de ácido acético + UVC; T10: amido modificado com 0,5 % de ácido butírico e 0,5 % de ácido propiônico + UVC



As amostras T4 e T10 foram aquelas que apresentaram os menores volumes específicos, sendo que em ambas, apenas o ácido butírico estava presente, pois mesmo na T10 modificada com 0,5 % de propiônico, esse ácido não foi recuperado após a radiação UV e secagem em estufa. Estes resultados podem indicar que tanto o ácido butírico quanto o propiônico não apresentam efeito importante sobre a propriedade de expansão do polvilho azedo.

As amostras SS, T1 e T5 foram as que apresentaram as melhores expansões. Esses resultados reforçam a afirmação de estudos que sugerem que o ácido láctico (natural da fermentação ou adicionado) em conjunto com a radiação UV (artificial ou solar) contribuem para uma modificação oxidativa das moléculas de amilose e amilopectina, como a despolimerização, promovendo a propriedade de expansão<sup>4,5,24</sup>. No entanto, a quantidade de ácido láctico não foi diretamente proporcional ao poder de expansão das amostras analisadas, visto que a amostra T1 apresentou uma concentração de ácido láctico 4,35 vezes maior do que a SS, mas essa última foi a de melhor expansão.

Demiante et al<sup>5</sup> analisaram, por CLAE, 29 amostras de amido de mandioca fermentado das regiões Sul e Sudeste adquiridos diretamente das fábricas ou do comércio, e verificaram concentrações, em base seca, entre 120 e 830 mg/kg de ácido láctico, 0 e 680 mg/kg de ácido acético, 0 e 130 mg/kg de ácido propiônico, 0 e 570 mg/kg de ácido butírico.

A radiação UVC foi citada como a responsável pela absorção de energia em compostos de dupla ligação, como é o caso do ácido láctico e a luz absorvida pela molécula é responsável pelas alterações químicas produzidas<sup>11</sup>. Verificou-se que o efeito da radiação UV solar (amostra SS) contribuiu mais para a propriedade de expansão do que a concentração de ácido láctico, pois mesmo as amostras T1 e T5, possuindo as maiores concentrações deste ácido não foram as que apresentaram as maiores expansões.

## CONCLUSÃO

A fermentação gerou um produto tipicamente ácido, diferindo entre as secagens, se destacando a secagem solar (SS), com boa capacidade de expansão. As modificações por ácidos demonstraram que dentre os principais ácidos formados na fermentação, os que tiveram maior influência sobre a expansão foram os ácidos láctico e acético. A secagem solar favoreceu um produto mais ácido e de maior expansão. A radiação, seja solar ou UVC artificial, é indispensável na produção do polvilho azedo. O conhecimento da tecnologia e das propriedades do polvilho azedo fermentado tradicional pode contribuir para a manutenção deste produto no mercado, disponível aos consumidores, em especial aos celíacos. A propriedade de expansão dos amidos modificados por ácido (T1 e T5) e submetidos à radiação UVC artificial, indica que amidos com propriedade de expansão e não fermentados podem ser empregados em formulações em substituição ao tradicional polvilho azedo, desde que adequados às preferências sensoriais dos consumidores.

---

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil, pela concessão das bolsas e pelo apoio financeiro.

---

## REFERÊNCIAS

1. Maeda KC, Cereda MP. Avaliação de duas metodologias de expansão ao forno do polvilho azedo. *Ciênc Tecnol Alim*. 2001;21(2):139-43. [DOI: 10.1590/S0101-20612001000200003].
2. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC 259, 20 de setembro de 2002. Anexo: Regulamento Técnico para Alimentos Embalados.

3. Nunes OLGS, Cereda MP. Metodologia para avaliação da qualidade de fécula fermentada de mandioca (polvilho azedo). *In: Congresso Brasileiro de Mandioca*; 1994; Salvador, BA: Resumos, Fortaleza, SBM.
4. Plata-Oviedo M, Camargo CRO. Effect of acid treatments and drying processes on physico-chemical and functional properties of cassava starch. *J Sci Food Agr*. 1998;77(1):103-8. [DOI: 10.1002/(SICI)1097-0010(199805)77:13.0.CO;2-2].
5. Demiate IM, Barana AC, Cereda MP, Wosiacki G. Organic acid profile of commercial sour cassava starch. *Ciênc Tecnol Alim*. 1999;19(1):131-5. [DOI: 10.1590/S0101-20611999000100024].
6. Vatanasuchart N, Naivikul O, Charoenrein S, Sriroth K. Molecular properties of cassava starch modified by different UV irradiations to enhance baking expansion. *Carbohyd Polym*. 2005;61(1):80-7. [DOI: 10.1016/j.carbpol.2005.02.012].
7. Marcon MJA, Kurtza DJ, Raguzzoni JC, Delgadillo I, Maraschin M, Soldi V, Reginatto V, Amante ER. Expansion properties of sour cassava starch (polvilho azedo): variables related to its practical application in bakery. *Starch/Stärke*. 2009;61(12):716-26. [DOI: 10.1002/star.200900132].
8. Aquino ACMS, Pereira JM, Watanabe LB, Amante ER. Standardisation of the sour cassava starch reduces the processing time by fermentation water monitoring. *Int J Food Sci Tech*. 2013;48(9):1892-8. [DOI: 10.1111/ijfs.12167].
9. Starling CA. Otimização dos parâmetros de produção do amido de mandioca fermentado. [dissertação de mestrado]. Goiânia (GO): Universidade Federal de Goiás; 2010.
10. Demiate IM, Wosiacki G, Cereda MP, Mestres C. Viscographic characteristics of oxidized cassava starches assessed by RVA. *Publ UEPG Ci Exatas Terra, Ci Agr Eng*. 2005;11(1):7-17. [DOI: 10.5212/publicatio.v11i01.840].
11. Nunes OLGS. Avaliação de parâmetros relacionados à expansão de fécula de mandioca ácido-modificada e irradiada com ultravioleta. [tese de doutorado]. Araraquara (SP): Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 1999.
12. Garcia ACDB, Leonel M. Efeito da concentração de ácido láctico sobre a propriedade de expansão em amidos modificados fotoquimicamente. *Ciênc Agrotec*. 2005;29(3):629-34. [DOI: 10.1590/S1413-70542005000300018].
13. Association of Official Analytical Chemists - AOAC. *Official Methods of Analysis of the AOAC International*. 18th ed. Gaithersburg; 2005.
14. Pizzinato A, Campagnolli DMF. Avaliação tecnológica de produtos derivados de farinhas de trigo (pão, macarrão, biscoito). Campinas: ITAL; 1993.
15. Marcon MJA, Kurtz DJ, Maraschin M, Reginatto V, Amante ER. Rapid analysis for predicting the expansion of the polvilho azedo. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2011;70(2):199-205.
16. Aquino ACMS, Azevedo MS, Ribeiro DHB, Costa ACO, Amante ER. Validation of HPLC and CE methods for determination of organic acids in sour cassava starch wastewater. *Food Chem*. 2015;172(1):725-30. [DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.09.142].
17. Zotou A, Loukou Z, Karava O. Method development for the determination of seven organic acids in wines by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Chromatographia*. 2004;60(1/2):39-44. [DOI: 10.1365/s10337-004-0330-9].
18. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 263, de 22 de setembro 2005. Aprova o regulamento técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 23 set. 2005. Seção 1, p. 368-369.

19. Aplevicz KS, Demiate IM. Characterization of native and modified cassava starches and their use in baked products. *Ciênc Tecnol Alim*. 2007;27(3):478-84. [DOI: 10.1590/S0101-20612007000300009].
20. Pereira J, Ciacco CF, Vilela ER, Teixeira LS. Féculas fermentadas na fabricação de biscoitos: estudo de fontes alternativas. *Ciênc Tecnol Alim*. 1999;19(2):287-93. [DOI: 10.1590/S0101-20611999000200024].
21. Machado ACS DV, Diniz IP, Teixeira MAV, Birchall VS. Estudo do efeito da secagem por radiação ultravioleta nas propriedades tecnológicas da fécula de mandioca fermentada. *E-XACTA*. 2012;5(1):7-14.
22. Alvarado PM, Grosmaire L, Dufour D, Toro AG, Sánchez T, Calle F, Santander MAM, Ceballos H, Delarbre JL, Tran T. Combined effect of fermentation, sun-drying and genotypes on breadmaking ability of sour cassava starch. *Carbohydr Polym*. 2013;98(1):1137-46. [DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.07.012].
23. Mestres C, Rouau X. Influence of natural fermentation and drying conditions on the physicochemical characteristics of cassava starch. *J Sci Food Agr*. 1997;74(2):147-55. [DOI: 10.1002/(SICI)1097-0010(199706)74:2<147::AID-JSFA781>3.0.CO;2-J].
24. Vatanasuchart N, Naivikul O, Charoenrein S, Sriroth K. Effects of different UV irradiations on properties of cassava starch and biscuit expansion. *Kasetsart J (Nat Sci)*. 2003;37(3):334-44.
25. Bertolini AC, Mestres C, Raffi J, Buléon A, Lerner D, Colonna P. Photodegradation of cassava and corn starch. *J Agr Food Chem*. 2001;49(2):675-82. [DOI: 10.1021/jf0010174].
26. Silva GO, Takizawa FF, Pedroso RA, Franco CML, Leonel M, Sarmento SBS, et al. Características físico-químicas de amidos modificados de grau alimentício comercializados no Brasil. *Ciênc Tecnol Alim*. 2006;26(1):188-97. [DOI: 10.1590/S0101-20612006000100030].
27. Martinez-Bustos F, Amaya-Llano SL, Carbajal-Arteaga JA, Chang YK, Zazueta-Morales JJ. Physicochemical properties of cassava, potato and jicama starches oxidised with organic acids. *J Sci Food Agr*. 2007;87(7):1207-14. [DOI: 10.1002/jsfa.2805].



# Chemical monitoring of canola, corn, olive, soybean and sunflower oils after thermal treatment at conventional temperatures in domestic stoves

## Monitoramento químico dos óleos de canola, milho, oliva, soja e girassol após tratamento térmico em temperaturas alcançadas por fogões domésticos

RIALA6/1694

Brenda Lee Simas PORTO<sup>1\*</sup>, Thiago de Oliveira MENDES<sup>2</sup>, Douglas Faza FRANCO<sup>1</sup>, William da Silva MARTINI<sup>1</sup>, Maria José Valenzuela BELL<sup>2</sup>, Marcone Augusto Leal de OLIVEIRA<sup>1</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Cidade Universitária, Juiz de Fora, MG, Brasil, CEP: 36036-330. Tel: 32 2102 3310. E-mail: blsporto@gmail.com

<sup>2</sup>Departamento de Física, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Cidade Universitária, Juiz de Fora, MG, Brasil

Recebido: 14.07.2015 - Aceito para publicação: 07.01.2016

### ABSTRACT

The frying by immersion is a widely used cooking process and it improves the food texture and flavor. This study analyzed the initial thermal oxidation in five edible vegetable oils used for frying. Oils samples were heated twice for 30 minutes, at 180 °C and then at 240 °C simulating the domestic stoves temperatures. The oils decomposition temperatures were determined by TG, being all of them > 250 °C. The FA profile was analyzed by GC-FID and a slight decrease of UFA was found in corn and soybean oils. In canola, olive and sunflower oils, UFA was stable after heating treatment. Minor FA decomposition was found in canola oil, and followed by corn, olive, sunflower and soybean oils. NIR spectroscopy analyzes resulted in an extensive bands overlapping. The spectra were modeled by PCA and the oils were classified into two groups: fresh oil and heated oil, mainly by differing in 1900 nm region, associated with the carboxyl signal decrease, which might be related to the initial FA degradation in samples. It could partially understand what occurs to the vegetable oil in the beginning of its thermo-decomposition. These information are useful to consumers, food industry and health surveillance agency.

**Keywords.** vegetable oils, fatty acids, TG/DTA, GC-FID, NIR.

### RESUMO

A fritura por imersão é um processo de cocção utilizado pela inclusão de textura e sabor aos alimentos. Foi analisada a oxidação térmica inicial de cinco óleos vegetais comestíveis utilizados para fritura de imersão. Amostras de óleos foram aquecidas duas vezes por 30 minutos, a 180 °C e depois a 240 °C, simulando-se as temperaturas de fogões domésticos. As temperaturas de decomposição dos óleos foram determinadas por TG, sendo > 250 °C. O perfil de FA foi analisado por GC-FID, detectando-se pequeno decréscimo dos UFA nos óleos de milho e soja. Nos óleos de canola, oliva e girassol, os UFA foram estáveis após o tratamento térmico. A menor decomposição dos FA foi detectado no óleo de canola, seguido de milho, oliva, soja e girassol. Análises por espectroscopia NIR resultaram em grande sobreposição das bandas. Os espectros foram modelados por PCA, classificando-se os óleos em dois grupos: óleo fresco e óleo aquecido, principalmente pelas diferenças na região de 1900 nm, relacionadas ao decréscimo do sinal de carboxilas, e associadas à degradação inicial dos FA nas amostras. Ainda que parcialmente, pode-se entender o que ocorre com os óleos vegetais no início de termo-decomposição, abrangências que são úteis para consumidores, indústria alimentícia e órgão de vigilância sanitária.

**Palavras-chave.** óleos vegetais, ácidos graxos, TG/DTA, GC-FID, NIR.

## INTRODUCTION

The use of frying provides convenience and speed in food preparation, as well as texture and pleasant flavor to the taste. However, the frying process can cause physical and chemical changes in the oil, which involve loss of nutritional value. The thermo-oxidative degradation leads to the formation of dimers and polymers originating from triacylglycerols of unsaturated acyl groups, sometimes more polar than the original triacylglycerol molecule<sup>1,2</sup>.

The analyzes reported in the literature to evaluate the thermal stability of vegetable oils are diverse, using different techniques: differential scanning calorimetry (DSC)<sup>3-11</sup>, high performance liquid chromatography (HPLC)<sup>12,13</sup>, capillary electrophoresis (CE)<sup>14</sup>, infrared<sup>15,16</sup>, UV-Vis<sup>17,18</sup> and Raman spectroscopy<sup>19</sup>, <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance<sup>20,21</sup>, rancimat<sup>22</sup>, electron spin resonance spectroscopy<sup>23</sup>, AOCS official methods<sup>24</sup> and gas chromatography<sup>25,26</sup>. In these work the extra virgin olive oil (EVOO) is the most analyzed and are mostly evaluated their antioxidant capacity<sup>2,9-15</sup>.

There are some papers about thermal oxidation in vegetable oils when these oils are exposed to heating to critical levels of use, but usually the domestic oil is not reused so often. Martínez-Yusta and Guillén<sup>2</sup> heated EVOO to 190 °C, 8h/day, for 4 days. Gómez-Alonso et al<sup>13</sup> heated virgin olive oil and refined olive oil twelve times at 180 °C for 6 days. Tena et al<sup>15</sup> heated virgin olive oil to 190 °C for 94 hours. Zribi et al<sup>16</sup> heated four refined vegetable oils for ten consecutive times at 160 and 190 °C. Andrikopoulos et al<sup>17</sup> used virgin olive oil and vegetable shortening during domestic deep-frying and pan-frying for ten consecutive times. Takeoka et al<sup>24</sup> heated seven commonly used frying oils and fats at 190 and 204 °C for 8 h/day until they reached a critical level of polar constituents.

More refined studies out of evaluation the effect of heating in vegetable oils simulating domestic use and with few uses of oils were not found. Also no studies were found that evaluated canola, corn, olive, soybean and sunflower oils submitted to usual thermal treatments using thermogravimetric analysis, gas chromatography

and near infrared spectroscopy (NIR) concomitantly. Thus, a comparative study about the thermal oxidation for these household oils, mainly after little use, can be interesting.

In this context, a comparative study about the thermal oxidation for the household oils main after little use can be interesting. This study evaluated five vegetable oils commonly used in the human food: canola, corn, olive, soybean and sunflower oil. These oils were evaluated in three stages of heat. The experimental conditions were selected in order to simulate heating oils in the minimum and maximum temperatures recorded in domestic stoves. A thermogravimetric analysis was performed to determine the decomposition temperature for each oil sample. Besides, a comparative evaluation of the fatty acid profile in different heating stages of vegetable oils by gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID) was performed. Finally, an exploratory study by NIR allied to multivariate analysis of data by Principal Component Analysis (PCA) was able to discriminate between different types of oils and different thermal treatments. The real understanding of the evolution of these effects during frying is still a challenge to researchers, consumers, food industry and health surveillance agencies.

## MATERIAL AND METHODS

### Reagents and solutions

All reagents used were of analytical grade. Water was purified by a deionization (Milli-Q system: Millipore®, Bedford, MA). Methanol, hexane, acetic acid, anhydrous sodium sulfate (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), and sodium hydroxide (NaOH) were purchased from Vetec® (Rio de Janeiro, RJ, Brazil) and sodium methoxide solution were purchased from Fluka® (St. Louis, MO, USA).

Standards of fatty acid methyl ester (FAME) to GC analysis methyl palmitate (C16:0ME), methyl elaidate (C18:1ME), methyl oleate (C18:1ME), methyl linoleate (C18:2ME), methyl linolenate (C18:3ME), and Supelco 37 Component FAME Mix were purchased from Sigma Aldrich® (St. Louis, MO, USA). Individual FAME stock solutions were prepared at the 5.0 mmol L<sup>-1</sup> by

dissolving in hexane. All solutions were stored in a freezer at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### Samples

The five main vegetable oils used in the Brazilian meal were chosen for analysis: namely extra virgin olive oil, canola oil, sunflower, corn and soybean. The samples were purchased at the local market and, in order to avoid the influence of a single batch, five packages were bought of each type of oil, prioritizing to different brands. A mixture was prepared of each oil using 100.0 mL of each of the brands obtained, totaling five different mixes. These stock solutions, 500.0 mL of each oil, were used in thermal, spectroscopic and chromatographic studies.

### Thermal treatment

From 500.0 mL of samples stock solution, 10.0 mL of the samples were transferred into the glass beakers (with capacity for 80.0 mL) and placed on a heating plate inside the fume hood. Before heating (here denoted by time  $T_1$  samples) 600.0  $\mu\text{L}$  of aliquots of each oil sample were collected and transferred to glass vials. These vials were capped and stored on the fridge at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until the time of analysis. The samples were then heated to  $180\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 30 minutes (here denoted by  $T_2$  samples), and again 600.0  $\mu\text{L}$  samples were collected onto glass vials. Then, the temperature was raised to  $240\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 30 minutes (here denoted by  $T_3$  samples), and finally 600.0  $\mu\text{L}$  of samples were collected onto glass vials. In both heating  $T_2$  and  $T_3$  the temperature was measured directly in oils with analog thermometer. The heaters were performed without agitation of the samples.

These temperatures were chosen because they are used in food cooking processes in domestic stoves. The first aliquot was taken at  $T_1$ , at room temperature and evaluated fresh oil. The second aliquot,  $T_2$ , tests a bland heating, simulating the minimum temperatures reached by domestic stoves, and the third aliquot,  $T_3$ , tests a hard heating, simulating the maximum temperatures.

### Thermogravimetric analysis

In order to check the temperatures of decomposition of each vegetable oil only  $T_1$

samples were analyzed in duplicate. Approximately 5 mg of each sample were weighed directly into aluminum crucibles previously allocated on the sample thermocouple and analyzes were performed without any sample preparation.

The TG / DTA curves of vegetable oils were obtained in a Thermogravimetric and Differential Thermal Analysis equipment, model DTG - 60 Shimadzu (Kyoto, Japan). The analyzes were performed using a heating rate of  $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  between 25 and  $550\text{ }^{\circ}\text{C}$  under an atmosphere of synthetic air with a flow rate of 50 mL/min.

### Analysis by GC-FID

For GC analysis the oil samples were directly esterificated by basic catalysis with sodium metoxide<sup>27,28</sup>. For each sample at times  $T_1$ ,  $T_2$  and  $T_3$  were performed experimental trial under duplicate, totaling thirty analyses. Approximately 12 mg of each sample were weighed and transferred into glass tubes and submitted to esterification reaction using 2.0 mL of methanol solution containing sodium methoxide. Then, the flask was heated in a water bath at  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  with reflux during 10 minutes. The bath was turned off and the solution was cooled. After, 100  $\mu\text{L}$  of glacial acetic acid was added to neutralize the extract, followed by 5.0 mL of deionized water and 3.0 mL of hexane. After agitation in vortex by 1.0 min and phase separation in an ice bath, the organic phase (upper part) was transferred to 10.0 mL Pyrex tube and an additional 3.0 mL of hexane was added to the first mixture. After agitation and phase separation, the organic phase was placed in the same 10.0 mL Pyrex tube and 1.0 g of anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  was added to dry the FAME solution. The solution was transferred to volumetric flask of 5.0 mL and volume completed with hexane, the solution was stored in a capped vial at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Before injection into the GC equipment, the solution was transferred to a vial and analyzed without dilution.

FAME analysis was performed on Shimadzu gas chromatograph equipment (GC 2010-Plus, Shimadzu, Kyoto, Japan), with split-splitless injector type, AOC-20-i autoinjector and flame ionization detection. A fused silica capillary column was used (CP-SIL 88 for FAME; 100 m x 0.25 mm x 0.2  $\mu\text{m}$ ,

Agilent Technologies, Palo Alto, USA). The chromatographic conditions were: injection volume of 1.0  $\mu\text{L}$  and mode split with flow rate of 20  $\text{mL min}^{-1}$  at 250  $^{\circ}\text{C}$ ; the FID detector temperature was fixed at 270  $^{\circ}\text{C}$ ; the oven programmed temperatures were initially 80  $^{\circ}\text{C}$ , then an increase of 4  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  up to 220  $^{\circ}\text{C}$  and was held for 5 min; after that, the temperature increased by 4  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  up to 240  $^{\circ}\text{C}$  and was held for 10 min. The carrier gas was hydrogen with a flow rate of 1.0  $\text{mL min}^{-1}$  and the pressure was 140.3 kPa. The compounds were identified by standard co-injection and retention time relative to the Supelco 37 Component FAME Mix. FA were determined by area normalization and expressed in g per 100g of FA<sup>29</sup>.

### Analysis by NIR spectroscopy

Aliquots taken at times  $T_1$ ,  $T_2$  and  $T_3$  were transferred to glass vials with i.d. 8.0 mm and placed directly into the equipment compartment for the acquisition of the spectra, without sample preparation. The analyzes by NIR were performed with the Fourier-Transform spectrometer (FT) equipment model FT-NIR MPA from Bruker equipped with a Te-InGaAs detector and quartz optics. The spectra were collected in the transmittance mode, in the region between 1200 to 4000  $\text{cm}^{-1}$  with a resolution of 4  $\text{cm}^{-1}$  with 32 scans accumulated by sample.

### Software

In this work the spectra were acquired with the OPUS 6.5 software from Bruker Optik GmbH (Ettlingen, Germany), chromatograms were obtained with the GC Solution software from Shimadzu (Kyoto, Japan), TG and DTA curves were obtained from the software TA-60 WS Shimadzu (Kyoto, Japan) and the multivariate statistical analysis was performed with SIMCA P+ 12.0.1 software from Umetrics (Umeå, Sweden).

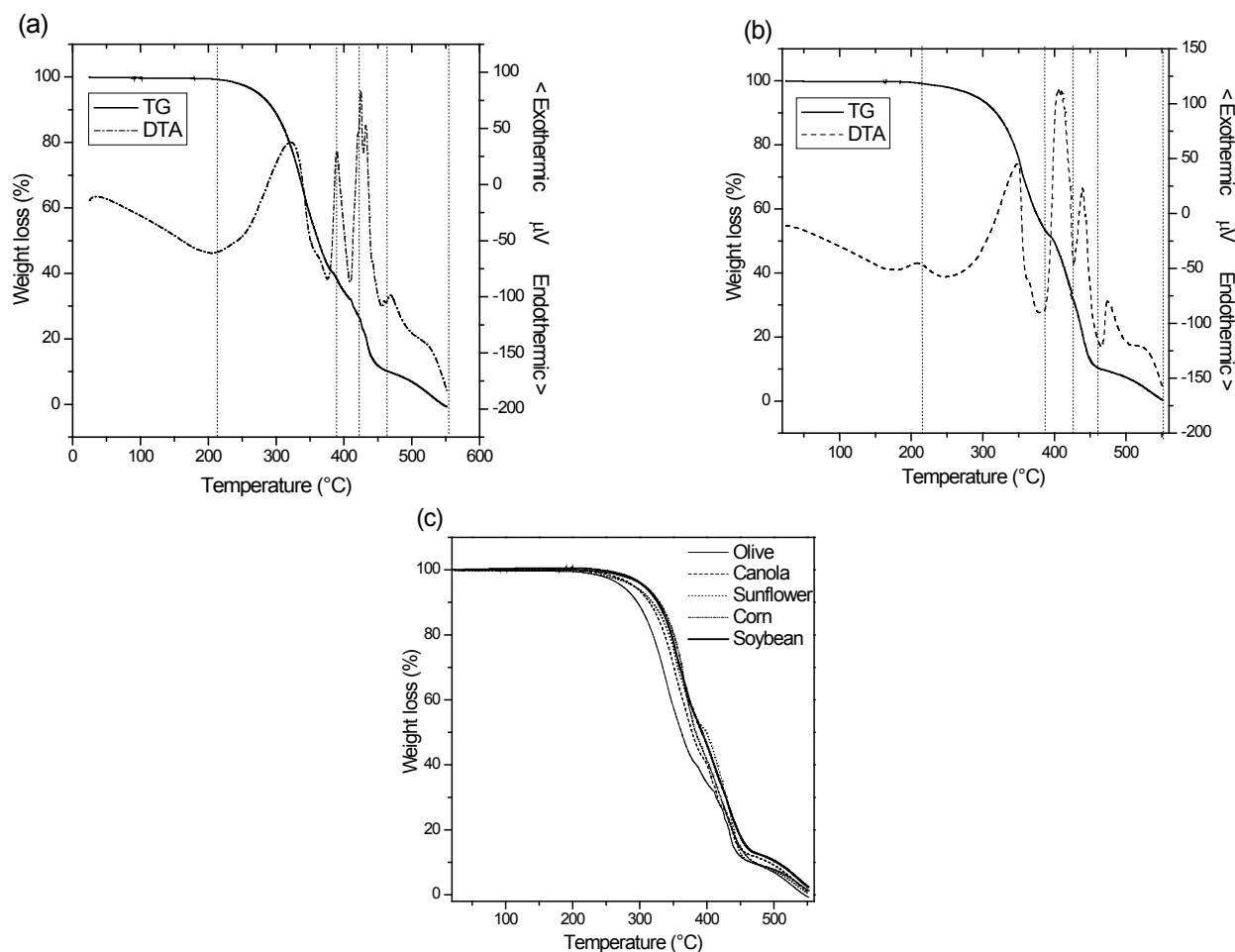
## RESULTS AND DISCUSSION

To evaluate the decomposition temperature of each vegetable oil thermal analyzes were performed in five samples (canola, corn, olive, soybean and sunflower oils) by TG-DTA,

however, because they have similar profiles, only two are shown, the remainder can be seen in the supplementary material. **Figures 1a** and **1b** highlight the thermal behavior of the olive and sunflower oils respectively, both in an oxidant atmosphere. As can be seen from the DTA curve in **Figure 1a** presents four exothermic events attributed to transitions and volatilization processes and/or decomposition of the triacylglycerols. The TG curve shows the first stage of decomposition between 220 and 370  $^{\circ}\text{C}$  and DTA curve shows an exothermic peak between 254 and 355  $^{\circ}\text{C}$ . Based on extrapolation of the TG curve, it can be seen that the onset temperature for the first stage of decomposition is approximately 258  $^{\circ}\text{C}$ . The second weight loss step occurs between 375 and 408  $^{\circ}\text{C}$ , with an exothermic peak between 380 and 408  $^{\circ}\text{C}$ <sup>30</sup>. The presence of an exothermic peak at 410  $^{\circ}\text{C}$  indicates a third step of weight loss between 410 and 454  $^{\circ}\text{C}$ . Finally, between 454 and 550  $^{\circ}\text{C}$  is observed a small weight loss and an exothermic peak of low intensity attributed to burning of organic waste matter from the previous stages of the heat treatment.

**Figure 1b** shows a thermal behavior similar to that observed for the olive oil, i.e. four stages of thermal decomposition. Furthermore, the onset temperature of decomposition in the first stage for sunflower oil is equal to 283  $^{\circ}\text{C}$ , while the one for olive oil is 254  $^{\circ}\text{C}$ . The DTA curve also shows four exothermic peaks with different intensities compared to olive oil, i.e., the difference of exothermic peaks relating to the second (390-427  $^{\circ}\text{C}$ ) and third (427-464  $^{\circ}\text{C}$ ) decomposition steps of sunflower oil are probably due to the difference in composition of fatty acids present in the samples.

**Figure 1c** shows the comparison of TG curves of all oils and the thermal stability can be sorted in descending order as from the temperature of the first stage of thermal decomposition: corn (302  $^{\circ}\text{C}$ ), soybean (300  $^{\circ}\text{C}$ ), canola (298  $^{\circ}\text{C}$ ), sunflower (283  $^{\circ}\text{C}$ ) and olive oil (258  $^{\circ}\text{C}$ ). In this case, the higher the onset temperature of thermal decomposition step of edible oil, the higher its thermal stability. It is observed that the decomposition temperatures of the edible vegetable oils tested are higher than



**Figure 1.** (a) TG and DTA curves of olive oil in air; (b) TG and DTA curves of sunflower oil in air; (c) TG curves of olive, canola, sunflower, corn and soybean oils in air

the temperatures commonly observed in domestic frying process by immersion.

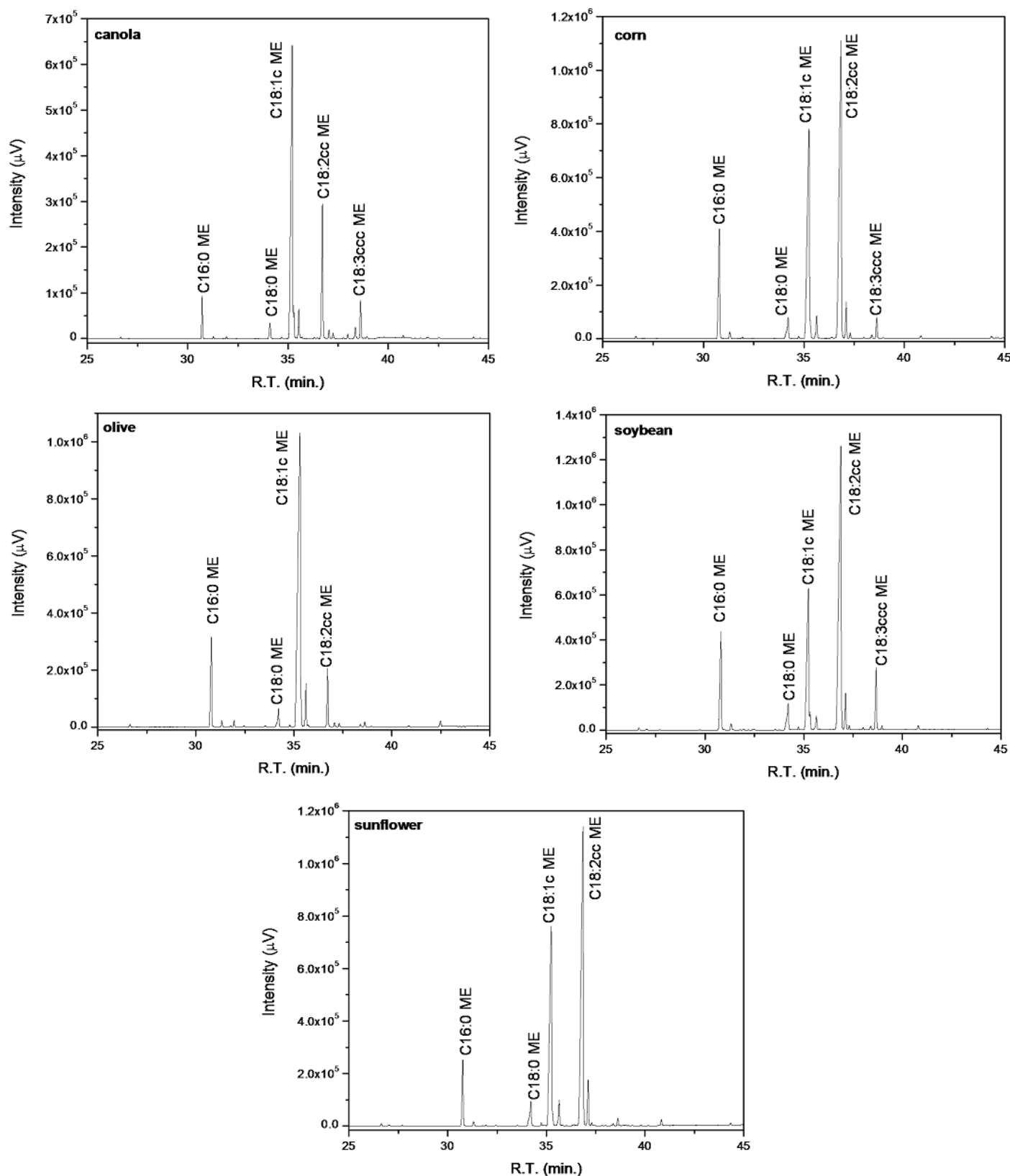
According to the values of temperature of thermal decomposition of oils, the corn oil presents the higher thermal stability. This first decomposition step highlighted in the TG curves of the oils analyzed is a property of great practical importance, specially when frying foods, to avoid the deterioration process of the oils. On the other hand, the olive oil has a lower thermal stability between all samples analyzed by thermogravimetric analysis. As previously discussed, the difference in the onset temperature of decomposition of the oils can be assigned to the presence of different fatty acids. As will be discussed below, the results of the GC-FID presented in the **Table 1**

show the quantification of FA majority, namely, palmitic, stearic, oleic, linoleic and linolenic acids, in oils analyzed.

After exposure of the samples to the heat treatment at times  $T_1$ ,  $T_2$  and  $T_3$ , each oil was analyzed by GC-FID in duplicate. The chromatograms for the analysis of oils at time  $T_1$  are shown in **Figure 2**, while the chromatograms at times  $T_2$  and  $T_3$  were not shown since they are similar to the one at  $T_1$ .

Chromatographic conditions: column CP-SIL 88 for FAME with 100 m x 0.25 mm x 0.2  $\mu\text{m}$  at 80  $^{\circ}\text{C}$ , 4  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  to 220  $^{\circ}\text{C}$ , 5 min, 4  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  to 240  $^{\circ}\text{C}$ , 10 min, the carrier gas was hydrogen with 1.0  $\text{mL min}^{-1}$  and the pressure 140.3 kPa, injection with flow 20  $\text{mL min}^{-1}$  at 250  $^{\circ}\text{C}$ , volume injection 1.0  $\mu\text{L}$  and FID at 270  $^{\circ}\text{C}$ .





**Figure 2.** GC chromatograms of each raw vegetable oil analyzed in T1. Chromatographic conditions: column CP-SIL 88 for FAME with 100 m x 0.25 mm x 0.2  $\mu\text{m}$  at 80  $^{\circ}\text{C}$ , 4  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  to 220  $^{\circ}\text{C}$ , 5 min, 4  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  to 240  $^{\circ}\text{C}$ , 10 min, the carrier gas was hydrogen with 1.0  $\text{mL min}^{-1}$  and the pressure 140.3 kPa, injection with flow 20  $\text{mL min}^{-1}$  at 250  $^{\circ}\text{C}$ , volume injection 1.0  $\mu\text{L}$  and FID at 270  $^{\circ}\text{C}$

The quantification of FA majority, namely, palmitic, stearic, oleic, linoleic and linolenic acids, in oils tested is presented in Table 1. It can be seen that the sum of these five FA majority represent about 90 % of FA present in all analyzed oils (last column of Table 1, named total fatty acids – TFA). The results shown in Table 1 are mean values of authentic duplicate analyzes for each oil and relative standard deviations of all measures was less than 3 %.

It can be seen also in Table 1, there was an increase of 6 units of oleic acid (monounsaturated) in sunflower oil, as well as the decrease of 5 units of linoleic acid (polyunsaturated) in the same oil. This may be related to the first desaturation signs of oil, in which the polyunsaturated acids is hydrogenated and pass to monounsaturated. Keszler et al<sup>31</sup> present in their work an interesting mechanism for decomposition of unsaturated fatty acids (UFA), with different products.

The results of the Tukey test presented in

Table 1 show that palmitic acid, stearic and oleic acid no significant variations at 95 % confidence in any of the analyzed oils. This test also shows that canola oil presented less decomposition after heat treatments applied here, with a slight variation only in the composition of linoleic acid in the second heating (240 °C). Corn oil also showed low decomposition into FA majority, showing only small variation of linoleic acid throughout warming. The other oils analyzed (olive, soybean and sunflower) showed significant differences at 95 % confidence mainly in linoleic acid and linolenic acid with heat treatment in which they were submitted.

For a better interpretation of results presented in Table 1, the Figure 3 shows a graph of the variation of saturated fatty acid (SFA) and UFA as a function of heat treatment. It can be seen that the amount of SFA remains constant for the five types of vegetable oil analyzed. The UFA show a slightly larger dispersion compared to

**Table 1.** FA quantification results by GC in g of FA per 100g of FA\*

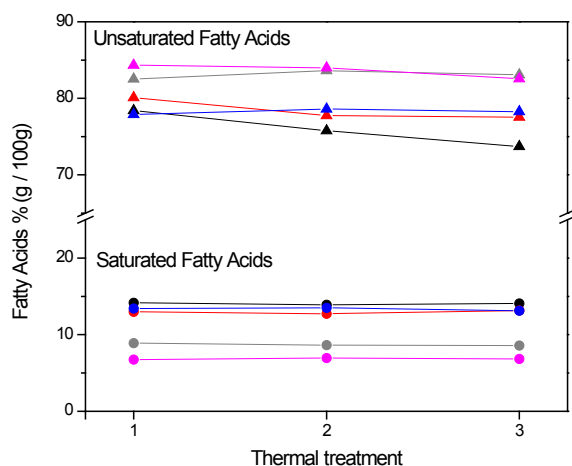
Sample	TT	Palmitic	Stearic	SFA	Oleic	Linoleic	Linolenic	UFA	TFA
Canola	1	4.5a	2.2a	6.7	62.5a	17.3a	4.5a	84.3	91.1
	2	4.7a	2.3a	7.0	63.2a	16.6a	4.2a	84.0	90.9
	3	4.5a	2.3a	6.8	62.9a	16.0a	3.6b	82.5	89.4
Corn	1	10.6a	2.4a	13.0	33.3a	45.2a	1.6a	80.1	93.1
	2	10.1a	2.6a	12.7	33.4a	42.6b	1.8a	77.7	90.5
	3	10.5a	2.6a	13.2	33.9a	42.0c	1.6a	77.5	90.7
Olive	1	11.0a	2.4a	13.4	71.8a	5.7a	0.5a	77.9	91.3
	2	11.0a	2.5a	13.5	71.9a	6.2a,b	0.4b	78.6	92.1
	3	10.7a	2.4a	13.1	71.4a	6.4b	0.3c	78.3	91.4
Soybean	1	10.7a	3.5a	14.2	22.8a	50.0a	5.6a	78.4	92.6
	2	10.5a	3.4a	13.9	22.6a	48.1b	5.1b	75.8	89.7
	3	10.6a	3.4a	14.1	22.6a	46.7c	4.4c	73.7	87.8
Sunflower	1	5.8a	3.1a	8.9	32.4a	49.5a	0.6a	82.5	91.4
	2	5.6a	3.1a	8.6	37.0a	46.2b	0.4b	83.6	92.3
	3	5.5a	3.1a	8.6	38.2b	44.5b	0.4c	83.1	91.6

TT – Thermal treatment; SFA – Saturated fatty acids; UFA – Unsaturated fatty acids; TFA – Total fatty acids FA concentration values marked with the same letter to different times analyzed have no significant differences by Tukey test with 95 % confidence, since the values marked with different letters are significant differences by Tukey test with 95 % confidence

\*All measurements were made in duplicate and relative standard deviations were all below 3.0 %

SFA. In this case corn and soybean oils exhibit a small decrease in the amount of UFA, while canola, olive and sunflower oils remained constant.

In these GC analyzes are quantified FA that were initially linked to triacylglycerol, not being analyzed, therefore, free fatty acids, because transesterification was carried out by basic catalysis<sup>27,28</sup>. The results indicate that there was



**Figure 3.** Variation of SFA and UFA with applied heat treatment with legends: (—) canola, (—) corn, (—) olive, (—) soybean and (—) sunflower

no big change in the FA present in vegetable oils for the thermal treatment applied, though these are its main constituents. This is a positive result when thinking about food quality and safety. This avoids the consumption of degradation products of vegetable oils.

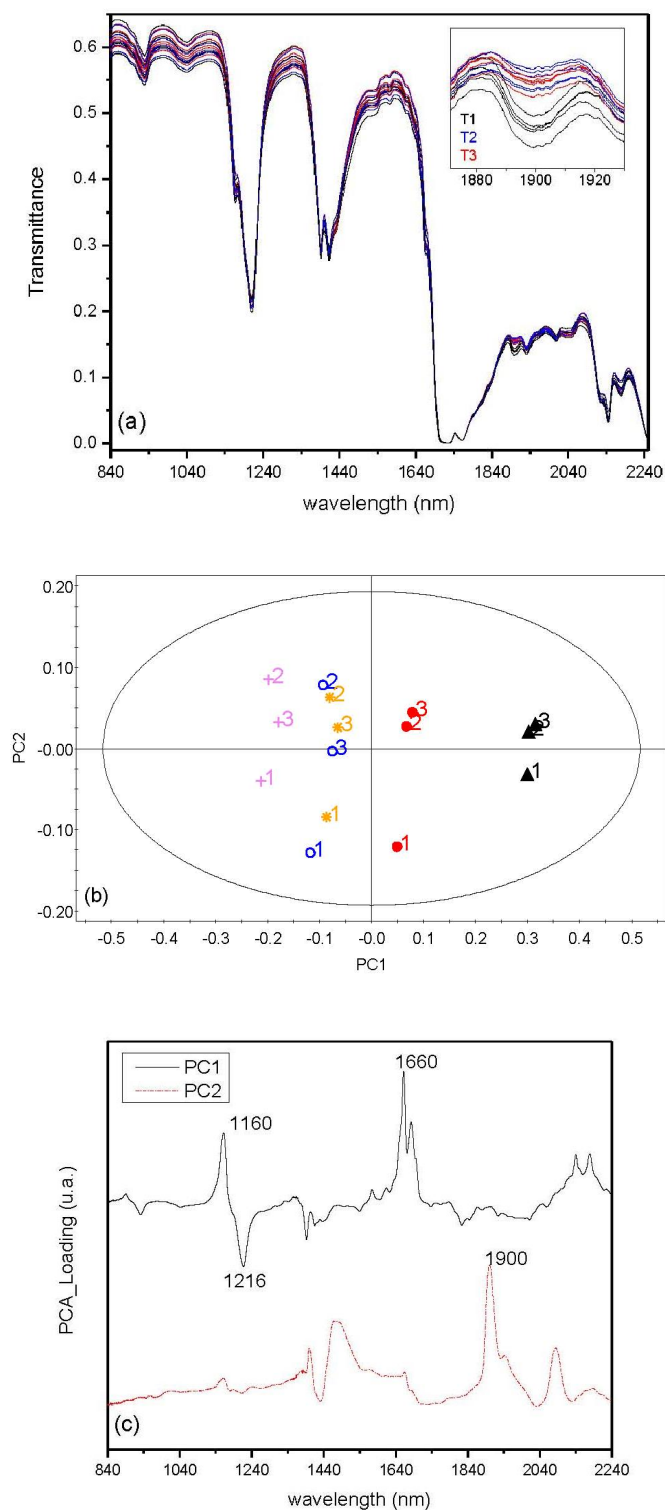
For a more comprehensive investigation of the FA, the same set of samples was analyzed by NIR spectroscopy. The approach used was the multivariate analysis of data from the full spectrum of all samples by Principal Component Analysis (PCA)<sup>32</sup>. The motivation for using this approach is due to the overlapping of the spectra of different vegetable oils as well as the different thermal treatment and the failure to provide a vibrational marker easily identifiable to discriminate different oil origins or thermal treatment. The results obtained by NIR spectroscopy are summarized in **Figure 4**.

**Figure 4a** shows the complete collection of the spectra of all analyzed samples with the highlight for the region near 1900 nm, which will be discussed later. **Figure 4b** shows a PCA analysis, based on the NIR spectra of all edible oils analyzed. The score diagram for PCA, **Figure 4b**, shows a separation, in the horizontal axes (PC1), for different species of vegetable oils, in this case, four groups are formed in which sunflower and corn oils are in the same group. This result corroborates with the measurements carried out by GC analysis, as sunflower and corn oils have more similar distribution most similar of fatty acids than other oils. In summary, the direction of PC1, which represents 84 % of the total variance explained ( $R^2$ ) by the PCA model, is responsible for the discrimination of different types of oils analyzed, and such separation occurs because the distribution of fatty acids.

The most important regions of the NIR spectrum for this separation along the horizontal axis are presented in a loading plot, shown in **Figure 4c**, for PC1. The assignments of these regions are the following: 1160 nm corresponds to the second overtone of CH stretching of the  $\text{CH}_3$  groups, the stretching in 1660 nm is related to the vibration CH with cis unsaturation and the band at 1216 nm is attributed to the vibration of  $\text{CH}_2$  groups associated with the second overtone of CH stretch<sup>33</sup>.

**Figure 4b** evidenced that all analyzed samples at ambient temperature (denoted in this figure by '1') are located on the third and fourth quadrants, or negative vertical axis. This axis (PC2) represents 12 % of variance explained of the PCA model. This tendency of separation by thermal treatment may be related to the decrease for carboxyl groups present in oils, given that in 1900 nm occur the stretching due the second overtone of the carboxyl.

One hypothesis to explain the decrease in the signal of the carboxyl after heat treatments can be the thermo-oxidative degradation of FA, such as Keszler and collaborators<sup>31</sup> demonstrates in a mechanism proposal. The loading plot for PC2, **Figure 4c**, confirms that the most important region in the NIR spectrum to explain this separation is the band near to 1900 nm.



**Figure 4.** Near Infrared analysis. (a) NIR spectra of all edible oils analyzed with highlighting for the thermal treatment T1, T2 and T3 near to 1900 nm; (b) score plot of PCA model based NIR spectra with legends: canola (●), corn (\*), olive (▲), soybean (+) and sunflower (○), numbers representing the thermal treatment; (c) loading plot for PCA analysis

## CONCLUSION

From the TG curves of edible oils analyzed in an oxidant atmosphere it is concluded that all oils have onset decomposition temperature above the temperatures obtained from household stoves. The TG curves obtained between 25-550 °C allowed the analyze complete of the thermal events of decomposition of all oils studied. However, for the FA composition, GC analysis showed that the canola, olive and sunflower oils were more stable for thermal treatments at 180 °C and 240 °C, while corn and soybean oils showed a small decrease in UFA.

Analyses by NIR spectroscopy showed that despite the differences in FA composition of each sample, all of them showed similar behavior when subjected to heat treatments. NIR spectroscopy indicated that the absorption at around 1900 nm, which can be attributed to degradation products of UFA, this is the main difference between the fresh oil (T1) of heated oils (T2 and T3). This study allowed the understanding of what happens to the vegetable oil in the beginning of his term-decomposition, such information is useful to consumers, food industry and health surveillance agency.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-475055/2011-0 and 301689/2011-3), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais of Brazil (CEX-PPM 00398-13 and CEX-RED-0010-14 from Rede Mineira de Química), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for fellowships and financial support.

## REFERENCES

1. Pinto RC, Locquet N, Eveleigh L, Rutledge DN. Preliminary studies on the mid-infrared analysis of edible oils by direct heating on an ATR diamond crystal. *Food Chem.* 2010;120(4):1170-7. [DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.11.053].

2. Martínez-Yusta A, Guillén MD. Deep-frying food in extra virgin olive oil: A study by <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance of the influence of food nature on the evolving composition of the frying medium. *Food Chem*. 2014;150:429-37. [DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.11.015].
3. Cerretani L, Bendini A, Rodriguez-Estrada MT, Vittadini E, Chiavaro E. Microwave heating of different commercial categories of olive oil: Part I. Effect on chemical oxidative stability indices and phenolic compounds. *Food Chem*. 2009;115(4):1381-8. [DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.01.060].
4. Chiavaro E, Barnaba C, Vittadini E, Rodriguez-Estrada MT, Cerretani L, Bendini A. Microwave heating of different commercial categories of olive oil: Part II. Effect on thermal properties. *Food Chem*. 2009;115(4):1393-400. [DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.01.064].
5. Chiavaro E, Rodriguez-Estrada MT, Vittadini E, Pellegrini N. Microwave heating of different vegetable oils: Relation between chemical and thermal parameters. *LWT - Food Sci Technol*. 2010;43(7):1104-12. [DOI: 10.1016/j.lwt.2010.02.016].
6. Cuvelier ME, Lacoste F, Courtois F. Application of a DSC model for the evaluation of TPC in thermo-oxidized oils. *Food Control*. 2012;28(2):441-4. [DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.05.019].
7. Kowalski B. Thermal-oxidative decomposition of edible oils and fats. DSC studies. *Thermochim Acta*. 1991;184(1):49-57. [DOI: 10.1016/0040-6031(91)80134-5].
8. Pardaul JJR, Souza LKC, Molfetta FA, Zamian JR, Rocha Filho GN, da Costa CEF. Determination of the oxidative stability by DSC of vegetable oils from the Amazonian area. *Bioresour Technol*. 2011;102(10):5873-7. [DOI: 10.1016/j.biortech.2011.02.022].
9. Chiavaro E, Rodriguez-Estrada MT, Bendini A, Rinaldi M, Cerretani L. Differential scanning calorimetry thermal properties and oxidative stability indices of microwave heated extra virgin olive oils. *J Sci Food Agric*. 2011;91(2):198-206. [DOI: 10.1002/jsfa.4165].
10. Chiavaro E, Vittadini E, Rodriguez-Estrada MT, Cerretani L, Bendini A. Monovarietal extra virgin olive oils. Correlation between thermal properties and chemical composition: heating thermograms. *J Agric Food Chem*. 2008;56(2):496-501. [DOI: 10.1021/jf072680w].
11. Maggio RM, Cerretani L, Barnaba C, Chiavaro E. Application of differential scanning calorimetry-chemometric coupled procedure to the evaluation of thermo-oxidation on extra virgin olive oil. *Food Biophys*. 2012;7(2):114-23. [DOI: 10.1007/s11483-012-9248-1].
12. Pellegrini N, Visioli F, Buratti S, Brighenti F. Direct analysis of total antioxidant activity of olive oil and studies on the influence of heating. *J Agric Food Chem*. 2001;49(5):2532-8. [DOI: 10.1021/jf001418j].
13. Gómez-Alonso S, Fregapane G, Salvador MD, Gordon MH. Changes in phenolic composition and antioxidant activity of virgin olive oil during frying. *J Agric Food Chem*. 2003;51(3):667-72. [DOI: 10.1021/jf025932w].
14. Carrasco-Pancorbo A, Cerretani L, Bendini A, Segura-Carretero A, Lercker G, Fernández-Gutiérrez A. Evaluation of the influence of thermal oxidation on the phenolic composition and on the antioxidant activity of extra-virgin olive oils. *J Agric Food Chem*. 2007;55(12):4771-80. [DOI: 10.1021/jf070186m].
15. Tena N, Aparicio-Ruiz R, García-González DL. Time course analysis of fractionated thermoxidized virgin olive oil by FTIR Spectroscopy. *J Agric Food Chem*. 2013;61(13):3212-8. [DOI: 10.1021/jf305422d].
16. Zribi A, Jabeur H, Aladedunye F, Rebai A, Matthäus B, Bouaziz M. Monitoring of quality and stability characteristics and fatty acid compositions of refined olive and seed oils during repeated pan- and deep-frying using GC, FT-NIRS, and Chemometrics. *J Agric Food Chem*. 2014;62(42):10357-67. [DOI: 10.1021/jf503146f].
17. Andrikopoulos NK, Kalogeropoulos N, Falirea A, Barbagianni MN. Performance of virgin olive oil and vegetable shortening during domestic deep-frying and pan-frying of potatoes. *Int J Food Sci Technol*. 2002;37(2):177-90. [DOI: 10.1046/j.1365-2621.2002.00555.x].

18. Gonçalves RP, Março PH, Valderrama P. Thermal edible oil evaluation by UV-Vis spectroscopy and chemometrics. *Food Chem*. 2014;163:83-6. [DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.04.109].
19. Carmona MÁ, Lafont F, Jiménez-Sanchidrián C, Ruiz JR. Raman spectroscopy study of edible oils and determination of the oxidative stability at frying temperatures. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2014;116(11):1451-6. [DOI: 10.1002/ejlt.201400127].
20. Guillen MD, Goicoechea E. Oxidation of corn oil at room temperature: Primary and secondary oxidation products and determination of their concentration in the oil liquid matrix from 1H nuclear magnetic resonance data. *Food Chem*. 2009;116(1):183-92. [DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.02.029].
21. Guillén MD, Ruiz A. Study by means of 1H nuclear magnetic resonance of the oxidation process undergone by edible oils of different natures submitted to microwave action. *Food Chem*. 2006;96(4):665-74. [DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.04.013].
22. Kowalski B, Ratusz K, Kowalska D, Bekas W. Determination of the oxidative stability of vegetable oils by Differential Scanning Calorimetry and Rancimat measurements. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2004;106(3):165-9. [DOI: 10.1002/ejlt.200300915].
23. Giuffrida F, Destailats F, Egart MH, Hug B, Golay P-A, Skibsted LH, et al. Activity and thermal stability of antioxidants by differential scanning calorimetry and electron spin resonance spectroscopy. *Food Chem*. 2007;101(3):1108-14. [DOI:10.1016/j.foodchem.2006.03.010].
24. Takeoka GR, Full GH, Dao LT. Effect of heating on the characteristics and chemical composition of selected frying oils and fats. *J Agric Food Chem*. 1997;45(8):3244-9. [DOI: 10.1021/jf970111q].
25. López-Beceiro J, Artiaga R, Gracia C, Tarrío-Saavedra J, Naya S, Mier J. Comparison of olive, corn, soybean and sunflower oils by PDSC. *J Therm Anal Calorim*. 2011;104(1):169-75. [DOI: 10.1007/s10973-010-1165-2].
26. Berasategi I, Barriuso B, Ansorena D, Astiasarán I. Stability of avocado oil during heating: Comparative study to olive oil. *Food Chem*. 2012;132(1):439-46. [DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.11.018].
27. Christie WW. Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. In: Christie WW, editor. *Advances in Lipid Methodology - Two*. 1ª ed. Dundee: Oily Press; 1993. p. 69-111.
28. Christie WW, Han X. Chapter 7 - Preparation of derivatives of fatty acids. In: Christie WW, Han X, editors. *Lipid Analysis*. 4ª ed.: Woodhead Publishing; 2012. p. 145-58.
29. AOCS. Determination of cis and trans Fatty Acids in Hydrogenated and Refined Oils and Fats by Capillary GLC. Official Method Ce1f-96: AOCS Press; Reapproved 1997 Revised 2001.
30. Dweck J, Sampaio CMS. Analysis of the thermal decomposition of commercial vegetable oils in air by simultaneous TG/DTA. *J Therm Anal Calorim*. 2004;75(2):385-91. [DOI: 10.1023/B:JTAN.0000027124.96546.0f].
31. Keszler Á, Kriska T, Németh A. Mechanism of volatile compound production during storage of sunflower oil. *J Agric Food Chem*. 2000;48(12):5981-5. [DOI: 10.1021/jf000444e].
32. Jolliffe IT. *Principal Component Analysis*: Springer; 2002. [DOI: 10.1021/jf000444e].
33. Cruz RMS, Khmelinskii I, Vieira M. *Methods in Food Analysis*: CRC Press; 2014.



# Avaliação do desempenho da PCR em tempo real para o diagnóstico de meningite por *Enterovirus*

## Evaluation of a real-time PCR assay performance for the diagnosis of enteroviral meningitis

[RIALA6/1695](#)

Bráulio Caetano MACHADO\*, Heloísa Rosa VIEIRA, Mayara Rhaissa de Moraes ALVES, Rita de Cássia Compagnoli CARMONA

\*Endereço para correspondência: Núcleo de Doenças Entéricas, Centro de Virologia, Instituto Adolfo Lutz. Av. Dr. Arnaldo, 355, São Paulo, SP, CEP: 01246-000. Tel: 11 3068 2909. E-mail: bcmachado@ial.sp.gov.br

Recebido: 27.08.2015 - Aceito para publicação: 08.04.2016

### RESUMO

O gênero *Enterovirus* (EV) é o agente etiológico mais frequente e responsável pela ocorrência de meningite viral no mundo. O objetivo deste trabalho foi de avaliar resultados da implantação do ensaio de PCR em tempo real (RT-qPCR) para a detecção de EV. Foram selecionadas 616 amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com meningite, recebidas para realizar diagnóstico laboratorial no período de 1998-2013. Os RNAs foram extraídos diretamente do LCR pelo método QIAamp<sup>®</sup>, e o ensaio TaqMan<sup>®</sup> foi aplicado. A avaliação foi feita comparando-se resultados de RT-qPCR com os obtidos pelo método de isolamento em cultura de células. Das 616 amostras analisadas, 94 (15,2 %) foram positivas para EV no ensaio de RT-qPCR; e na cultura celular EV foi isolado de 58 (9,4 %) amostras. Valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo foram de 89,70 %, 92,40 %, 55,30 % e 98,90 %, respectivamente. O RT-qPCR foi ligeiramente superior à cultura viral para a detecção de EV no LCR. O RT-qPCR TaqMan<sup>®</sup> é um ensaio rápido e sensível, facilmente executável e com potencial para melhorar o diagnóstico da meningite viral na rotina do laboratório de saúde pública no Estado de São Paulo.

**Palavras-chave.** infecções por *Enterovirus*, meningite, PCR em tempo real.

### ABSTRACT

*Enterovirus* (EV) genus is the most frequent etiological agent causing viral meningitis worldwide. This study aimed at evaluating the performance of real-time reverse transcription-PCR (RT-qPCR) assay for detecting EV. A total of 616 cerebrospinal fluid (CSF) samples from patients with meningitis were selected, among those received at EV diagnosis laboratory from 1998 to 2013. RNAs were directly extracted from CSF by using QIAamp<sup>®</sup> Viral RNA Mini Kit, and TaqMan<sup>®</sup> RT-qPCR assay was applied. Evaluation was made by comparing the RT-qPCR results with those found in the cell culture for viral isolation method. Of 616 analyzed samples, 94 (15.20%) were positive for EV RNA on the RT-qPCR assay; and in the cell culture EV was isolated from 58 (9.40 %) samples. The assay showed sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of 89.70 %, 92.40 %, 55.30 % and 98.90 %, respectively. In the present study, the RT-qPCR assay was slightly superior when compared to the viral culture technique for detecting EV from CSF samples. The TaqMan<sup>®</sup> RT-qPCR assay shows to be a fast and sensitive assay, easy to perform, and it shows a potential to improve the viral meningitis diagnosis in the public health laboratory in São Paulo State.

**Keywords.** enterovirus infections, meningitis, real time PCR.

## INTRODUÇÃO

O gênero *Enterovirus* (EV) pertence à família Picornaviridae e é composto por mais de 100 sorotipos virais, e em sua maioria são patógenos humanos<sup>1</sup>. A maior parte das infecções por EV é assintomática ou resulta em doença branda, como febre inespecífica leve ou sintomas respiratórios não específicos<sup>2</sup>. Os EVs são pequenos no tamanho (aproximadamente 30 nm), não envelopados, e possui RNA de fita simples e polaridade positiva. O RNA dos EVs é de aproximadamente 7,5 kb. A região codificante é delimitada pelas regiões não traduzidas nas extremidades 5' e 3'<sup>2</sup>. Apesar de baixa taxa de letalidade em comparação com a meningite bacteriana, a meningite viral apresenta caráter cosmopolita e representa significativa causa de morbidade, principalmente em crianças, sem distinção por sexo, e pode provocar sequelas neurológicas; e em caso de agravamento da doença pode levar o paciente à morte. Os EVs podem ocorrer isoladamente e causar infecção, embora seja comum o aglomerado de infectados em ocasionar surtos<sup>2</sup>. Estes vírus são a causa mais comum de meningite asséptica em crianças e adultos, e estão diretamente associados a 80,00 a 90,00 % dos infectados<sup>3</sup>. O diagnóstico rápido e acurado das infecções por EV pode reduzir o uso indiscriminado de antibióticos durante a hospitalização, bem como o seu custo financeiro<sup>4</sup>. A implementação de métodos rápidos para o diagnóstico da meningite por EV tornou-se um requisito muito importante para os serviços de Saúde Pública, porque com esse instrumento é possível fornecer rapidamente os resultados para os clínicos, e proporcionar melhor assistência aos pacientes<sup>5</sup>. Os métodos laboratoriais de rotina diagnóstica utilizando-se o ensaio de PCR em tempo real (RT-qPCR) têm sido desenvolvidos nos últimos 15 anos. Em virtude de seu alto grau de conservação, a região 5' não traduzida do genoma viral é largamente utilizada nos métodos de detecção dos EVs<sup>5</sup>. Tem sido também desenvolvido com êxito a técnica de RT-qPCR para efetuar a detecção direta do agente patogênico em vários tipos de materiais clínicos, como o LCR<sup>6</sup>. Outros métodos de detecção como a plataforma "GeneXpert Enterovírus" têm sido empregados e que demonstram bons resultados, porém o alto

custo inviabiliza a sua utilização em larga escala<sup>7</sup>. Outrossim, tem sido frequentemente relatada a utilização da reação de RT-qPCR em um formato combinado, em que por meio de um único ensaio realiza-se a detecção simultânea de outros agentes virais (ex: Enterovírus e Parechovirus). Esses avanços tecnológicos facilitam o aprimoramento do diagnóstico de meningite<sup>8</sup>. O objetivo deste trabalho foi de avaliar os resultados da implantação do ensaio de PCR em tempo real para a detecção de EV, tendo como alvo a região 5' não traduzida, na análise de amostras de LCR para efetuar o diagnóstico laboratorial de indivíduos com suspeita de meningite viral.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para o processo de padronização do ensaio foi utilizada a cepa de vírus padrão do laboratório - echovírus 30 (E-30), que após a titulação o RNA foi extraído utilizando-se o *kit* QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen®, Hilden, Alemanha). Foi preparada a diluição seriada decimal da suspensão de EV para avaliar a eficiência, a sensibilidade analítica e a repetitividade do ensaio de RT-qPCR; e os parâmetros obtidos foram empregados para fazer os ajustes necessários para otimização da técnica. Para esta finalidade, inicialmente foram obtidos os títulos de infectividade da cepa padrão E-30. A estimativa de infectividade do sobrenadante de E-30 foi determinada por microtitulação em células RD (Rabdomiossarcoma humano - CCIAL 039 - Instituto Nacional de Virologia do México). Os títulos infectantes do vírus foram calculados pelo método de Karber<sup>9</sup> e expresso em  $10^{-6,75}$  DICC<sub>50</sub> (dose infectante de cultura de células 50 %) por 100 mL. As diluições da cepa E-30 foram armazenadas a -70 °C para o preparo da extração de RNA. Para determinar o alcance e o limite de detecção do ensaio de RT-qPCR para EV, as diluições seriadas do RNA (de  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ ) de cepa E-30 e as amostras de controle negativo foram testadas em quadruplicatas. Foi realizada uma reação para analisar a eficiência baseada na relação do "Cycle threshold, Ct" com a quantidade estimada de título de vírus em cada ponto da curva padrão. O gráfico gerado pela concentração

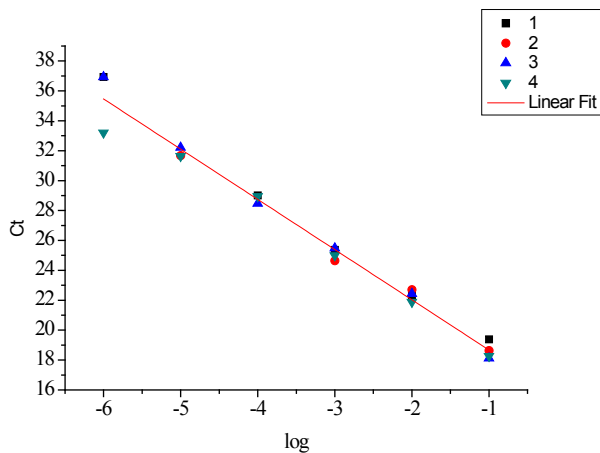


de amplicons e os respectivos valores de “Ct” foram empregados para realizar o cálculo da equação de regressão e a correlação entre as variáveis pelo R-quadrado (R<sup>2</sup>). O cálculo foi efetuado por meio do *software* do equipamento ABI 7500 (Applied Biosystems®). Para avaliar a precisão do ensaio foi realizado o teste de repetitividade com 24 réplicas consecutivas dos títulos do RNA E-30 das diluições seriadas que apresentaram os valores de “Ct” ideais. Para o processo de validação do ensaio, foram selecionadas 616 amostras de LCR de pacientes com meningite, enviadas para o Núcleo de Doenças Entéricas do Centro de Virologia do Instituto Adolfo Lutz para o diagnóstico de EV entre os anos de 1998 e 2013. Essas amostras foram armazenadas em *freezer* a -70 °C, e o RNA foi extraído diretamente do LCR utilizando-se o *kit* QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen®, Hilden, Alemanha), conforme as instruções do fabricante. Foi utilizado o sistema “TaqMan® RT-qPCR assay” para efetuar o ensaio RT-qPCR. A avaliação do ensaio foi realizada comparando-se os resultados do RT-qPCR com os dados previamente obtidos pela técnica de isolamento viral em cultura de células que é considerado a metodologia “Padrão Ouro”. O RNA extraído foi estocado em *freezer* a -70 °C. A reação de RT-qPCR foi realizada empregando-se os *primers* para o gênero EV, que apresentam a região conservada 5’ não traduzida dos EVs (5’NTR) como alvo de detecção. Foram utilizados: *primer* senso 5’-CCCTGAATGCGGCTAATCC-3’, *primer* anti-senso 5’-ATTGTCACCATAAGCAGCCA-3’ e *probe* FAM 5’-AACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTC-3’ BHQ, conforme a descrição prévia com pequenas modificações<sup>10</sup>. As concentrações dos componentes da reação foram 300 nM (*primer* senso), 900 nM (*primer* anti-senso), 150 nM (*probe*), 1× *kit* “SuperScript™ III One-step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase Invitrogen” (Life Technologies Carlsbad, CA, EUA) e 5 µL do RNA viral extraído, resultando no volume total de 25 µL. Como controle de qualidade da extração do RNA viral foram utilizados em reação separada, os *primers* (senso 5’-AGATTTGGACCTGCGAGCG-3

na concentração de 40 nM) e anti-senso 5’-GAGCGGCTGTCTCCACAAGT-3’ na concentração de 40 nM) e *probe* (FAM 5’-TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG-3’ BHQ na concentração de 10 nM) que têm como alvo de detecção a Ribonuclease P (Rnase P, RP) do gene RP humano. Esta reação ao resultar em curva de amplificação, indica a presença suficiente de RNA humano e confirma que a amostra apresenta boa qualidade. Os controles positivos e negativos foram utilizados na reação. Para a validação do teste, foram também incluídas as amostras sabidamente negativas e amostras sabidamente positivas para Enterovírus com cargas virais distintas, bem como de outros agentes virais (herpes1, citomegalovírus, Epstein Barr, rubéola, encefalite Saint Louis, Rocio) para verificar a ocorrência de reações cruzadas. As amostras foram colocadas na placa em duplicata e a reação foi processada no aparelho ABI 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA). A transcrição reversa mediada pela enzima “SuperScript™ III” foi realizada a 50 °C durante 15 min, seguida de ativação da enzima Platinum® Taq DNA polimerase a 95 °C durante 2 min e, posteriormente, por 45 ciclos combinando-se desnaturação a 95 °C por 15 segundos, e anelamento e extensão a 60 °C durante 1 min. Os resultados de fluorescência da reação foram coletados em cada etapa de anelamento e extensão, e os dados foram analisados ao final da corrida utilizando-se o *software* ABI 7500 SDS versão 1.7.1. Foram estimados os parâmetros de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos, prevalência, prevalência estimada, acurácia e classificação incorreta. A concordância dos resultados de positividade apresentada pelos ensaios foi avaliada pelo índice *Kappa*<sup>11</sup>. A pesquisa foi conduzida conforme as recomendações das resoluções vigentes no período de estudo. Inicialmente, a Resolução 196 de 10 de outubro de 1996; posteriormente, seguiu-se a Resolução 466 de 12 de dezembro de 2012 do Conselho Nacional da Saúde - Ministério da Saúde. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz/SP, segundo o protocolo nº 031/2010-IAL.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A equação de regressão obtida no presente estudo mostrou boas condições de amplificação (valor de inclinação de -3,3) e correlação positiva entre as variáveis (coeficiente de determinação  $R^2$ ) de 0,98 e o valor de  $\gamma$ -intercepto foi de 20,83 observada nas diluições sucessivas. Na análise destes dados gerados na curva padrão, foi observada eficiência de amplificação de 99,80 %. A curva padrão de eficiência do ensaio de RT-qPCR está apresentada na **Figura 1**. O teste de repetitividade resultou nos respectivos valores de média (Ct), variância e desvio padrão: réplicas  $10^{-3}$  (22,51; 0,005; 0,07) e réplicas  $10^{-4}$  (25,94; 0,03; 0,17) considerados adequados, e que não suscitam potenciais problemas de precisão. O gênero EV foi detectado em 94 (15,20 %) de 616 amostras analisadas por meio de ensaio RT-qPCR e foi isolado de 58 (9,40 %) das 616 mostras na cultura celular. O ensaio RT-qPCR apresentou valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo de 89,70 %; 92,40 %; 55,30 %; 98,90 %; respectivamente. A acurácia foi de 92,20 % e a classificação incorreta foi de 7,80 %. O isolamento em cultura de células e RT-qPCR mostra o valor de *Kappa* de 0,78, o que indica boa concordância (**Tabela 1**). No presente estudo, o ensaio de RT-qPCR foi superior à técnica de cultura celular para detectar EV em



**Figura 1.** Curva padrão de eficiência do ensaio de RT-qPCR analisado no equipamento ABI7500, utilizando-se como alvo o antígeno padrão E-30

amostras de LCR. A qualidade do RNA extraído pode influir significativamente na sensibilidade do teste<sup>12</sup>.

Durante o processo de avaliação dos resultados notou-se que ao estratificar os resultados por grupos de idade, houve aumento da sensibilidade do teste. Neste contexto, os valores de sensibilidade foram de 95,20 % ao analisar as amostras de crianças de 0 a 5 anos de idade, e de 93,10 % nas amostras da faixa etária de 5 a 15 anos de idade (**Tabela 2**). Portanto, foi evidenciada uma questão que foi investigada pela análise de três amostras positivas no isolamento em cultura celular, porém negativas na reação de RT-qPCR. Estas amostras foram coletadas de pacientes de maior faixa etária ( $\geq 15$  anos), em que a sensibilidade do teste foi apenas de 62,50 % (das oito amostras positivas na cultura celular, cinco foram positivas na reação de RT-qPCR). A ocorrência dessas três amostras discordantes interferiu na avaliação da técnica e causou diminuição da sensibilidade do teste para

**Tabela 1.** a) Comparação entre os resultados das amostras processadas utilizando-se as técnicas de Isolamento em Culturas de Células (método padrão ouro) e PCR em tempo real para o gênero EV. b) Parâmetros avaliados no processo de validação e os resultados obtidos

a)		Padrão Ouro		
		Isolamento em Cultura de Células		
		Positivo	Negativo	Total
Ensaio de rRT-PCR	Positivo	52	42	94
	Negativo	6	516	522
	Total	58	558	616
b)		Avaliação rRT-PCR		
Sensibilidade		89,70 %		(52/58)
Especificidade		92,40 %		(516/558)
Prevalência (real)		9,40 %		(58/616)
Prevalência Estimada		15,20 %		(94/616)
Valor Preditivo Positivo		55,30 %		(52/94)
Valor Preditivo Negativo		98,90 %		(516/522)
Acurácia		92,20 %		(52+516/616)
Classificação Incorreta		7,80 %		(42+6/616)
Valor de <i>Kappa</i>		0,78		--

**Tabela 2.** Desempenho do RT-qPCR em relação ao Isolamento em Cultura de Células estratificado por faixas etárias dos pacientes

Amostra Clínica/LCR – RT-qPCR – Isolamento C. Celular			
Idade	Sensibilidade	Especificidade	Distribuição / idade
< 5 anos	95,20 % (20/21)	90,30 % (103/114)	135 (22,00 %)
entre 5 a 15 anos	93,10 % (27/29)	89,40 % (194/217)	246 (39,90 %)
> 15 anos	62,50 % (5/8)	96,40 % (219/227)	235 (38,10 %)
Total	89,70 % (52/58)	92,40 % (516/558)	616 (100,00 %)

89,70 %, apesar de este valor ser ainda considerado significativo. Alguns fatores podem influenciar na discordância dos resultados, como: a presença de inibidores no LCR (hemácias); a contaminação no manuseio da amostra no momento da execução da técnica; o tempo de armazenamento; os inúmeros procedimentos de congelamento e descongelamento das amostras clínicas.

Apesar de ter sido utilizado um grande número de amostras clínicas armazenadas há muitos anos no laboratório, o manuseio e os procedimentos técnicos executados nas extrações de RNA de todas as amostras selecionadas foram adequados, pois todas as reações demonstraram resultados válidos, evidenciado pela amplificação do alvo *primer* RP. No processo de validação não houve reação cruzada ou resultado falso positivo nos testes realizados com as amostras específicas sabidamente positivas e negativas e com os soros de pacientes infectados com outros agentes virais. O ensaio TaqMan® RT-qPCR é rápido e apresenta boa sensibilidade para efetuar a confirmação dos pacientes infectados por EV. Este ensaio é de fácil execução, que o torna como excelente alternativa para o isolamento em cultura de células, que é trabalhoso, exige prática do técnico envolvido e consome muito tempo. No futuro, outras modificações poderão aprimorar ainda mais o desempenho do ensaio, e com a possibilidade de padronizar RT-qPCR combinado. Deste modo, um único teste poderá executar a detecção simultânea de outros agentes virais responsáveis pela ocorrência de meningite, tornando-se mais

ágil a resposta para os serviços de saúde do Estado de São Paulo.

## CONCLUSÃO

O ensaio de RT-qPCR para EV foi padronizado e validado em termos de eficiência, sensibilidade e precisão linear para o gene avaliado, e apresenta rendimento suficiente para ser empregado no diagnóstico qualitativo. No presente estudo foram determinadas as melhores condições para a implantação do ensaio de RT-qPCR para EV na rotina diagnóstica do Núcleo de Doenças Entéricas do Instituto Adolfo Lutz. O ensaio de RT-qPCR realizado com amostras de LCR demonstrou boas sensibilidade e especificidade, e tem o potencial de contribuir substancialmente para a vigilância epidemiológica de doentes esporádicos e de surtos de meningite viral no Estado de São Paulo.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos o Núcleo de Cultura de Células do Instituto Adolfo Lutz pelo apoio no fornecimento das culturas celulares utilizadas, e aos demais membros da equipe do Núcleo de Doenças Entéricas pela assistência técnica prestada.

Apoio Financeiro: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Projeto 2012/50234-5

## PRÊMIO

O resumo com os dados preliminares deste estudo recebeu o prêmio “PASCV Travel Award 2015” e foi apresentado na forma de pôster no “31º Simpósio Anual da Sociedade Pan-Americana de Virologia Clínica” em Daytona Beach, Flórida nos Estados Unidos da América.

## REFERÊNCIAS

1. Knowles NJ, Hovi T, Hyypiä T, King AM, Lindberg AM, Pallansch MA, et al. *Picornaviridae*. In: *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Elsevier; 2012.p.855-80.
2. Pallansch MA, Roos RP. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: Knipe DM, Howley PM. 4ª ed. Philadelphia (PA): Lippincott Williams and Wilkins; 2001.p.723-75.
3. Abzug MJ. Presentation, diagnosis, and management of enterovirus infections in neonates. *Paediatr Drugs*. 2004;6(1):1-10. [DOI:10.2165/00148581-200406010-00001].
4. King RL, Lorch SA, Cohen DM, Hodinka RL, Cohn KA, Shah SS. Routine cerebrospinal fluid enterovirus polymerase chain reaction testing reduces hospitalization and antibiotic use for infants 90 days of age or younger. *Pediatrics*. 2007;120(3):489-96. [DOI:10.1542/peds.2007-0252].
5. Romero JR. Reverse-transcription polymerase chain reaction detection of the enteroviruses. *Arch Pathol Lab Med*. 1999;123:1161-9. [DOI:10.1043/0003-998528-199929123<1161].
6. Nijhuis M, Van Maarseveen N, Schuurman R, Verkuijlen S, De Vos M, Hendriksen K, et al. Rapid and sensitive routine detection of all members of the genus enterovirus in different clinical specimens by real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2002;40(10):3666-70. [DOI:10.118/JCM-40.10.3666-3670.2002].
7. Pabbaraju K, Wong S, Wong AA, Tellier R. Detection of enteroviruses and parechoviruses by a multiplex real-time RT-PCR assay. *Mol Cell Probes*. 2015;29(2):81-5. [DOI:10.1016/j.mcp.2015.02.001].
8. Giulieri SG, Chapuis-Taillard C, Manuel O, Hugli O, Pinget C, Wasserfallen JB, et al. Rapid detection of enterovirus in cerebrospinal fluid by a fully-automated PCR assay is associated with improved management of aseptic meningitis in adult patients. *J Clin Virol*. 2015;62:58-62. [DOI:10.1016/j.jcv.2014.11.001].
9. Hierholzer JC, Killington RA. Virus isolation and quantification. In: *Virology Methods Manual: Kangro HO, Mahy BWJ*. London: Academic Press; 1996.p.24-45.
10. Verstrepen WA, Bruynseels P, Mertens AH. Evaluation of a rapid real-time RT-PCR assay for detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid specimens. *J Clin Virol*. 2002;25:39-43. [DOI:10.1016/S1386-6532(02)00032-X].
11. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;33(1):159-74. [DOI:10.2307/2529310].
12. Oberste MS, Peñaranda S, Rogers SL, Henderson E, Nix WA. Comparative evaluation of Taq Man real time PCR and Semi nested VP1 PCR for detection of enteroviruses in clinical specimens. *J Clin Virol*. 2010;49(1):73-4. [DOI:10.1016/j.jcv.2010.06.022].



# Avaliação de anticorpos monoclonais como marcadores diferenciais de meningites bacterianas e virais por meio de técnica imuno-histoquímica

## Investigation on the monoclonal antibodies as differential markers for viral and bacterial meningitis by means of immunohistochemistry technique

RIALA6/1696

Thaís Regina Brienza LATARO<sup>1</sup>, Cristina Takami KANAMURA<sup>2</sup>, Cinthya dos Santos CIRQUEIRA<sup>2</sup>, Sílvia D'Andretta IGLEZIAS<sup>2</sup>, Elizabeth De GASPARI<sup>1\*</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Centro de Imunologia, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 01246-000. E-mail: egaspari@ial.sp.gov.br; degaspari.elizabeth@gmail.com

<sup>2</sup>Centro de Patologia, Núcleo de Anatomia Patológica, Laboratório de Imuno-histoquímica, Instituto Adolfo Lutz

Recebido: 17.11.2015 - Aceito para publicação: 16.05.2016

### RESUMO

Desde 1996, o Laboratório de Anticorpos Monoclonais, Antígenos e Adjuvantes - Centro de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz (CI-IAL) tem desenvolvido trabalhos na caracterização antigênica de cepas de *Neisseria meningitidis* utilizando-se painel de anticorpos monoclonais (AcMo) pré-estabelecido, e produção de novos monoclonais para a análise de cepas com perfis desconhecidos. AcMo foram obtidos das diferentes fusões realizadas no laboratório utilizando-se células esplênicas e linfonodos poplíteos. Dois hibridomas murinos secretores de AcMo anti-*N. meningitidis* produzidos e caracterizados no CI-IAL têm sido avaliados por meio de estudo imuno-histoquímico (IHQ) no Centro de Patologia-Laboratório de Imuno-histoquímica-IAL. Com a padronização da reação, estabeleceu-se um protocolo para efetuar a pesquisa de antígenos de *N. meningitidis* por IHQ. Houve melhoria no diagnóstico histopatológico da meningite meningocócica, sobretudo em situações em que não há confirmação da presença do microorganismo por técnicas biomoleculares, como PCR, utilizando-se AcMo específicos para antígenos de diferentes sorogrupos, sorotipos e subtipos de *N. meningitidis*. O resultado obtido nos primeiros testes mostrou-se promissor, e os dois AcMo demonstraram excelentes resultados. Não houve reatividade cruzada com meningite viral, *S. pneumoniae*, *Rickettsia* ou rubéola. Nos próximos estudos, é fundamental ampliar número de amostras, incluindo-se aquelas coletadas de pacientes com meningites meningocócicas e de indivíduos infectados com outros agentes patogênicos.

**Palavras-chave.** *Neisseria meningitidis*, anticorpos monoclonais, imuno-histoquímica.

### ABSTRACT

Since 1996, the Laboratory of Monoclonal Antibodies Antigens and Adjuvants - Immunology Center of Adolfo Lutz Institute (IC-IAL) has been working on *N. meningitidis* strains antigens characterization by using a predetermined monoclonal antibodies (MoAb) panel; and the new monoclonal production has been performed for characterizing strains with unknown profiles. MoAb were obtained from different fusions performed at IAL using spleen cells and popliteal lymph nodes. Two murine hybridomas secreting MoAb anti-*N. meningitidis* antigens, produced and characterized in the Laboratory of IC-IAL, are presently being evaluated by immunohistochemical (IHC) technique at Immunohistochemistry Laboratory - Pathology Center, IAL. After standardizing these reactions, a protocol for performing investigation on *N.meningitidis* antigens by using IHQ was established. An increment in the histopathological diagnosis of meningococcal meningitis was occurred, by using MoAb specific for antigens from *N. meningitidis* serogroups, serotypes and subtypes, mainly in those cases without microorganisms confirmation by biomolecular techniques as PCR. The results obtained in these first tests proved to be promising, and two MoAb showed excellent results. No cross-reactivity with viral meningitis, *S. pneumoniae*, *Rickettsia* or Rubella was detected. For the further studies, it is fundamental to increase the samples size, including samples from patients with meningococcal meningitis and from individuals infected with other pathogens.

**Keywords.** *Neisseria meningitidis*, monoclonal antibodies, immunohistochemistry.

## INTRODUÇÃO

Anticorpos são conhecidos como proteínas que reconhecem antígenos de maneira específica e com alto grau de afinidade. Os anticorpos monoclonais (AcMo) surgiram da descoberta do direcionamento a um epítipo específico do antígeno, gerados em laboratório para reconhecer e se ligar a qualquer antígeno de interesse. Este método foi descrito por Georges Köhler e César Milstein e publicado em 1975<sup>1</sup>.

Em decorrência de sua alta especificidade e sensibilidade, as produções dos AcMo são de extrema importância na área médica, sendo uma grande inovação para a indústria biotecnológica, uma vez que estes têm sido desenvolvidos para alvos específicos<sup>2</sup>.

Apesar de os anticorpos monoclonais serem utilizados na terapêutica médica e em investigações epidemiológicas, estes produtos têm sido muito úteis na área diagnóstica em diferentes circunstâncias<sup>2</sup>.

As meningites bacterianas, principalmente as causadas pela bactéria *Neisseria meningitidis*, são exclusivas da raça humana e podem ser isoladas do material coletada de nasofaringe de um portador ou, até mesmo, desenvolver para sua forma mais grave denominada de meningococemia, resultante de quadros de septicemia fulminante com evolução fatal em poucas horas. As meningites constituem um problema global sério à saúde, que causam letalidade em níveis elevados nos países em desenvolvimento<sup>3</sup>.

Desde 1996 o Laboratório de Anticorpos Monoclonais Antígenos e Adjuvantes do Centro de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL) tem desenvolvido trabalho na caracterização antigênica de cepas de *Neisseria meningitidis* empregando-se painel de AcMo pré-estabelecidos; outrossim, novos AcMo têm sido produzidos para efetuar a caracterização de perfis desconhecidos. Os AcMo foram obtidos durante as diferentes fusões realizadas no laboratório utilizando-se células esplênicas e linfonodos poplíteos<sup>4-6</sup>.

O Núcleo de Anatomia Patológica do Instituto Adolfo Lutz (NAP-IAL) realiza a técnica de imuno-histoquímica (IHQ), em sua rotina laboratorial, para o diagnóstico de doenças

neoplásicas e infecto-contagiosas; e é atualmente a referência regional e nacional para o diagnóstico de diferentes agentes infecciosos. Com o auxílio dos profissionais desse Núcleo, os AcMo desenvolvidos foram testados por meio de técnica de IHQ para avaliar suas características como marcadores diferenciais no diagnóstico de meningites bacterianas e virais<sup>7,8</sup>.

## MATERIAL E MÉTODOS

O presente projeto foi aprovado pela Plataforma Brasil em 15 de Julho de 2014 conforme C.A.A.E: 22581214.9.0000.0059. Foi também aprovado pelo Conselho Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz (CTC-IAL) em 25 de Junho de 2013, pelo número de identificação CTC17 E/2013.

### Obtenção de Anticorpos monoclonais

Os AcMo utilizados foram obtidos a partir da imunização de camundongos BALB/c com preparados de antígenos de membrana externa de *N. meningitidis* B. As metodologias de produção, de purificação e de caracterização dos anticorpos monoclonais empregadas na presente análise foram descritos em trabalhos anteriormente desenvolvidos e publicados pelos autores do presente estudo<sup>4,5,6,9,10</sup>.

### Especificidade dos anticorpos monoclonais

Os anticorpos monoclonais obtidos estão em fase de patente no Núcleo de Inovação Tecnológica (NIT) do IAL. A especificidade dos anticorpos usados é referente ao antígeno de membrana externa de *N. meningitidis*. Para a padronização, o anticorpo NM (sobrenadante de cultura de células) e o NL (ascite) foram empregados em diferentes diluições para realizar a padronização da técnica de IHQ. O anticorpo monoclonal NM foi utilizado na diluição 1/5 e o anticorpo monoclonal NL na diluição 1/2000, e as respectivas diluições apresentaram boa especificidade<sup>9,10</sup> na metodologia testada.

### Imuno-histoquímica

Dez amostras de tecido de cérebro foram fixadas em formol e partes desses órgãos foram

inseridos em bloco de parafina. Destas amostras em análise, quatro foram coletadas de pacientes infectados com *Neisseria meningitidis* confirmado por PCR; uma amostra de paciente com febre maculosa - *Rickettsia rickettsii* confirmado pela IHQ; quatro de indivíduos infectados por *Streptococcus pneumoniae* confirmado por PCR; e uma amostra foi obtida de paciente com rubéola confirmada pela IHQ. Os espécimes em análise foram selecionados e coletados de óbitos de pacientes encaminhados pelos Serviços de Vigilância Epidemiológica e recebidos pelo NAP-IAL.

Em estudo preliminarmente realizado, foram utilizados anticorpos monoclonais e policlonais para febre maculosa (*Rickettsia rickettsii*), rubéola e *N. meningitidis*, cujas especificações estão descritas na **Tabela 1**.

Na análise destes anticorpos, os reagentes utilizados foram os seguintes: *kit* Polímero conjugado a peroxidase (Picture Max HRP Polymer Conjugate Broad Spectrum DAB) da Life Technologies® e o *kit* Polímero conjugado a fosfatase alcalina (Hiddef) da Cell Marque.

As amostras foram submetidas à microtomia para obtenção de cortes histológicos, os quais foram submetidos à coloração por hematoxilina e

eosina (HE)<sup>11</sup>.

Na execução de ensaios de IHQ foi empregado o protocolo da reação, constituído de seguintes etapas: desparafinização das lâminas contendo cortes histológicos em dois banhos de xilol; re-hidratação dos cortes histológicos em banhos de álcool em diferentes concentrações e em banhos de água corrente e destilada; recuperação antigênica com a adição de digestão enzimática (proteínase K, Sigma) na concentração de 0,1 mg/mL; lavagens em água corrente, água destilada e solução salina tamponada com fosfatos (PBS 10mM, pH 7,4); adição de anticorpo primário (anticorpo policlonal ou monoclonal) em diluição previamente determinada; incubação a 4 °C em câmara úmida durante ±18 horas; lavagens de lâminas com PBS; incubação com reagente amplificador (polímeros conjugados com anti-imunoglobulinas de camundongo e enzima fosfatase alcalina), a 37 °C em câmara úmida durante 30 minutos; lavagens em PBS; etapa de revelação da reação enzimática com o substrato cromogênico Naftol-Fast Red (em que a reação positiva é visualizada pela coloração vermelha); etapa de contra-coloração com hematoxilina e montagem dos cortes histológicos com lamínula para realizar o exame microscópico.

**Tabela 1.** Anticorpos utilizados na reação de IHQ: anticorpo para febre maculosa (*Rickettsia rickettsii*), rubéola e meningite (*Neisseria meningitidis*); suas origens, espécies de animais inoculados para produção de anticorpos específicos e as respectivas diluições utilizadas na técnica de IHQ

Anticorpo	Origem	Código do Produto	Tipo	Título
Anti-Rickettsia	CDC – Atlanta EUA	Lote: ab#70	Policlonal - Coelho	1/30.000
Anti-Rubéola / E1 Clone: E1-20	Millipore	Lote: 19572223	Monoclonal- Camundongo	1/100
Anti- <i>N. meningitidis</i>	Serviço de Microbiologia e Imunologia – Divisão Biologia Médica do Insituito Adolfo Lutz	Lote: 41	Policlonal - Cabra	1/10.000

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tradicionalmente, o diagnóstico laboratorial de meningite meningocócica é feito por meio de cultivo de amostra de sangue ou de líquido cefalorraquidiano em meios de cultura específicos, com a finalidade de detectar a presença de *N. meningitidis*. Contudo, este método apresenta menor sensibilidade quando é realizado em amostra coletada na fase após o tratamento com antimicrobianos.

Por conseguinte, métodos alternativos para o diagnóstico de meningite meningocócica, como o PCR – Reação em cadeia de polimerase foram introduzidos no Centro de Imunologia do IAL<sup>12</sup>, realizando-se também a detecção de antígeno específico por meio de técnicas de aglutinação anteriormente implantadas.

A técnica de IHQ para *N. meningitidis* foi desenvolvida nos Estados Unidos, conforme descrito por Guarner et al<sup>13</sup>. Estes autores mencionam a correlação entre o ensaio de IHQ e a técnica de real-time PCR, pois a primeira reação possibilita a detecção das bactérias, e o segundo teste proporciona melhor compreensão da infecção meningocócica. Ademais, os autores desse trabalho abordam também a correlação entre os anticorpos policlonais e monoclonais de sorogrupo específico, utilizando-se a técnica de IHQ. Outrossim, o

protocolo da técnica de IHQ utilizado pelos pesquisadores acima citados apresenta grande semelhança ao utilizado no Instituto Adolfo Lutz.

Para averiguar se seria válida sua implantação, a técnica de IHQ foi realizada seguindo-se o protocolo pré-estabelecido analisando-se 10 amostras de pacientes selecionados pelo Núcleo de Anatomia Patológica. Neste estudo foram utilizados dois anticorpos monoclonais, NM e NL, e anticorpo policlonal anti-*N. meningitidis*. Os resultados desta análise estão descritos na **Tabela 2**.

Na análise de amostras provenientes de pacientes infectados por *N. meningitidis*, a ocorrência dos meningococos pode ser visualizada pela marcação nas lâminas em análise por meio de cromógeno Naftol-Fast Red, em que o resultado positivo é evidenciado pela coloração vermelha.

A **Tabela 2** aponta a positividade dos dois anticorpos monoclonais NM e NL na reação de IHQ, vista em ambas as lâminas, e as reatividades positivas foram obtidas com os anticorpos policlonais anti-*N. meningitidis*.

Resultados negativos foram detectados em amostras coletadas de pacientes com *S. pneumoniae*, quando estas foram testadas com os dois anticorpos monoclonais e com o anticorpo policlonal anti-*N. meningitidis*.

**Tabela 2.** Avaliação da metodologia de PCR, dos anticorpos monoclonais (NL e NM) e dos anticorpos policlonais para os diferentes patógenos na análise de amostras de cérebro de óbitos enviadas ao Núcleo de Anatomia Patológica do Instituto Adolfo Lutz

	n.IHQ	PCR	NM	NL	Obs.
1	E43.929	Men C	+	+	IHQ Men poly +
2	E44.423	Men B	+	+	IHQ Men poly +
3	E44.858	Men C	+	+	IHQ Men poly +
4	E45.462	Men C	+	+	IHQ Men poly +
5	E45.808	Men C; Rickettsia	neg	neg	IHQ Men poly neg; IHQ Rickettsia sp poly +
6	E44.430	Strepto	neg	neg	IHQ Men poly neg
7	E44.436	Strepto	neg	neg	IHQ Men poly neg
8	E45.411	Strepto	neg	neg	IHQ Men poly neg
9	E45.459	Strepto	neg	neg	IHQ Men poly neg
10	E37.861	Rubéola	neg	Neg	IHQ Rubéola positivo

n.IHQ – número de identificação - Laboratório de Imuno-histoquímica; PCR – reação em cadeia da polimerase; NM e NL – anticorpos monoclonais; Men – anticorpo policlonal para *Neisseria meningitidis* sorogrupo específico; Strepto – *Streptococcus pneumoniae*; poly = policlonal; + = resultado positivo; neg = resultado negativo



Nos testes realizados em lâmina de *Rickettsia rickettsii*, o anticorpo policlonal anti - *Rickettsia* demonstrou resultado positivo. No entanto, as reações foram negativas quando estas lâminas foram expostas ao anticorpo policlonal anti-*N. meningitidis* e aos anticorpos monoclonais NM e NL, como mostradas na **Tabela 2**. O mesmo perfil de reatividade foi observado no teste realizado com rubéola. O ensaio apresentou o resultado positivo, quando a amostra foi testada com o anticorpo policlonal específico, porém os ensaios feitos com os dois anticorpos monoclonais foram negativos.

Estes resultados preliminares indicaram que os dois anticorpos monoclonais anti-*N. meningitidis* demonstraram excelentes resultados. Não houve reatividade cruzada com meningite viral, *S. pneumoniae*, *Rickettsia* ou rubéola.

Na literatura há citações em que as diferenças entre as duas categorias de anticorpos estão bem caracterizadas. O anticorpo policlonal é reconhecido pelos múltiplos epítomos de um mesmo antígeno, enquanto o anticorpo monoclonal exibe reatividade exclusiva para um único epítomo do produto antigênico, o que resulta em alta especificidade e afinidade. Por conseguinte, os anticorpos monoclonais produzidos no presente estudo, mostraram resultados promissores na reação de IHQ, quando comparados ao anticorpo policlonal.

A técnica de IHQ apresenta vantagens por ser um ensaio rápido, e é adequada para ser empregada em trabalhos de rotina diagnóstica, em situações em que há suspeita de doença meningocócica, principalmente na análise de amostras *post-mortem* de cérebros ou de órgão suprarrenal e, ainda, como subsídio em estudos retrospectivos.

As técnicas de IHQ possibilitam a detecção das bactérias e de seus antígenos, com a vantagem de preservar as características morfológicas do tecido. Este fato propicia o desenvolvimento de estudos sobre os mecanismos patogênicos em amostras de tecidos humanos, cujos dados auxiliam na validação dos achados observados em estudos *in vitro*. No caso da bactéria *N. meningitidis*, reservatório natural nos tecidos humanos, esta técnica é utilizada para melhor compreender a doença meningocócica<sup>14</sup>.

A técnica de IHQ, empregada na análise de amostras de tecido fixadas em formol e inseridas em blocos de parafina, apresenta várias vantagens: (i) como ferramenta diagnóstica específica de infecção por *N meningitidis*; (ii) preservação das características morfológicas do tecido em análise, o que possibilita a localização dos meningococos em células específicas; (iii) fornecimento de registro permanente da amostra biológica específica preservada em bloco de parafina e em forma de cortes histológicos fixados em lâminas, bem como por representar risco biológico mínimo para os profissionais de laboratório que manuseiam esse tipo de material<sup>11</sup>.

Executar a padronização da técnica de IHQ para diagnóstico de *N. meningitidis* com o emprego de anticorpos monoclonais de reatividade cruzada entre os diferentes sorogrupos, sorotipos e subtipos desta bactéria foi o objetivo deste estudo com o intuito de estabelecer um protocolo para ser validado e implantado. O laboratório do NAP - Centro de Patologia do IAL realizou o ensaio de IHQ para avaliar a sensibilidade, especificidade e demais propriedades de dois anticorpos monoclonais anti-*N. meningitidis* desenvolvidos no Laboratório de Anticorpos Monoclonais Antígenos e Adjuvantes - Centro de Imunologia-IAL. Os dois anticorpos monoclonais foram aplicados em cortes histológicos de amostras *post-mortem* de cérebro de paciente com meningite meningocócica, meningite de etiologia viral e em tecido cerebral sem alterações patológicas. A reatividade positiva foi detectada somente nas amostras de cérebro de pacientes com diagnóstico de meningite meningocócica confirmado pela técnica de PCR.

A metodologia de real-time PCR (RT-PCR) foi introduzida na rotina do Centro de Imunologia do IAL no ano de 2011, após sua validação para diagnosticar bactérias causadoras de meningite: *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*. Nesse trabalho de validação, foi demonstrada alta sensibilidade e especificidade da metodologia, quando o PCR foi feito na amostra de líquido cefalorraquidiano, e quando o resultado obtido foi comparado com a cultura em meio específico cujo resultado foi negativo. A sensibilidade observada para as

bactérias *N. meningitidis* e *S. pneumoniae* foi alta, em torno de 90 %. Por conseguinte, o uso de técnica de RT-PCR para o diagnóstico de bactérias meningocócicas foi incorporado ao serviço de saúde pública e para ser utilizado como teste laboratorial alternativo ou mesmo de referência para comparar ou confirmar os resultados obtidos no ensaio de IHQ<sup>12</sup>.

Na execução do presente estudo, foi feito o levantamento epidemiológico de amostras de óbito, que foram encaminhadas para análise no Núcleo de Anatomia Patológica do IAL, no período de 2009 a 2015, correlacionando-se os dados contidos nos respectivos boletins médicos: idade, localização, suspeita clínica e resultado do diagnóstico histopatológico.

Concluída a padronização dos ensaios acima citados, planeja-se o estabelecimento de um protocolo de técnica de IHQ para efetuar a pesquisa de antígenos de *N. meningitidis*. O propósito desse estudo é de incrementar o diagnóstico histopatológico da meningite meningocócica, sobretudo em situações em que não há confirmação da presença do agente etiológico por meio de técnicas biomoleculares, como PCR, empregando-se anticorpos monoclonais específicos para antígenos presentes em diferentes sorogrupos, sorotipos e subtipos de *N. meningitidis*.

Outrossim, posteriores estudos serão conduzidos para analisar número significativo de amostras, com o intuito de efetuar a validação dos anticorpos monoclonais anti-*N. meningitidis* produzidos.

## CONCLUSÃO

O resultado obtido nos primeiros testes realizados no presente trabalho mostrou-se muito promissor, contudo será dada continuidade a este estudo ampliando-se o número de amostras biológicas coletadas de pacientes com meningites meningocócicas e com outras patologias. Ademais, a metodologia com o uso dos dois anticorpos monoclonais produzidos no Centro de Imunologia – IAL está atualmente em fase de validação no Núcleo de Anatomia Patológica – IAL.

---

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Núcleo de Anatomia Patológica do Instituto Adolfo Lutz, em especial à Dra Sonia Maria Pereira de Oliveira, diretora do Centro de Patologia e à Dra Maria Lucia Utagawa, diretora do Núcleo de Anatomia Patológica, pelo apoio ao nosso estudo. À Dra Rosecelis Araújo Brasil, médica Patologista, pelo apoio técnico científico na aplicação da técnica de imuno-histoquímica no trabalho. A Júlia de Carvalho e a Silvana de Mello Pereira da Silva do Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz, pelos apoios técnicos ao projeto. A CAPES pela bolsa de estudos oferecida à aluna do Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia.

---

## FINANCIAMENTO DA PESQUISA

Este trabalho foi financiado pelo Instituto Adolfo Lutz e teve o apoio parcial da FAPESP Processo 12/15568-0. O trabalho faz parte da tese de Mestrado da aluna Thaís Regina Brienza Lataro, vinculada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, sob orientação da Profa. Dra. Elizabeth Natal De Gaspari.

## REFERÊNCIAS

1. Köhler G, Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975;256:495-7.
2. Cordeiro MLS, Silva NLF, Vaz MRF, Nóbrega FFF. Anticorpos monoclonais: implicações terapêuticas no câncer. *Rev Saúde Ciência On line*. 2014;3(3):252-2.
3. Harrison LH, Trotter CL, Ramsay ME. Global epidemiology of meningococcal disease. *Vaccine*. 2009;27 Suppl 2:B51-63.[DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.04.063].

4. De Gaspari E, Zollinger W. Expression of class 5 antigens by meningococcal strains obtained from patients in Brazil and evaluation of two new monoclonal antibodies. *Braz J Infect Dis*. 2001;5(3):143-53. [DOI: 10.1590/S1413-86702001000300007].
5. Belo EF, Ferraz AS, Coutinho LM, Oliveira AP, Carmo AM, Tunes CF, et al. Production of monoclonal antibodies against *Neisseria meningitidis* using popliteal lymph nodes and in vivo/in vitro immunization: prevalence study of new monoclonal antibodies in greater São Paulo, Brazil. *Hybridoma*. 2007;26(5):302-10. [DOI: 10.1089/hyb.2007.0508].
6. Belo EF, Coutinho LM, Ferraz AS, De Gaspari EN. Production of monoclonal antibody to subtype 9 of *Neisseria meningitidis* and the distribution of this subtype in Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2004;8(6):407-18. [DOI: 10.1590/S1413-86702004000600004].
7. Jay JI, Brunhoeber PS, Smith MH, Williams RR, Sugarman MC, Free HL, et al. Immunohistochemical analysis of the monoclonal antibody 4B5 in breast tissue expressing human epidermal growth factor receptor 4 (HER4). *Histopathol*. 2013;62(4):563-77. [DOI: 10.1111/his.12024].
8. Böger C, Kalthoff H, Goodman SL, Röcken C. Validation and comparison of anti- $\alpha v \beta 3$  and anti- $\alpha v \beta 5$  rabbit monoclonal versus murine monoclonal antibodies in four different tumor entities. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2013;21(6):553-60. [DOI: 10.1097/PAI.0b013e318284a03a].
9. Chaves LB, Achkar SM, Silva Ade C, Caporale GM, Cruz PS, Batista AM, et al. Monoclonal antibodies for characterization of rabies virus isolated from non-hematophagous bats in Brazil. *J Infect Dev Ctries*. 2015;9(11):1238-49. [DOI: 10.3855/jidc.6959].
10. Ferraz AS, Belo EF, Coutinho LM, Oliveira AP, Carmo AM, Franco DL, et al. Storage and stability of IgG and IgM monoclonal antibodies dried on filter paper and utility in *Neisseria meningitidis* serotyping by Dot-blot ELISA. *BMC Infect Dis*. 2008;8:30. [DOI: 10.1186/1471-2334-8-30].
11. Alves VAF. Garantia de qualidade em imuno-histoquímica. Manual de Imuno-histoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia. 1999, 1-9.
12. Sacchi CT, Fukasawa LO, Gonçalves MG, Salgado MM, Shutt KA, Carvalhanas TR, et al. Incorporation of real-time PCR into routine public health surveillance of Culture Negative Bacterial Meningitidis in São Paulo, Brazil. *PLoS One*. 2011;6(6):e20675. [DOI: 10.1371/journal.pone.0020675].
13. Guarner J, Greer PW, Whitney A, Shieh WJ, Fischer M, White EH, et al. Pathogenesis and Diagnosis of Human Meningococcal Disease Using Immunohistochemical and PCR Assays. *Am J Clin Pathol*. 2004;122(5):754-64. [DOI: 10.1309/3489075U03LMK9AE].
14. Rosenstein NE, Perkins BA, Stephens DS, Popovic T, Hughes JM. Meningococcal Disease. *N Engl J Med*. 2001;344(18):1378-88. [DOI:10.1056/NEJM200105033441807].



# Identificação de *Cronobacter* spp. em queijos e perfil de suscetibilidade antimicrobiana

## Identification of *Cronobacter* spp. in cheeses and the antimicrobial susceptibility profile

RIALA6/1697

Marcelo Luiz Lima BRANDÃO\*, Gisele Olivieri Soares MEIER, Carla Trece CARVALHO, Débora Alves Ferreira da SILVA, Natália Scudeller UMEDA, Valéria de Mello MEDEIROS, Carla de Oliveira ROSAS, Sílvia Maria dos Reis LOPES

\*Endereço para correspondência: Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Saneantes, Setor de Alimentos, Departamento de Microbiologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Av. Brasil, 4365. Mangueiras, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, CEP: 21040-900. Tel: 21 3865 5161. E-mail: marcelollb8@gmail.com

Recebido: 22.01.2016 - Aceito para publicação: 15.05.2016

### RESUMO

*Cronobacter* spp. é um patógeno oportunista que pode causar infecções em indivíduos de qualquer idade, cuja incidência é maior em neonatos, pacientes imunocomprometidos e idosos. Neste estudo *Cronobacter* spp. foi pesquisado em 90 amostras de queijos (30 do tipo Minas Frescal, 30 do tipo Prato e 30 do tipo Prato fatiado). As espécies isoladas foram identificadas, e foi avaliado o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos. A pesquisa foi realizada utilizando-se pré-enriquecimento em água peptonada tamponada, enriquecimento seletivo no caldo lauril sulfato triptose contendo vancomicina, isolamento no meio *Enterobacter sakazakii* Isolation Agar e identificação no Vitek 2.0. As espécies foram identificadas por meio de múltipla PCR com alvo no gene *cgcA*. O antibiograma foi realizado pela técnica de difusão em ágar (Kirby-Bauer). *Cronobacter* spp. foi isolada em uma (1,1 %) amostra de queijo tipo Minas Frescal, identificada como *C. sakazakii* que apresentou sensibilidade a todos os antimicrobianos testados. *Cronobacter* spp. pode não representar risco à saúde dos indivíduos pelo consumo de queijos produzidos com leite pasteurizado. Entretanto, a presença de *Cronobacter* spp. em uma amostra de queijo demonstra falhas na produção, o que reforça a necessidade de maior adesão às Boas Práticas de Fabricação.

**Palavras-chave.** *Cronobacter*, queijo, PCR, antibiograma.

### ABSTRACT

*Cronobacter* spp. is an opportunistic pathogen that may cause infections in individuals of any age, and the highest incidence occurs in neonates, immunocompromised patients and elderly persons. This study investigated *Cronobacter* spp. occurrence in 90 cheese samples (30 "Minas Frescal" type cheeses, 30 "Prato" type and 30 sliced "Prato" type). The isolated species were identified and the antimicrobial susceptibility profile of the isolated strains was evaluated. The microbiological assay was performed with pre-enrichment in buffered peptone water, and selective-enrichment in modified lauryl sulphate tryptose broth containing vancomycin. Isolation and identification were done in *Enterobacter sakazakii* Isolation Agar and in Vitek 2.0, respectively. The species identification was performed by multiple PCR targeting *cgcA* gene. Antibiogram was done using agar diffusion method (Kirby-Bauer). *Cronobacter* spp. was isolated from one (1.1 %) sample of "Minas Frescal" type cheese, identified as *C. sakazakii* which was sensitive to all of tested antimicrobials. *Cronobacter* spp. does not represent a risk to the individuals health by consuming cheeses made from pasteurized milk. However, the presence of *Cronobacter* spp. in one sample of analyzed cheese indicates failures in their production, reinforcing the need for following the Good Manufacturing Practices.

**Keywords.** *Cronobacter*, cheese, PCR, antibiogram.

## INTRODUÇÃO

*Cronobacter* spp. é um patógeno oportunista que pode causar infecções em indivíduos de qualquer idade, sendo neonatos, imunocomprometidos e idosos os grupos com maior incidência<sup>1</sup>. Surto causados por *Cronobacter* spp. já foram reportados em diversos países<sup>1,2</sup>, incluindo o Brasil<sup>3</sup>.

Fórmulas infantis desidratadas já foram epidemiologicamente identificadas como veículos de contaminação em casos de infecções por *Cronobacter* spp. em neonatos, levando a quadros graves como bacteremia e meningite<sup>2,3</sup>. Em idosos e adultos imunocomprometidos não há relatos de casos de meningite, mas já foram descritos outros tipos de síndromes clínicas como: infecções urinárias, pneumonia e bacteremia<sup>1</sup>. *Cronobacter* spp. já foi isolado de uma grande diversidade de produtos alimentícios<sup>4,6</sup>, incluindo alimentos prontos para o consumo como queijos<sup>7</sup>, que são frequentemente recomendados em dietas como fonte de proteínas e de outros nutrientes<sup>8,9</sup>.

Planzer et al.<sup>8</sup> realizaram uma pesquisa no Estado do Rio de Janeiro (RJ) sobre as práticas e hábitos de consumo de queijos e observaram que o queijo Minas Frescal (QMF) e o queijo Prato (QP) eram alguns dos tipos de queijo mais consumidos. Dados da pesquisa também mostraram que a frequência do consumo de queijos em mais da metade dos entrevistados era diária<sup>8</sup>. Logo, a qualidade microbiológica destes queijos é de grande importância tendo em vista o grande consumo que eles possuem. Quando não produzidos seguindo os padrões de higiene, estes produtos podem oferecer riscos aos consumidores devido à presença de patógenos<sup>9</sup>. Logo, a contaminação destes produtos por *Cronobacter* spp. pode representar um risco para estes indivíduos.

Tendo em vista a indicação de que os alimentos possam atuar como veículo de contaminação em casos de infecções por *Cronobacter* spp. em idosos e indivíduos imunocomprometidos, os objetivos deste estudo foram pesquisar a ocorrência de *Cronobacter* spp. em queijos de acordo com a metodologia

ISO 22964:2006<sup>10</sup> com alterações, identificar as espécies e avaliar o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos dos isolados.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras

No período de maio a novembro de 2015 foram analisadas 90 amostras de queijos de 34 marcas distintas. As amostras foram coletadas de forma aleatória e adquiridas em embalagens primárias sob a forma íntegra ou fracionada em diferentes estabelecimentos comerciais (supermercados, padarias, mercearias, entre outros) localizados em dois municípios: Rio de Janeiro-RJ e Niterói-RJ. A escolha das marcas foi de acordo com a disponibilidade no comércio durante o período de análises. Deste total, 30 amostras eram de queijo Minas Frescal (QMF), 30 de queijo Prato (QP) e 30 de queijo Prato fatiado (QPF) que foram mantidas refrigeradas (2-8 °C) até o momento das análises.

### Análise microbiológica

A pesquisa de *Cronobacter* spp. foi realizada de acordo com a metodologia ISO 22964:2006<sup>10</sup> com alterações. Vinte e cinco gramas da amostra foram pesados em um saco plástico *Whirl-Pak* (Nasco, EUA), seguido da adição de 225 mL de água peptonada tamponada (Merck, Alemanha) e homogeneização em *Stomacher* durante sessenta segundos. Após incubação a 35 °C/24 h, uma alíquota de 0,1 mL foi adicionada a 10 mL de caldo lauril sulfato triptose contendo vancomicina (mLST/v; Oxoid, Inglaterra) com incubação a 42 °C/24 h. Posteriormente, as amostras foram semeadas por superfície em *Enterobacter sakazakii Isolation Agar* (ESIA; AES-Chemunex, França) e as placas incubadas a 42 °C/24 h. Optou por se utilizar a temperatura de incubação de 42 °C, ao invés de 44 °C que é a preconizada na metodologia ISO 22964:2006<sup>10</sup>, com o objetivo de recuperar cepas termossensíveis, pois já existem relatos na literatura de cepas de *Cronobacter* spp. que não crescem a 44 °C<sup>4,11,12</sup>. As colônias características foram isoladas em ágar nutriente (BD, EUA) e submetidas à confirmação no sistema Vitek 2.0

(bioMérieux, França), de acordo com as instruções do fabricante.

As cepas de *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544 (INCQS 00578) e de *Escherichia coli* ATCC 25922 (INCQS 00033) foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente, dos meios de cultivo utilizados nas análises microbiológicas.

### Identificação das espécies

A identificação das espécies de *Cronobacter* foi realizada por múltipla reação em cadeia pela polimerase (M-PCR) com alvo no gene *cgcA*<sup>13</sup>. Foram utilizadas salas segregadas para extração de ácido desoxirribonucleico (DNA), preparo das reações, amplificação do DNA e eletroforese, de forma a evitar contaminação cruzada das amostras.

A extração de DNA foi realizada com o kit *Dnasy Blood & Tissue* (Qiagen, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de DNA foi dosada em espectrofotômetro NanoDrop-2000c (ThermoScientific, EUA). As reações foram preparadas em um volume total de 25 µL contendo: 5 µL de DNA molde (20-60 ng/µl), 5,0 pmol de cada iniciador e *PCR MasterMix* 1X (ThermoScientific, EUA). A amplificação foi realizada no *Simpli Amp Thermal Cycler* (Applied Biosystems, Singapore).

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5 % a 100 V/ 50 min. Após, o gel foi corado em solução de brometo de etídio 0,5 µg/mL (Sigma, EUA) por 15 min e visualizado em analisador de imagens (GE-Healthcare, Inglaterra).

Água livre de DNase/RNase (BioBasic, Canadá) foi utilizada como controle negativo em cada reação. O DNA extraído das cepas de referência *C. sakazakii* ATCC 29544 (INCQS 00578), *Cronobacter malonaticus* LMG 23826 (INCQS 00619), *Cronobacter turicensis* LMG 23827 (INCQS 00615), *Cronobacter muytjensii* ATCC 51329 (INCQS 00579), *Cronobacter dublinensis* LMG 23823 (INCQS 00618) e *Cronobacter universalis* NCTC 9529 (INCQS 00599) foi utilizado como controle positivo.

### Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos foi avaliado pelo método de difusão (Kirby-Bauer) em ágar Mueller-Hinton (Oxoid, Inglaterra) seguindo os critérios do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015)<sup>14</sup>. Foram testados os antimicrobianos (BIO-RAD Laboratories Inc, França) recomendados para avaliação de isolados da família *Enterobacteriaceae*, nas seguintes concentrações: ampicilina (AMP; 10 µg), piperacilina-tazobactam (PPT; 100/10 µg), ampicilina-sulbactam (SAM; 10/10 µg), amoxicilina-clavulanato (AMC; 20/10 µg), ceftriaxona (CRO; 30 µg), aztreonam (ATM; 30 µg), meropenem (MER; 10 µg), gentamicina (GEN; 10 µg), tetraciclina (TE; 30 µg), ciprofloxacina (CIP; 5 µg), sulfametoxazol-trimetoprima (SXT; 1,25/23,75 µg), ácido nalidíxico (NAL; 30 µg) e nitrofurantoína (NIT; 300 µg). O diâmetro da zona de inibição foi mensurado e os isolados foram classificados como sensível, intermediário ou resistente de acordo com as recomendações do CLSI<sup>14</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

*Cronobacter* spp. foi detectado em uma (1,1 %) das 90 amostras analisadas, sendo esta uma amostra de QMF. O isolamento de *Cronobacter* spp. em queijos já foi reportado anteriormente em outros países, também com baixa ocorrência. El-Sharoud et al<sup>7</sup> pesquisaram *Cronobacter* spp. em 40 amostras de queijos distintos comercializados no Egito, e isolaram a bactéria em quatro amostras (10,0 %), sendo todas de queijos frescos tipo Domiatti. Molloy et al<sup>4</sup> analisaram 20 amostras de queijos não pasteurizados e Mozrová et al<sup>6</sup> analisaram 15 amostras de queijo e não detectaram *Cronobacter* spp. Sing et al<sup>5</sup> analisaram 23 amostras de produtos lácteos, incluindo sete amostras de leite cru, nove de leite pasteurizado, cinco de coalhada e duas de iogurte e somente isolaram o microrganismo de duas amostras de leite cru.

De acordo com a revisão na literatura realizada por Osaili e Forsythe<sup>15</sup>, bactérias do gênero *Cronobacter* não sobrevivem a tratamentos térmicos similares ao de pasteurização. A presença de *Cronobacter* spp. em leite cru indica que queijos produzidos a partir desse leite podem apresentar maior risco de contaminação pelo patógeno no produto final.

Neste estudo, a amostra de QMF que apresentou contaminação por *Cronobacter* spp. possui Selo de Inspeção Federal (S.I.F.) e, de acordo com o rótulo, foi produzida com leite pasteurizado. Isso sugere que a contaminação pode ter ocorrido caso a pasteurização do leite não tenha sido eficiente ou que a contaminação tenha ocorrido em etapas após o tratamento térmico. *Cronobacter* spp. já foi isolado de amostras ambientais como água, solo e poeira<sup>5</sup>, indicando que o microrganismo também pode estar presente em ambientes de produção.

Nenhuma amostra de QP e QPF apresentou contaminação por *Cronobacter* spp. Estes resultados devem estar associados ao fato de que o QP também é produzido com leite pasteurizado e a massa é submetida a uma etapa de cozimento<sup>9</sup> o que reduz as chances de recontaminação até essa fase.

No Brasil, Platte<sup>16</sup> analisou 30 amostras de QMF comercializados no município de Niterói/RJ e relatou o isolamento de *Cronobacter* spp. em 13 (43,3 %) amostras. Contudo, a autora utilizou na etapa de identificação a produção de pigmento amarelo e o sistema miniaturizado Bactray<sup>®</sup> I e II e, atualmente, sabe-se que a produção de pigmento amarelo e que estes kits miniaturizados não são confiáveis para identificação do gênero *Cronobacter*, uma vez que já existem relatos na literatura de resultados falso-positivos e falso-negativos com o uso destes procedimentos<sup>11,12</sup>. De acordo com Druggan e Iversen<sup>12</sup>, deve-se tomar muito cuidado com o uso de galerias comerciais de identificação bioquímica devido à baixa eficiência destes sistemas na identificação de *Cronobacter* spp., particularmente nos que a interpretação é

preditiva. Atualmente, os métodos moleculares são considerados mais confiáveis para identificação das cepas do gênero<sup>11,12</sup>.

Neste estudo, 14 amostras apresentaram colônias características no ESIA e foram submetidas ao Vitek 2.0, sendo apenas um isolado confirmado como *Cronobacter* spp. Bionúmero 0621734051222010, sendo identificado posteriormente, como *C. sakazakii* pela M-PCR. Estes resultados foram similares aos de outros estudos que também relataram maior ocorrência da espécie *C. sakazakii* em produtos alimentícios<sup>4,6,7</sup>. Por outro lado, El-Sharoud et al<sup>7</sup> identificaram a espécie *C. malonaticus* em todas as quatro amostras de queijos frescos tipo Domiatti em que isolou o patógeno.

Os isolados não confirmados como *Cronobacter* foram identificados como *Klebsiella pneumoniae* ssp *pneumoniae* e *Klebsiella pneumoniae* ssp *ozaenae* e também apresentaram atividade  $\alpha$ -glicosidase positiva no Vitek 2.0, que é o marcador responsável pela diferenciação das colônias no meio cromogênico ESIA. O isolamento de outras enterobactérias que também apresentam atividade  $\alpha$ -glicosidase já foi relatado, o que demonstra a importância do uso de técnicas confiáveis para identificação de *Cronobacter* spp. após o isolamento nos meios cromogênicos<sup>11,12</sup>.

Na avaliação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, o isolado de *C. sakazakii* foi sensível a todos os antimicrobianos testados. Resultados similares foram relatados por Molloy et al<sup>4</sup> que isolaram *Cronobacter* spp. de alimentos susceptíveis a maioria dos antimicrobianos avaliados no estudo. *C. malonaticus* isolados de queijo por El-Sharoud et al<sup>7</sup> também apresentaram sensibilidade a maioria dos antimicrobianos testados (ampicilina, sulfonamidas, furazolidona, gentamicina, espectinomicina e estreptomicina). Os autores relataram resistência apenas à neomicina e trimetoprim, contudo estes antimicrobianos não foram avaliados no presente estudo não permitindo assim uma comparação.

## CONCLUSÃO

A partir dos resultados dessa pesquisa pode-se concluir que *Cronobacter* spp. não representa risco à saúde dos consumidores por meio do consumo de queijos produzidos com leite pasteurizado. Entretanto, a ocorrência em uma amostra de queijo tipo Minas Frescal demonstra falhas na produção, reforçando a necessidade de maior adesão às Boas Práticas de Fabricação por parte dos produtores.

## AGRADECIMENTOS

Ao INCQS/Fiocruz pelo financiamento deste estudo e ao programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do INCQS/Fiocruz no qual Marcelo Brandão foi aluno de doutorado e Gisele Meier, Débora Alves e Carla Trece são Residentes. Ao CNPq por concessão de bolsa de iniciação científica a Natália Umeda (PIBIC/Fiocruz).

## REFERÊNCIAS

1. Patrick ME, Mahon BE, Greene SA, Rounds J, Cronquist A, Wymore K, et al. Incidence of *Cronobacter* spp. infections, United States, 2003-2009. *Emerg Infect Dis*. 2014;20(9):1520-3. [DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2009.140545>].
2. Food and Agricultural Organization/World Health Organization (FAO/WHO). *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in powdered follow-up formulae. Meeting Report. Microbiological Risk Assessment Genova, WHO, 2008. (15),90 p. [acesso 2015 Dez 17]. Disponível em: [[http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/MRA\\_followup.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/MRA_followup.pdf)].
3. Brandão MLL, Umeda NS, Carvalho KR, Filippis I. Investigação de um surto causado por *Cronobacter malonaticus* em um hospital maternidade em Teresina, Piauí: caracterização e tipificação por eletroforese em gel de campo pulsado. *Vigil Sanit Debate*. 2015;3(3):91-6. [DOI: <http://dx.doi.org/10.3395/2317-269x.00290>].
4. Molloy C, Cagney C, O'Brien S, Iversen C, Fanning S, Duffy G. Surveillance and characterization by pulsed-field gel electrophoresis of *Cronobacter* spp. in farming and domestic environments, food production animals and retail foods. *Int J Food Microbiol*. 2009; 136(2):198-203. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.007>].
5. Singh N, Goel G, Raghav M. Prevalence and characterization of *Cronobacter* spp. from various foods, medicinal plants, and environmental samples. *Curr Microbiol*. 2015;71 (1):31-8. [DOI: 10.1007/s00284-015-0816-8].
6. Mozrová V, Břeňová N, Mrázek J, Lukešová D, Marounek M. Surveillance and characterization of *Cronobacter* spp. in Czech retail food and environmental samples. *Folia Microbiol (Praha)*. 2014;59(1):63-8. [DOI: 10.1007/s12223-013-0266-2].
7. El-Sharoud WM, O'Brien S, Negredo C, Iversen C, Fanning S, Healy B. Characterization of *Cronobacter* recovered from dried milk and related products. *BMC Microbiol*. 2009;9:24. [DOI:10.1186/1471-2180-9-24].
8. Planzer SB Jr, da Cruz AG, Sant'ana AS, Silva R, Moura MR, de Carvalho LM. Food safety knowledge of cheese consumers. *J Food Sci*. 2009;74(1):M28-30. [DOI: 10.1111/j.1750-3841.2008.00995.x].
9. Pinto PSA, Nero LA, Germano MIS, Germano PML. Qualidade do queijo. In: Germano PML, Germano MIS, organizadores. *Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos*. Barueri: Manole; 2011.p.147-66.
10. International Organization for Standardization / International Dairy Federation – ISO/IDF. Technical specification: milk and milk products – detection of *Enterobacter sakazakii*. ISO/TS22964:2006; IDF/RM 210;2006.
11. Warnken MB, Brandao MLL, Souza AE, Romão CMCP, Nogueira ACMA, Destro MT. Phenotypic profiles and detection of target genes by PCR in isolates from different sources and reference strains, identified as *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*). *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2012;71(1):21-31.



12. Druggan P, Iversen C. Culture media for the isolation of *Cronobacter* spp. *Int J Food Microbiol*. 2009;136 (2):169-78.[ DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.09.008>].
13. Carter L, Lindsey LA, Grim CJ, Sathyamoorthy V, Jarvis KG, Gopinath G, et al. Multiplex PCR assay targeting a diguanylate cyclase-encoding gene, *cgcA*, to differentiate species within the genus *Cronobacter*. *Appl Environ Microbiol*. 2013;79 (2):734-7. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02898-12>].
14. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-Fifth Informational Supplement, Wayne, PA, USA. 2015; 35 (3):M100-S15.
15. Osaili T, Forsythe S. Desiccation resistance and persistence of *Cronobacter* species in infant formula. *Int J Food Microbiol*. 2009;136(2):214-20. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.006>].
16. Platte CS. *Cronobacter* spp. e outras bactérias patogênicas: avaliação da presença e sensibilidade antimicrobiana das estirpes isoladas em produtos lácteos [dissertação de mestrado]. Niterói (RJ): Universidade Federal Fluminense; 2014.



# Occurrence of fungi and aflatoxins B in nuts and products marketed the Brazilian northeastern regions

## Ocorrência de fungos e aflatoxinas do tipo B em castanhas e produtos comercializados no Nordeste brasileiro

RIALA6/1698

Mariana de Freitas MOREIRA<sup>1</sup>, Tatiane Rodrigues de OLIVEIRA<sup>1</sup>, Ícaro Gusmão Pinto VIEIRA<sup>2</sup>, Francisco das Chagas Oliveira FREIRE<sup>3</sup>, Sabrina César da SILVA<sup>1</sup>, Luzara de Matos RIBEIRO<sup>2</sup>, Maria Izabel Florindo GUEDES<sup>1\*</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Laboratório de Bioquímica Humana, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual do Ceará – UECE. Campus do Itaperi, Bloco D, Av. Paranjana 1700, Fortaleza, CE, Brasil, CEP: 60780-094. Tel: 85 3101 9822. E-mail: florinfg@uol.com.br

<sup>2</sup>Parque de Desenvolvimento Tecnológico – PADETEC, Universidade Federal do Ceará – UFC

<sup>3</sup>Embrapa Agroindústria Tropical

Recebido: 12.05.2015 - Aceito para publicação: 25.11.2015

### ABSTRACT

Aflatoxin contamination has been considered as a public health problem, especially in tropical countries, including Brazil. In order to investigate the presence of type B aflatoxins in products marketed in the city of Fortaleza, 23 samples were analyzed by thin layer chromatography. Visible fungal contamination in food was identified according to their macroscopic and microscopic features. The contamination by aflatoxins was detected in 8.7 % of 23 analyzed samples, and 12.5 % of Brazilian nuts samples were positive for AFB1 (<8 µg/kg) and for AFB2 in a contamination rate above the allowed value (16 µg/kg). Among the peanut samples, 33.3 % were positive to AFB1 and AFB2, also in a contamination rate (317.1 µg/kg) which was higher than that recommended by ANVISA. The isolation and morphological characteristics of fungi detected mainly in Brazilian nuts with peel showed the occurrence of the following species: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Mucor* sp, *Cladosporium sphaerospermum*, *Cladosporium cladosporoides*, *Fusarium* sp, *Aspergillus terreus* and bacteria of *Actinomycetes* phylum. These findings indicate that it is needed to apply the mostly effective quality monitoring of food available to consumers.

**Keywords.** Brazil nuts, peanuts, aflatoxins, chromatography, thin layer.

### RESUMO

A contaminação por aflatoxinas tem sido considerada um problema de saúde pública principalmente em países tropicais, incluindo o Brasil. Com o intuito de investigar a presença de aflatoxinas do tipo B em produtos comercializados na cidade de Fortaleza, 23 amostras foram analisadas por meio de cromatografia em camada delgada. Os fungos visivelmente presentes em alimentos foram identificados de acordo com suas características macroscópicas e microscópicas. A contaminação por aflatoxina foi detectada em 8,7 % das 23 amostras analisadas; e 12,5 % das amostras de castanha-do-Brasil apresentaram positividade para AFB1 (<8 µg/kg) e para AFB2 com taxa de contaminação acima do valor permitido (16 µg/kg). Quanto às amostras de amendoim, 33,3 % apresentaram positividade para AFB1 e AFB2, também com nível de contaminação (317,1 µg/kg) acima do preconizado pela ANVISA. O isolamento e a caracterização morfológica dos fungos encontrados principalmente nas castanhas-do-Brasil com casca revelaram a presença das espécies: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Mucor* sp, *Cladosporium sphaerospermum*, *Cladosporium cladosporoides*, *Fusarium* sp, *Aspergillus terreus* e bactérias do filo *Actinomycetos*. Estes resultados demonstram que há necessidade de fiscalização mais efetiva da qualidade dos alimentos oferecidos aos consumidores.

**Palavras-chave.** castanha-do-Brasil, amendoim, aflatoxinas, cromatografia em camada delgada.

## INTRODUCTION

The importance of fungi and mycotoxins has been growing, not only from a scientific point of view, but also in terms of economics and public health. Mycotoxins are secondary metabolites produced by fungi of various species, with divergent chemical properties (structure and molecular weights) and with no apparent function in the fungal metabolism, which contaminate food pre and post-harvest, therefore threatening the health of humans and animals that eat grains and cereals contaminated<sup>1</sup>.

Aflatoxins (AF) are the main class of mycotoxins produced by fungi of the genus *Aspergillus*, especially the species *A. flavus* and *A. parasiticus*, which commonly develop in oilseeds, mainly at high temperature and moist environments. Among the main types of aflatoxins (B1, B2, G1 and G2), AFB1 has been considered one of the largest concerning mycotoxins worldwide, due to its carcinogenic potential<sup>2</sup>. The toxic effects of aflatoxin varies from liver tissue changes, which can trigger hepatitis, cirrhosis, hepatic necrosis and hepatocellular carcinoma, to immunosuppressive activities in cell-mediated responses. Besides, it can cause infertility due to changes in morphology, motility and number of spermatozoa. In women, it has been associated with low weight fetus, contaminated breast milk, and in addition it can produce teratogenic and mutagenic effects<sup>3</sup>.

Thin layer chromatography (TLC), among the analytical methods used in the detection of aflatoxins, was taken as the reference technique because it presents low cost, easy implementation and reliability<sup>1</sup>. Because of its tropical weather, Brazil offers favorable conditions for the development of aflatoxigenic fungi, increasing this issue in terms of public health actions and food security. Since there are few studies investigating the presence of aflatoxin and fungi in products marketed in northeastern Brazil, the goal of this research was to detect the presence of B aflatoxins (AFB) in food samples marketed in Fortaleza city by TLC.

## MATERIAL AND METHODS

### Sampling

A total of 23 samples of the following products were analyzed: (i) cashew nuts, (ii) peanuts (iii) nougat: the cashew nuts and peanuts, (iv): Brazil nuts, (v): linseed meal, (vi): chia flour (vii): granola and (viii): oats. Except for a sample of shelled Brazil nuts purchased in bulk at room temperature, all other products were obtained in air-conditioned environment and had brands and separate lots (there was no two similar products with the same brand). Samples were taken at different shops of the city of Fortaleza - CE, all within the expiration date, during the months from July to December 2013.

### Extraction of aflatoxin

The extraction methodology of aflatoxins was done as described by Singh et al<sup>4</sup> with some modifications. In short, 50 g of each sample was weighted on a precision scale (Shimadzu<sup>®</sup>), these being crushed and sieved. At that time was added 250 mL of methanol-water solution (60:40) and the mixture homogenized for 30 minutes on a magnetic stirrer (Fisatom<sup>®</sup>). After decanting, the material was filtered and the liquid part added to 30 mL saturated NaCl solution and hexane. When decanted, it was separated in separator funnel and 50 mL chloroform was added. Finally, the sample was added anhydrous sodium sulfate PA. The mixture was then filtered and obtained the test solution, which solvent was evaporated in rotary evaporator (Quimis<sup>®</sup>) and the sample was subsequently eluted 0.1 mL of chloroform.

### Preparation of Aflatoxin Standards

The standards (Sigma<sup>®</sup>, USA) were established by following an AOAC official method (Official Method 970.44, 2005)<sup>5</sup> in an adapted way, using the following process: aflatoxins were individually diluted in chloroform, generating solutions with concentrations of 20 µg/mL, and packed under protection from light and chilled at -20 °C in vertical freezer until use.

### Analysis and quantification

Detection and quantification of aflatoxins were performed by TLC as described by Vieira et al<sup>6</sup>. Summing up, aflatoxin B1 and B2 were separated into chromatoplates TLC plate AL on silica gel 60 g, 20 x 20cm F254 (Merck, Germany), using as mobile phase toluene: ethyl acetate: formic acid, purity 99.8 % (Vetec, Brazil) at a ratio of 6: 4: 1. Different amounts of the extract were used from each sample and  $\mu\text{L}$  standards samples B1 and B2 Sigma<sup>®</sup> brand in 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  concentrations in chromatoplates 20x20 cm ( $Y = 2 \mu\text{L}$  AFB1 and 4  $\mu\text{L}$  AFB2 for Brazil nuts and 8  $\mu\text{L}$  AFB1 and B2 for peanut). Then the plate with the applied chromatographic material was placed in a glass cell with the same eluent until it stayed 2 cm from the top edge. After elution of the mobile phase plates, they were dried at room temperature and examined visually under ultraviolet radiation type A flashlight emission 365 nm and 254 nm C (trademark Boitton Instruments). The quantification was performed by comparing fluorescence intensities of samples and standards. The centers and the size of the spots were marked. Once the samples reached fluorescence intensity similar to the patterns, the following formula was applied:

$\frac{S \times Y \times V}{W \times Z} = \mu\text{L}/\text{kg} = \text{ppb}$ , where:

$S$  =

$S$  = aflatoxin standard volume (S  $\mu\text{L}$ )

$Y$  = concentration of aflatoxin standard (Y  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

$V$  = volume of solvent used for dilution of the final sample (1000  $\mu\text{L}$ )

$Z$  = sample volume applied on the plate (Z  $\mu\text{L}$ )

$W$  = sample weight (50 g)

### Detection and quantitation limit

The detection limit corresponds to the lowest measuring and stating with 95 % to 99 % confidence of the substance which concentration is bigger than zero, while the limit of quantification is the lowest concentration of analyte that can be determined with an acceptable level of precision and accuracy<sup>7</sup>.

### Analytical quality control (recall limit)

Each sample analyzed included a recovery test. In the recovery test, the Sigma<sup>®</sup> standards were added to an uncontaminated sample the day before extraction. The standards additions were carried out so that the final concentrations of the samples were 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  AFB1 and AFB2.

### Morphological identification of fungi

The samples with visible fungal contamination were grown and isolated to identify the gender level, being observed macroscopic characteristics of the colony (relief, edges, pigmentation, size) and microscopic (ontogeny of spores) of these fungi. This process was done through the cultivation and isolation on PDA (potato, D + anhydrous glucose [dextrose], agar agar type I) in Petri dishes. The samples were cultured for 7 days at 37 °C in incubator (Quimis<sup>®</sup>)<sup>4</sup>.

## RESULTS AND DISCUSSION

In recent years, the issue of food safety, in particular to human exposure to mycotoxins, has generated a series of discussions between different government sections, in an attempt to ensure the population that products are not harmful to health.

**Table 1** shows an overall incidence of contamination by AFB of 8.7 % (2/23) of food samples obtained from different commercial establishments in Fortaleza-CE, through the thin layer chromatography method. Analysis by type of product shows that only lots of shelled Brazil nuts and peanuts showed the contamination. The AFB was detected in 12.5 % (1/8) of Brazil nuts samples with concentrations of 16  $\mu\text{g}/\text{kg}$  for AFB2 and < 8  $\mu\text{g}/\text{kg}$  for AFB1 and in 33.3 % (1/3) the peanut samples with levels of 317.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  for AFB1 and AFB2, exceeding the limit permitted by Brazilian law. In Brazil, the maximum concentration of aflatoxins tolerated in shelled Brazil nuts and peanuts for human consumption is 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  respectively, and is considered the sum of the four types<sup>8</sup>. The quantification limits for all

aflatoxins (B1, B2) were 4 µg/kg. The detection limits for AFB1 and AFB2 were 0.5 µg/kg. The recovery limit for Brazil nuts was 86.17 % when applied 10 µg/kg aflatoxin. For peanut, the limit was 91.29 %.

Aflatoxins has been detected in various products, especially peanuts, corn, nuts, beans, sunflower seeds, animal feed and condiments. Several studies conducted in Brazil, analyzing the occurrence of aflatoxins in peanuts and derivatives, report AFB1 levels above the limit allowed by country laws. Oliveira and Koller<sup>9</sup>, analyzing 22 samples of peanuts and peanuts sweet marketed in the municipality of Porto Alegre, detected aflatoxins in 58 % of samples of peanuts and 60 % peanuts sweet, only peanuts *in natura* had levels of contamination above the allowed (126.18 µg/kg). Hoeltz et al<sup>10</sup> studying the contamination of peanuts and derivatives traded in the state of Rio Grande do Sul, showed a maximum level of contamination by AFB1 of 87.5 µg/kg. According to Silva et al<sup>11</sup>, analyzes in foods marketed in Marília – SP, showed that 16 % of peanuts and derived grain samples showed contamination levels in raw peanuts samples ranging from 2 to 300 µg/kg and 9 to 466 µg/kg in tack samples.

On the other hand, Brazil nuts have been

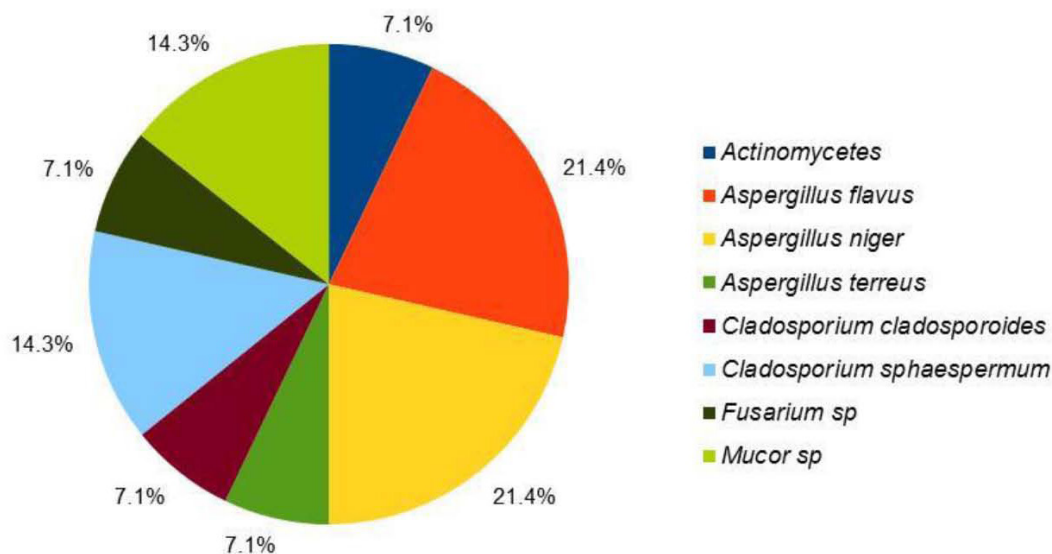
studied not only by the nutritional importance, but also by the high incidence of aflatoxins produced by fungi. In the paper by Reis et al<sup>12</sup>, 11 % of 200 samples of Brazil nuts obtained from different states of the Brazilian Amazon region have contamination with AFB. Samples from Acre and from Amazonas showed AF concentrations above the tolerance limit (15 µg/kg - processed in shell nuts) established by the National Health Surveillance Agency (ANVISA) and Regulation of the European Commission (EC). Freitas-Silva et al<sup>13</sup> using the liquid chromatography technique of high efficiency with fluorescence detection (HPLC-FD) for AF detection, showed that the shelled nuts showed higher levels of contamination by AFB (35 µg/kg AFB1 and 0.2 µg/kg AFB2) when compared to in shell nuts.

Analyzed samples of shell Brazil nuts in this study showed no incidence of aflatoxins, however was observed a significant percentage of contamination by strains of *Aspergillus* sp, were isolated and characterized at species level. Among the isolated species is the aflatoxigenic *A. flavus* (21.4 %), *A. niger* (21.4 %) and *A. terreus* (7.1 %), the fungi *Mucor* sp (14.3 %), *C. sphaespermum* (14.3 %), *C. cladosporoides* (7.1 %), *Fusarium* sp (7.1 %) and bacteria of the *Actinomycetes* phylum (7.1 %) (Figure 1).

**Table 1.** Occurrence of aflatoxins in products marketed in Fortaleza – CE

Samples	Contaminated Samples	Incidence (%)	AFB1 (µg/kg)	AFB2 (µg/kg)
Cashew nuts	0/3	0	nd	nd
Peanuts	1/3	33.3	317.1	317.1
Nougat	0/2	0	nd	nd
Brazil Nuts	1/8	12.5	<8.0	16.0
Linsed meal and chia flour	0/3	0	nd	nd
Granola	0/3	0	nd	nd
Oatmeal	0/1	0	nd	nd

\*nd: not detected



**Figure 1.** Percentage distribution of fungi isolation founded in shell Brazil nuts samples

Studies have shown *Aspergillus* as the main fungus present in the contamination of Brazil nuts. Freire et al<sup>14</sup> reported that among the 17 species of fungi found in Brazil nuts, *A. flavus* was predominant, followed by *A. niger*, *Penicillium citrinum* and *P. glabrum*. Analyzing the infection in the fruit, bark, almond, soil and air, before and after the ground contact, Baquião et al<sup>15</sup> showed the presence of potentially toxigenic fungi especially of the genera *Fusarium* sp, *Penicillium* sp and *A. flavus*, and exposure to soil as the main factor of contamination. These findings confirm that the shell does not protect the almond, on the contrary, facilitates fungal infection due to porosity.

## CONCLUSION

The results obtained in this study indicate a high susceptibility to fungal growth and the emergence of aflatoxins in Brazilian nuts and peanuts, reinforcing the need for constant monitoring by surveillance organs of food quality offered to consumers.

## REFERENCES

1. Kwiatkowski A, De Faria Alves AP. Importância da detecção e do controle de aflatoxinas em alimentos. *SaBios-Rev Saúde e Biol* [Internet]. 2007;2(2):45-54. Disponível em: [http://revista.grupointegrado.br/revista/index.php/sabios2/article/view/64].
2. Bullerman LB, Schroeder LL, Park KY. Formation and control of mycotoxins in food. *J Food Prot*. 1984;47(8):637-46.
3. Shuaib FM, Ehiri J, Abdullahi A, Williams JH, Jolly PE. Reproductive health effects of aflatoxins: a review of the literature. *Reprod Toxicol*. 2010;29(3):262-70. [DOI: http://dx.doi.org/ 10.1016/j.reprotox.2009.12.005].
4. Singh K, Frisvad JC, Thrane U, Mathur SB. An illustrated manual on identification of some seed-borne *Aspergilli*, *Fusaria*, *Penicillia* and their mycotoxins. Hellerup: Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries; 1991. 133 p.

5. AOAC. AOAC INTERNATIONAL. Natural Toxins. In: Official Methods of Analysis, Arlington, Virginia, AOAC (Chapter 49) 2005, p.3-5.
6. Vieira IGP, Freire FCO, Andrade JA, Mendes FNP, Monteiro MCN. Determinação de aflatoxinas em amêndoas de cajueiro por cromatografia em camada delgada. *Rev Ciên Agron*. 2007;38(4):430-5.
7. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial – INMETRO. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Brasil; 2007. [acesso 2014 Jan 23]. Disponível em: [[http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8\\_02.pdf](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_02.pdf)].
8. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 7, 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 9 mar 2011.
9. Oliveira LSF, Koller FFC. Ocorrência de *Aspergillus* spp e aflatoxinas em amostras de amendoim *in natura* e paçocas. *Rev Ciênc Ambient*. 2011;5(1):57-68.
10. Hoeltz M, Einloft TC, Oldoni VP, Dottori HA, Noll IB. The occurrence of aflatoxin B1 contamination in peanuts and peanut products marketed in southern Brazil. *Braz Arch Biol Technol*. 2012;55(2):313-7.
11. Silva RA, Yamamoto IT, Ferreira LO, Marques LRM. Detecção e quantificação de aflatoxinas em amostras de grãos de amendoim e derivados comercializados na região de Marília-SP, 2002-2009. *Braz J Food Nutr*. 2013;24(1): 61-4.
12. Reis TA, Oliveira TD, Baquião AC, Gonçalves SS, Zorzete P, Corrêa B. Mycobiota and mycotoxins in Brazil nut samples from different states of the Brazilian Amazon region. *Int J Food Microbiol*. 2012;159(2):61–8.
13. Freitas-Silva O, Teixeira A, Cunha FQ, Godoy RLO, Venâncio A. Predominant mycobiota and aflatoxin content in Brazil nuts. *J Verbr Lebensm*. 2011;6(4):465–72. [DOI:10.1007/s00003-011-0703-6].
14. Freire FC, Kozakiewicz Z, Paterson RR. Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. *Mycopathologia*. 2000;149(1):13–9.
15. Baquião AC, Zorzete P, Reis TA, Assunção E, Vergueiro S, Correa B. Mycoflora and mycotoxins in field samples of Brazil nuts. *Food Control*. 2012;28(2):224–9. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.004>].



# Diagnóstico e adequação das Boas Práticas em área de alimentos e bebidas de hotéis: aspectos relacionados à higiene pessoal e ambiental

## Diagnostic and adequacy of the Best Practices in the area of hotel foods and beverages: factors related to the personal and environmental hygiene

RIALA6/1699

Bruna Noga dos SANTOS<sup>1</sup>, Ana Lúcia SERAFIM<sup>2</sup>, Laissa Benites MEDEIROS<sup>3</sup>, Caroline dos Santos PEIXOTO<sup>4</sup>, Naina LOPES<sup>1</sup>, Lize STANGARLIN-FIORI<sup>5,6\*</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>5</sup>Departamento de Nutrição da Universidade Federal do Paraná. Avenida Lothário Meissner, 632, Jardim Botânico, Curitiba, PR, Brasil. CEP: 80210-170. Tel: 41 9277 2506. E-mail: lizestangarlin@hotmail.com

<sup>1</sup>Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, PR

<sup>2</sup>Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS

<sup>3</sup>Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS

<sup>4</sup>Centro Universitário Franciscano, Santa Maria, RS, Brasil

<sup>6</sup>Universidade Positivo, Curitiba, PR, Brasil

Recebido: 15.04.2015 - Aceito para publicação: 29.12.2015

### RESUMO

Neste estudo foram avaliadas as condições higiênico-sanitárias das mãos dos manipuladores e das superfícies de apoio na área de manipulação de alimentos e bebidas de hotéis, antes e após a aplicação de estratégia de intervenção. Foram avaliadas duas áreas de alimentos e bebidas de hotéis de Curitiba/PR, por meio de uma lista de verificação contendo critérios de higiene pessoal e ambiental, bem como pela análise microbiológica das amostras coletadas das mãos dos manipuladores e das superfícies de apoio, em dois momentos, antes e após a aplicação de estratégia de intervenção. A estratégia de intervenção foi implementada durante dois meses, com acompanhamento semanal por um profissional terceirizado, que auxiliou na elaboração do plano de ação e nas melhorias necessárias em relação à higiene pessoal e ambiental. Pesquisaram-se os micro-organismos aeróbios mesófilos e coliformes termotolerantes nas amostras. Constatou-se que, após a estratégia de intervenção, os hotéis apresentaram melhorias em relação à higiene pessoal e ambiental; e na segunda avaliação, houve diminuição na contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos nas mãos e nas superfícies em contato. A estratégia de intervenção foi eficiente na melhoria das condições higiênico-sanitárias, e a visão do profissional externo contribuiu na adequação das atividades de rotina.

**Palavras-chave.** manipulação de alimentos, controle de qualidade, análise microbiológica, doenças transmitidas por alimentos, higiene.

### ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the hygienic-sanitary conditions of the hands of food handlers and of the surfaces in contact with foods in the hotel food and beverage area, before and after applying the intervention strategy. Two hotel food and beverage areas in Curitiba/PR, were evaluated using a checklist including personal and environmental hygienic criteria. Also, microbiological analyses were performed in samples collected from the handlers hands and from the surfaces in contact with foods, at two moments, before and after applying the intervention strategy. The intervention strategy was carried out for two months, with weekly monitoring by an outsourced professional, who assisted in the elaboration of the action plan and in the necessary improvements related to personal and environmental hygiene. The aerobic mesophilic microorganisms and thermotolerant coliforms were analyzed in the collected samples. The investigated hotels showed improvements in the personal and environmental hygiene and there was a decrease in the aerobic mesophilic microorganisms counting in hands and in contact surfaces. The intervention strategy was efficient for improving the hygienic-sanitary conditions, and the vision of outsourced professional contributed to the adequacy of the routine activities.

**Keywords.** food handling, quality control, microbiological analysis, foodborne diseases, hygiene.



## INTRODUÇÃO

É crescente o número de pessoas que frequentam hotéis para hospedar-se e realizar suas refeições<sup>1</sup>. Porém, a presença de agentes contaminantes em serviços de alimentação, como a área de alimentos e bebidas de hotéis, é cada vez mais frequente e pode afetar a saúde dos clientes<sup>2</sup>.

Segundo dados epidemiológicos da Secretaria de Vigilância em Saúde, nos anos de 2000 a 2014, foram registrados no Brasil 9.719 ocorrências de surtos de Doença Transmitidas por Alimentos (DTA)<sup>3</sup>. Para garantir o controle dos contaminantes alimentares, os serviços de alimentação devem implementar as Boas Práticas, sendo esse considerado um programa preventivo de segurança dos alimentos, que dispõe dos requisitos higiênico-sanitários que devem ser aplicados nas etapas de preparação dos alimentos, a fim de prevenir surtos de DTA, dentre esses requisitos destaca-se a higiene pessoal e ambiental<sup>4</sup>.

A adequação dos requisitos de higiene pessoal e ambiental em serviços de alimentação previne a contaminação cruzada e impede que as mãos dos manipuladores e as superfícies de contato com os alimentos, se tornem veículo de contaminação<sup>5</sup>. Para adequação desses requisitos recomenda-se a aplicação de um diagnóstico, composto por uma lista de verificação para avaliar as condições higiênico-sanitárias, bem como a elaboração de um plano de ação para planejamento das não conformidades encontradas<sup>6</sup>. Sugere-se ainda a supervisão e auxílio de um profissional com conhecimento e experiência na área de alimentos para corrigir possíveis falhas.

O objetivo deste estudo foi avaliar as condições higiênico-sanitárias das mãos dos manipuladores e das superfícies de apoio na área de alimentos e bebidas de hotéis, antes e após estratégia de intervenção.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo possui delineamento transversal, sendo realizado nos meses de agosto a dezembro de 2014, na área de alimentos e bebidas de uma

rede hoteleira, composta por dois hotéis (hotel 1 e hotel 2) na cidade de Curitiba (PR), sendo que ambos possuíam nutricionista como responsável pela área de alimentos e bebidas. A rede hoteleira foi escolhida por conveniência e critério de acesso. Os hotéis servem, em média, 350 refeições por dia, divididos em café da manhã, eventos, almoço e jantar, e são classificados como business, que representa um hotel de quatro estrelas, conforme critérios internos da rede hoteleira. Para avaliar os critérios de higiene pessoal e ambiental, elaborou-se uma lista de verificação baseada nos requisitos da Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 216, de 15 de setembro de 2004<sup>7</sup>. A lista contemplou os seguintes requisitos em relação à higiene pessoal: saúde dos manipuladores (tipos de exames, frequência e registros; procedimento em relação a lesões e sintomas de doenças); uniforme (compatível com a atividade, conservado, limpo, trocado diariamente e usados exclusivamente na área de alimentos e bebidas do hotel, local específico para guardar as roupas e objetos pessoais dos manipuladores); higienização das mãos (procedimento, frequência, cartazes de orientação afixados às paredes, produtos utilizados e lavatório exclusivo em posição estratégica); conduta (não falar desnecessariamente, cantar, espirrar, assobiar, cuspir, tossir e comer durante a manipulação); proteção dos cabelos (uso de touca que cubra todo o cabelo); asseio pessoal (não usar barba, bigode, unhas compridas e pintadas, maquiagem e adornos) e capacitação (frequência, conteúdo programático e registro).

Os requisitos de higiene ambiental avaliados foram: higienização (frequência e procedimento de higienização das instalações, dos equipamentos, dos móveis e dos utensílios; registro das operações de higienização não rotineiras; periodicidade de limpeza da caixa de gordura); produtos saneantes (registro no Ministério da Saúde, produto inodoro, identificados e armazenados em local adequado e diluição, tempo de contato e modo de uso conforme recomendação do fabricante); utensílios de higienização (próprios para a atividade, conservados e limpos, guardados em local

reservado e os utilizados nas instalações, distintos dos que entram em contato com o alimento).

Os requisitos da lista foram aplicados nas áreas de preparação dos alimentos, por profissional terceirizado, graduado em Nutrição e com experiência na área de alimentos. Os requisitos foram avaliados em adequado, quando o local atendeu ao requisito exigido e inadequado quando o requisito não foi atendido.

Juntamente com a aplicação da lista, realizou-se coleta das amostras, para análises microbiológicas das mãos de oito manipuladores (sendo M1, M2, M3 e M4 do hotel 1 e M5, M6, M7 e M8 do hotel 2) e duas superfícies em contato com o alimento (S1 do hotel 1 e S2 do hotel 2), na área de manipulação dos alimentos dos hotéis. As análises microbiológicas foram realizadas com auxílio de *swabs* estéreis (marca Inlab). Foram analisados os micro-organismos aeróbios mesófilos e coliformes termotolerantes. Para as superfícies, foi escolhida a bancada de maior manipulação. As coletas das amostras das mãos dos manipuladores e das superfícies de contato com o alimento foi o mesmo para os dois hotéis, sendo realizadas após as mãos e bancadas serem consideradas higienizadas pelos manipuladores.

As análises foram realizadas de acordo com os métodos preconizados pela American Public Health Association, descrita no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*<sup>8</sup>, obtendo-se a diluição  $10^{-1}$  e a partir desta, foram preparadas as diluições decimais sucessivas até  $10^{-3}$ .

Os resultados das análises das mãos foram expressos em Unidade Formadora de Colônia por Mão (UFC/mão), enquanto que para as análises de superfícies em contato com os alimentos foram expressos em UFC/cm<sup>2</sup>. O limite definido como aceitável para a contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos foi de até 50 UFC/cm<sup>2</sup> para as superfícies em contato com os alimentos<sup>4</sup> e de até 100 UFC/mão para as mãos<sup>9</sup>. Para as contagens de coliformes termotolerantes foram considerados como aceitáveis a ausência desse micro-organismo nas

mãos dos manipuladores de alimentos<sup>10</sup> e ausência nas superfícies em contato com os alimentos<sup>4</sup>.

Após a aplicação da lista e avaliação das análises microbiológicas, realizou-se a estratégia de intervenção, com duração de dois meses, sendo realizado acompanhamento semanal do profissional terceirizado, que auxiliou os nutricionistas dos hotéis na elaboração do plano de ação, referente às inadequações encontradas na aplicação da lista, orientação na escolha de produtos e serviços necessários para a adequação das melhorias e na capacitação para os manipuladores de alimentos dos hotéis. O plano de ação foi elaborado utilizando o modelo proposto por Stangarlin et al<sup>6</sup>.

A capacitação ministrada para os manipuladores de alimentos teve duração de duas horas, sendo elaborada pelas nutricionistas dos hotéis com auxílio do profissional terceirizado. Os conteúdos programáticos foram definidos de acordo com as não conformidades encontradas nos resultados das análises microbiológicas e da lista de verificação, e foram reforçados os requisitos de higiene pessoal e ambiental exigidos pela RDC nº 216/2004<sup>7</sup>. Após a estratégia de intervenção, aplicou-se novamente a lista de verificação e realizaram-se novamente as análises microbiológicas nas mãos dos mesmos manipuladores e superfícies em contato com os alimentos da primeira coleta, sendo utilizados os mesmos procedimentos descritos anteriormente.

Os resultados obtidos foram analisados no *Software Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versão 19.0. Os dados foram analisados por meio de estatística descritiva simples (média e porcentagem), com apresentação em tabela de frequência.

Os aspectos éticos foram respeitados, sendo o projeto submetido e aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Sociedade Evangélica Beneficente de Curitiba (PR), sob o número: 756.886.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado do percentual de adequação em relação à higiene pessoal e ambiental da área de alimentos e bebidas dos hotéis, antes e

após a estratégia de intervenção, encontram-se na **Tabela 1**. Constatou-se que, em ambos os hotéis, os trabalhadores melhoraram suas práticas em relação à higiene pessoal, sendo observado aumento do percentual de adequação nos itens de higienização das mãos, asseio pessoal e proteção dos cabelos. Esses itens são considerados básicos e indispensáveis para garantir o alimento seguro e demonstram que a intervenção foi importante para proporcionar mudanças positivas em relação aos hábitos dos manipuladores de alimentos.

A higiene pessoal é considerada item problemático em serviços de alimentação, como demonstrado em estudo realizado em Santa Rosa (RS), no qual se observou manipuladores de alimentos utilizando adornos e unhas compridas e apresentavam lesões visíveis nos dedos, durante a manipulação dos alimentos<sup>11</sup>.

Para que resultados positivos sejam alcançados em relação à higiene pessoal, recomenda-se a realização de capacitações frequentes, pois influenciam na realização adequada destes procedimentos e podem contribuir na redução da contaminação dos alimentos<sup>12</sup>.

Além disso, a intervenção de profissional terceirizado pode influenciar na realização adequada dos requisitos de higiene<sup>6</sup>, conforme demonstrado neste estudo.

Em relação à higiene ambiental (**Tabela 1**), ambos os hotéis aumentaram o percentual de adequação, após a estratégia de intervenção, sendo observadas melhorias nos métodos de higienização e nos produtos saneantes utilizados. A higienização em serviços de alimentação, incluindo a área de alimentos e bebidas em hotéis, é considerada uma etapa importante para reduzir a contaminação cruzada e assegurar a inocuidade dos alimentos. Esta etapa engloba o correto procedimento de limpeza, seguido da desinfecção, com produtos saneantes e utensílios adequados, com objetivo de eliminar os resíduos e reduzir o número de micro-organismos presentes nas superfícies em contato com os alimentos<sup>4</sup>.

As contagens de micro-organismos aeróbios mesófilos nas mãos dos manipuladores e superfícies em contato com os alimentos, antes e após a estratégia de intervenção, encontram-se

**Tabela 1.** Média do percentual de adequação, quanto à higiene pessoal e ambiental de dois hotéis, antes e após estratégia de intervenção, Curitiba, PR, Brasil, 2014

Requisitos	Hotel 1		Hotel 2	
	Antes (%)	Após (%)	Antes (%)	Após (%)
<b>Higiene Pessoal</b>				
Saúde dos manipuladores	100	100	100	100
Uniforme	100	100	100	100
Higienização das mãos	80	100	80	100
Conduta e comportamento	100	100	100	100
Proteção dos cabelos	100	100	0	100
Asseio pessoal	60	80	100	100
Capacitação	100	100	100	100
Média geral	81	93	87	100
<b>Higiene Ambiental</b>				
Higienização	100	100	67	100
Produtos saneantes	80	100	100	100
Utensílios e equipamento de higienização	100	100	100	100
Média Geral	93	100	89	100

Legenda: %: percentual de adequação

na **Tabela 2**. Anterior à intervenção, 62,5 % (n=5) das mãos dos manipuladores de alimentos estavam com contagem acima do limite permitido para esse micro-organismo<sup>9</sup>. Após a intervenção, houve redução dos micro-organismos aeróbios mesófilos em 62,5 % (n=5) das mãos, entretanto 37,5 % (n=3) permaneceram acima do limite recomendado. Esses resultados revelam que os procedimentos de higienização foram mais eficientes e houve mudança na atitude dos manipuladores de alimentos após intervenção, o que pode ser justificado pela supervisão do profissional terceirizado e capacitação.

Na **Tabela 2**, observa-se ainda, aumento na contagem das amostras M1 e M3, após intervenção. Isso demonstra que apenas uma intervenção pode diminuir e sensibilizar alguns manipuladores, mas não é suficiente para proporcionar a mudança comportamental de todos os envolvidos nas etapas de preparação dos alimentos. Neste sentido, recomenda-se que as intervenções sejam frequentes e contínuas, para garantir maior sensibilização de todos e proporcionar as mudanças necessárias.

Estudo de McIntyre et al<sup>13</sup>, também observou mudanças significativas no conhecimento dos manipuladores de alimentos após uma estratégia

de intervenção. Porém, o aumento no conhecimento nem sempre resulta nas mudanças necessárias para a rotina de trabalho. Neste sentido, as intervenções para serem eficientes devem ir além da informação, proporcionando mudanças na conscientização, comprometimento e comportamento dos manipuladores.

Observou-se após estratégia de intervenção (**Tabela 2**), a redução da contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos nas superfícies avaliadas. Esse resultado demonstra que também houve melhoria nos procedimentos de higienização das superfícies em contato com os alimentos após intervenção, o que pode contribuir para evitar a contaminação cruzada e garantir maior segurança na manipulação dos alimentos.

Estudo realizado em serviços de alimentação na Polônia<sup>14</sup> evidenciou alta contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos em superfícies em contato, sendo o resultado atribuído ao procedimento inadequado de higienização. A higienização deficiente em serviços de alimentação pode estar relacionada a fatores econômicos, na aquisição de produtos inadequados ou ausência de mão de obra qualificada.

**Tabela 2.** Contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos nas mãos de oito manipuladores de alimentos e duas superfícies em contato com os alimentos de dois hotéis, antes e após estratégia de intervenção, Curitiba, PR, Brasil, 2014

Manipuladores		Antes (UFC/mão)	Após (UFC/mão)
Hotel 1	M1	2,2 x 10 <sup>2</sup>	3,0 x 10 <sup>2</sup>
	M2	3,6 x 10 <sup>3</sup>	1,0 x 10 <sup>3</sup>
	M3	0	2,0 x 10 <sup>1</sup>
	M4	1,3 x 10 <sup>2</sup>	0
Hotel 2	M5	0	0
	M6	5,6 x 10 <sup>2</sup>	0
	M7	3,2 x 10 <sup>3</sup>	6,0 x 10 <sup>2</sup>
	M8	3,0 x 10 <sup>1</sup>	0
Superfície em contato com alimento		Antes (UFC/cm <sup>2</sup> )	Após (UFC/cm <sup>2</sup> )
Hotel 1	S1	2,0 x 10 <sup>1</sup>	0
Hotel 2	S2	7,4 x 10 <sup>2</sup>	1,0 x 10 <sup>1</sup>

Legenda: UFC: Unidade Formadora de colônia; M: manipuladores; S: superfície

Corroborando, Howells et al<sup>15</sup> reforçam que inúmeras barreiras podem colaborar para a inadequação do requisito de higienização em serviços de alimentação, no qual podemos destacar a ausência de comprometimento dos gestores e manipuladores de alimentos, a falta de tempo, a formação insuficiente dos envolvidos e ausência de investimentos adequados.

Neste sentido, os procedimentos de higienização, realizados nos locais que manipulam alimentos, devem ser padronizados e as informações para a realização desses requisitos devem ser transmitidas com clareza para os manipuladores, com objetivo de evitar que realizem seus próprios métodos de higienização, no qual podem ser inadequados do ponto de vista higiênicossanitários.

Quando avaliada, a contagem de coliformes termotolerantes, verificou-se que as amostras das mãos dos manipuladores e das superfícies em contato com os alimentos, apresentaram-se dentro dos limites aceitáveis para esse micro-organismo (ou seja, ausência para as mãos<sup>10</sup> e ausência para superfícies em contato com os alimentos<sup>4</sup>), antes e após a estratégia de intervenção. Esses resultados são satisfatórios, pois a presença desse micro-organismo em alimentos é geralmente visto como uma indicação de contaminação fecal, que por sua vez, indica que outros micro-organismos prejudiciais, sejam eles bactérias, vírus ou parasitas helmintos ou protozoários, podem estar presentes<sup>4</sup>.

## CONCLUSÃO

Constata-se que as condições higiênicossanitárias das mãos dos manipuladores e superfícies de apoio da área de alimentos e bebidas da rede hoteleira melhoraram após a estratégia de intervenção. Isso demonstra que a intervenção realizada nesse estudo, pode ser uma alternativa viável e aplicada continuamente, para auxiliar os serviços de alimentação na adequação dos requisitos de higiene pessoal e ambiental, imprescindíveis para garantir a segurança dos alimentos.

## REFERÊNCIAS

1. Branco GM, Ribeiro JLD, Tinoco MAC. Determinantes da satisfação e atributos da qualidade em serviços de hotelaria. *Produção*. 2010;20(4):576-88. [DOI: 10.1590/S0103-65132010005000057].
2. Costa CF, Oliveira FC, Ribeiro APM, Jaime RP, Campos RC, Nojimoto ITI. Política de segurança alimentar: avaliação da utilização das boas práticas de confecção através de *check-list* em restaurantes de Goiânia, Goiás. *J Health Sci Inst*. 2010;28(4):334-6.
3. Ministério da Saúde. Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos – VE-DTA. [Acesso 2015 Jan 04]. Disponível em: [[http://anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3\\_PAINEL\\_1\\_ApresentacaoRejaneAlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Agosto\\_2014\\_PDF.pdf](http://anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3_PAINEL_1_ApresentacaoRejaneAlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Agosto_2014_PDF.pdf)]
4. Silva Jr. EA. Manual de Controle Higiênico-Sanitário em Serviços de Alimentação. 6ª ed. São Paulo: Varela; 2012.
5. Nyachuba DG. Foodborne illness: is it on the rise. *Nutr Rev*. 2010;68(5):257-69. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1753-4887.2010.00286.x>].
6. Stangarlin L, Serafim AL, Medeiros LB, Saccol ALF. Instrumentos para diagnóstico das boas práticas de manipulação em serviços de alimentação. 1ª ed. Rio de Janeiro: Editora Rubio; 2014.
7. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004. Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 16 set. 2004. Seção 1, nº 179, p.25-28.
8. Vanderzant C, Splittstoesser F. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4ª ed. Washington (DC): APHA; 2001. p.51-74.
9. Lambrechts AA, Human IS, Doughari JH, Lues JFR. Bacterial contamination of the hands of food handlers as indicator of hand washing efficacy in some convenient food industries. *Pak J Med Sci*. 2014;30(4):755-8. [DOI: <http://dx.doi.org/10.12669/pjms.304.4400>].

10. Lues JFR, Van Tonder I. The occurrence of indicator bacteria on hands and aprons of food handlers in the delicatessen sections of a retail group. *Food Control*. 2007;18(4):326-32. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.10.010>].
11. Poerner N, Rodrigues E, Palhano AL, Fiorentini AM. Avaliação das condições higiênico-sanitárias em serviços de alimentação. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2009;68(3):399-405.
12. Santos VAQ, Hoffmann FL. Avaliação das boas práticas de fabricação em linha de processamento de queijos Minas frescal e ricota. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2010;69(2):222-8.
13. McIntyre L, Vallaster L, Wilcott L, Henderson SB, Kosatsky T. Evaluation of food safety knowledge, attitudes and self-reported hand washing practices in FOODSAFE trained and untrained food handlers in British Columbia, Canada. *Food Control*. 2013;30(1):150-6. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.06.034>].
14. Konecka-Matyjek E, Maćkiw E, Krygier B, Tomczuk K, Stoś K, Jarosz M. National monitoring study on microbial contamination of food-contact surfaces in hospital kitchens in Poland. *Ann Agric Environ Med*. 2012;19(3):457-63.
15. Howells AD, Roberts KR, Shanklin CW, Pilling VK, Brannon LA, Barrett BB. Restaurant employees' perceptions of barriers to three food safety practices. *J Am Diet Assoc*. 2008;108(8):1345-9. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jada.2008.05.010>].



# Qualidade higiênico-sanitária de saladas de frutas vendidas em quiosques de praias em Florianópolis - SC durante a temporada de verão de 2015

## Hygienic and sanitary qualities of fruit salads sold at beach kiosks in Florianópolis - SC during the 2015 summer season

RIALA6/1700

Maria Luiza Silva FARIAS, Daiane BOBERMIN, Deise Helena Baggio RIBEIRO\*

\*Endereço para correspondência: Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Rod. Ademar Gonzaga, 1346, Itacorubi, Florianópolis, SC. CEP: 88034-001. Tel: 48 3721 2897. E-mail: deise.baggio@ufsc.br

Recebido: 14.10.2015 - Aceito para publicação: 25.02.2016

### RESUMO

Nos últimos anos, o estilo de vida tem trazido mudanças na alimentação da população, com o aumento de refeições feitas fora do domicílio, da procura pela praticidade de alimentos prontos e também da busca por uma alimentação mais saudável. O controle da produção e comercialização desses produtos deve ser rigoroso para proteger a saúde da população. Nas praias, observa-se que a estrutura dos quiosques não é adequada para a manipulação de certos alimentos, por isso a venda de salada de frutas não é permitida nas praias de Florianópolis - SC, apesar de ser amplamente comercializada. O objetivo deste trabalho foi de avaliar a qualidade higiênico-sanitária, quanto à presença de *Salmonella* e à enumeração de coliformes termotolerantes, em 40 amostras de saladas de frutas comercializadas em quiosques de quatro praias de Florianópolis. Os resultados foram comparados com os padrões estabelecidos pela RDC nº 12/01. Somente 5 % das amostras estavam impróprias para o consumo humano por extrapolarem o limite de coliformes termotolerantes. Todas as amostras apresentaram ausência de *Salmonella* em 25 g. O resultado microbiológico satisfatório da maioria das amostras pode estar associado às condições intrínsecas da salada de frutas, que possui pH baixo o suficiente para inibir o crescimento dos micro-organismos pesquisados.

**Palavras-chaves.** salada de frutas, coliformes termotolerantes, *Salmonella*, segurança dos alimentos.

### ABSTRACT

Recently, changes in lifestyle have modified the eating habits, with an increase in having meals outside of home and demanding for the convenience of ready-to-eat foods, and also rising the search for healthier diet. Controls on this kind of food production and commercialization should be strict for protecting the population health. Beach kiosks do not offer the suitable conditions for handling certain foods due to their lack of structure. Therefore, it is prohibited to sell fruit salads on the beaches of Florianópolis-SC, although they have been amply commercialized. Hygiene and sanitation conditions were evaluated in 40 fruit salad samples sold in kiosks on the four beaches in Florianópolis, by analyzing the occurrence of *Salmonella* and thermotolerant coliforms counting. These results were compared to the standards established by the local regulation (RDC 12/01). Only 5 % of the samples were considered unsuitable for human consumption, as they exceeded the limits established for thermotolerant coliform. All of the samples showed negative results for *Salmonella* in 25 g of food. The satisfactory microbiological results found in this study might be associated with the intrinsic characteristics of fruit salads, which possess a low pH value and being enough to inhibit the growth of these two microorganisms.

**Keywords.** fruit salad, thermotolerant coliform, *Salmonella*, food safety.

## INTRODUÇÃO

Uma alimentação saudável, atrativa, com alto valor nutricional, pouco processada e pronta para o consumo tem se tornado de grande interesse e vem ganhando importância comercial nos últimos anos. Nesse sentido, as frutas têm destaque por serem minimamente processadas e não sofrem muitas perdas nutricionais<sup>1</sup>.

O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas frescas do mundo, segundo o Anuário Brasileiro de Fruticultura de 2014, com cerca de 40 milhões de toneladas colhidas nos últimos dez anos. Análise feita pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) sobre o Consumo Alimentar Pessoal no Brasil no período de 2008 a 2009 mostrou que o consumo médio per capita de salada de frutas é de 2,2 g/dia, sendo que 38,8 % deste consumo ocorre fora do domicílio. A pesquisa também mostra que o consumo de salada de frutas na zona urbana é muito superior ao consumo na zona rural, sendo que 39,7 % deste consumo ocorre fora do domicílio. A região de maior consumo per capita é a Sul com 3,9 g/dia, representando 2,1 % da dieta. Os idosos são os maiores consumidores (1,7 g/dia), seguidos pelos adultos (1,2 g/dia) e então, os adolescentes (0,9 g/dia). Estes últimos são a faixa etária que mais consome salada de frutas fora do domicílio (51,2 % do consumo)<sup>2</sup>.

Salada de frutas é um alimento minimamente processado, pronto para o consumo que inclui um ou mais tipos de frutas descascadas, podendo ser submetidas à retirada do caroço, pré-cortadas e acondicionadas. Devem atender a demanda do consumidor pela conveniência e semelhança com as frutas *in natura*, com a mesma segurança e qualidade sensorial e nutricional<sup>3</sup>.

A vida de prateleira de frutas minimamente processadas refrigeradas é muito curta, o que reduz a possibilidade dos micro-organismos patogênicos se desenvolverem antes que o produto esteja deteriorado. Do ponto de vista de deterioração, os micro-organismos relevantes são os psicrófilos e os bolores capazes de crescer de 2 a 4 °C. Não existe método microbiológico de rotina para avaliar a vida de prateleira destes alimentos, também não há, até o momento, um

indicador microbiano da deterioração, exceto a presença de bolor visível no produto. Assim, indicadores sensoriais (sabor, firmeza, textura) são usados para indicar a vida de prateleira<sup>3</sup>. A presença de patógenos entéricos é a maior preocupação quanto à segurança dos alimentos, e a legislação brasileira estabelece como micro-organismos indicadores da segurança do consumo os coliformes termotolerantes e *Salmonella*<sup>4</sup>. Estes podem ser usados como indicadores da falta de medidas sanitárias e revelam condições inadequadas na manipulação dos alimentos, pela não observação das Boas Práticas de Manipulação dos Alimentos<sup>5</sup> ou o uso de matéria prima de baixa qualidade.

Segundo a Organização Mundial da Saúde, até um terço da população de países desenvolvidos é atingida por doenças transmitidas por alimentos (DTA) todos os anos. Em países em desenvolvimento, este número é ainda mais expressivo. Apesar de a incidência dessas doenças ser de difícil estimativa, representam uma grande causa de mortalidade. Cerca de dois milhões e duzentos mil casos de morte por diarreia associados à DTA são registrados por ano no mundo<sup>6</sup>.

No Brasil, segundo o Departamento de Vigilância Epidemiológica do Ministério da Saúde<sup>7</sup>, os dados sobre surtos de DTA no país, entre os anos de 2000 e 2015, apontam que ocorreram 10.666 casos de surtos, que envolveram 209.240 doentes. Entre estes surtos, 32 foram provenientes do consumo de frutas.

A observação das instruções para manipulação adequada de alimentos que incluam a lavagem cuidadosa e o uso de agentes antimicrobianos na superfície das frutas antes do consumo, assim como a manutenção das boas condições sanitárias durante todo o processamento e acondicionamento são práticas que contribuem para a redução da contaminação superficial e prevenção da contaminação cruzada. A manutenção de temperaturas baixas nas operações de processamento e durante o armazenamento também contribui para a redução do risco do desenvolvimento dos patógenos mesófilos<sup>3</sup>.

Tendo em vista a importância da segurança microbiológica dos alimentos, as Boas Práticas



de Fabricação (BPF) visam manter a qualidade e a segurança dos alimentos, e principalmente prevenir a ocorrência de DTA, as quais foram regulamentadas na RDC nº 216<sup>5</sup>, e complementada pela RDC nº 218<sup>8</sup>.

Na temporada de verão 2014-2015, a Prefeitura Municipal de Florianópolis disponibilizou mais de 1.100 vagas para comércio em vinte e cinco praias do município, entre ambulantes e quiosques. O comércio dos alimentos nas praias foi regulado pelo Edital de Credenciamento nº 012/PMF/SMDU/SESP/2014<sup>9</sup>, o qual determinava 178 vagas para quiosques fixos. Estes eram tendas de 16 m<sup>2</sup>, sem disponibilidade de água encanada e eletricidade. Para concessão da vaga, o requerente tinha como obrigatoriedade a apresentação de certificado de curso de manipulação de alimentos com validade máxima de dois anos. Cabe salientar que saladas de frutas não eram preparações com venda autorizada, de acordo com o Edital. Contudo, foram amplamente comercializadas. Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar a qualidade sanitária das amostras de saladas de frutas vendidas nos quiosques de praias do município de Florianópolis e correlacionar os resultados analíticos com as condições de higiene do local de comercialização e dos manipuladores.

## MATERIAL E MÉTODO

Foram obtidas 40 amostras de salada de frutas adquiridas em suas embalagens originais: copos descartáveis, com e sem tampa. As coletas foram realizadas nos meses de janeiro e fevereiro de 2015, durante seis semanas consecutivas, nos quiosques disponibilizados pela Prefeitura de Florianópolis para o comércio legal de alimentos durante a temporada de verão, nas praias de Jurerê, Canasvieiras, Praia Mole e Barra da Lagoa. O horário da coleta das amostras variou entre 9h e 12h. O conteúdo da embalagem original foi vertido em um saco plástico estéril para viabilizar o transporte em bolsa térmica com gelo desde a aquisição até o local de análise. O tempo entre a coleta da amostra e o início das análises não ultrapassou 3 horas.

As análises microbiológicas envolvendo a enumeração de coliformes termotolerantes e a pesquisa de *Salmonella* foram realizadas de

acordo com os métodos descritos por Silva et al<sup>10</sup>.

Para a avaliação das BPFs, os resultados microbiológicos foram correlacionados com as boas práticas de fabricação por meio da observação dos locais de coleta quanto à disponibilidade de luz elétrica e água encanada, das condições de manipulação quando a salada de frutas era preparada no momento da compra e das condições de armazenamento quando prontas para o consumo.

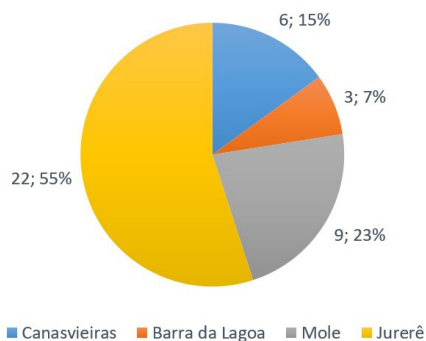
## RESULTADOS

### Coleta de amostras

Florianópolis é um município composto por uma porção insular, que possui uma ilha principal, outras pequenas ilhas que a circundam e, ainda, uma porção continental. A população de 421.404 habitantes se concentra na porção continental, e no centro e norte da ilha principal. Segundo a prefeitura de Florianópolis, durante a alta temporada de verão (meses de dezembro, janeiro, fevereiro e março) o município tem sua população aumentada por milhares de turistas, principalmente no período entre o *reveillon* e o carnaval<sup>11</sup>. Neste período também aumenta a demanda pela aquisição de produtos prontos para o consumo, o que gera uma preocupação em relação às condições de processamento e armazenamento, que podem ser refletidas por meio da análise da qualidade sanitária.

As tentativas de aquisição das amostras ocorreram em todos os quiosques das praias selecionadas, porém foram efetivamente coletadas de acordo com a disponibilidade de venda. A representatividade das praias está apresentada na **Figura 1**.

As condições do produto no momento da aquisição variaram em: a) saladas de frutas preparadas previamente e armazenadas em geladeira ou caixa térmica com gelo já em sua embalagem individual com tampa; b) preparadas previamente e mantidas a granel em recipiente com/sem tampa também em geladeira ou caixa térmica com gelo, e servidas em embalagem individual somente no ato da compra; c) preparadas sob demanda, em porção individual no momento da compra.



**Figura 1.** Número de amostras coletadas e sua representatividade (%)

### Análises microbiológicas

Os resultados analíticos da enumeração de coliformes termotolerantes indicaram que apenas 2 amostras (5 %) apresentaram contagem de 1100 NMP/g (**Tabela 1**), valor superior aquele determinado como parâmetro de segurança para o consumo humano, sendo impróprias para o consumo. Segundo a RDC nº 12/2001<sup>6</sup>, o limite para coliformes 45 °C em salada de frutas, considerando amostras indicativas, é de  $5 \times 10^2$  NMP/g de amostra.

As coletas repetidas permitiriam verificar se o resultado obtido se mantinha ao longo da temporada. Porém, como a aquisição dependeu da disponibilidade do produto, em alguns casos não foi possível repetir a coleta, pois os pontos de venda se encontravam fechados ou o produto não estava disponível no momento da coleta.

Na Praia Mole foram coletadas amostras em cinco pontos de venda diferentes sendo possível repetir a coleta em quatro, totalizando nove amostras. As amostras coletadas apresentaram valores para coliformes termotolerantes que variaram de < 3 a 1100 NMP/g. Também foi possível notar que os pontos de coleta M2, M4 e M5 mantiveram a qualidade sanitária dos produtos comercializados nas duas datas de coleta. Entretanto, no quiosque M3 a contagem de coliformes termotolerantes foi bastante baixa na primeira coleta, porém na segunda, a amostra estava imprópria para o consumo.

Na praia de Jurerê foi coletado um total de vinte e duas amostras em onze pontos de

venda diferentes, sendo que em alguns destes foi possível realizar três coletas em semanas distintas. Este é o caso das amostras 10, 24 e 29, todas oriundas do quiosque J5, apesar dos resultados variarem de 16 a 460 NMP/g, todas as amostras estavam próprias para o consumo. O mesmo aconteceu com as amostras 2, 26 e 30 do quiosque J7, onde os resultados variaram de 20 a 460 NMP/g. Nos pontos de venda J1 (amostras 6 e 21) e J2 (amostras 7 e 22) onde só foi possível realizar duas coletas, os resultados analíticos também se mostraram bem próximos. Esta constância, no entanto, não foi observada no quiosque J9, cujos resultados foram de 240 e 1100 NMP/g, sendo que o maior valor caracteriza a amostra como imprópria para consumo.

A praia de Canasvieiras as amostras apresentaram contagem que variou de 3,6 a 460 NMP/g. Não houve repetição de coleta, ou seja, todas as seis amostras foram provenientes de pontos de venda distintos. O mesmo ocorreu na Praia da Barra da Lagoa, onde as três amostras foram adquiridas em quiosques distintos. Nessas praias, todas as amostras apresentaram valores de NMP de coliformes termotolerantes dentro dos limites microbiológicos vigentes.

Quando analisada a incidência de amostras reprovadas em relação ao total de amostras coletadas, pode-se observar que apesar de somente duas delas estarem acima dos limites estabelecidos pela legislação, outras seis amostras (15 %) estavam muito próximas dele. Essas amostras, apesar de não reprovadas, apresentaram uma quantidade elevada de micro-organismos, que rapidamente poderia ultrapassar o limite da legislação, caso não fossem armazenadas de forma adequada. Cabe salientar que as coletas foram realizadas no início do dia, o que leva a crer que os produtos preparados não tenham sido armazenados por muito tempo antes da coleta. Em contrapartida, foi possível observar que dez amostras (25 %) apresentaram valores até 3,6 NMP/g, resultado que indica boas condições de manipulação e armazenamento. Em nenhuma amostra foi identificada a presença de *Salmonella*.

**Tabela 1.** Resultado para contagem de coliformes termotolerantes

Amostra	Data	Local	Condição de comercialização*	Código do quiosque	Coliformes (NMP/g)	Salmonella (em 25g)
1	20/01/2015	Mole	A	M1	21	Ausência
2	20/01/2015	Mole	C	M2	<3	Ausência
3	20/01/2015	Mole	B	M3	14	Ausência
4	20/01/2015	Mole	C	M4	<3	Ausência
5	20/01/2015	Mole	C	M5	<3	Ausência
6	26/01/2015	Jurerê	A	J1	3,6	Ausência
7	26/01/2015	Jurerê	A	J2	75	Ausência
8	26/01/2015	Jurerê	A	J3	93	Ausência
9	26/01/2015	Jurerê	A	J4	43	Ausência
10	26/01/2015	Jurerê	A	J5	16	Ausência
11	26/01/2015	Jurerê	A	J6	460	Ausência
12	26/01/2015	Jurerê	A	J7	240	Ausência
13	26/01/2015	Jurerê	A	J8	3,6	Ausência
14	02/02/2015	Mole	C	M2	460	Ausência
15	02/02/2015	Mole	B	M3	1100	Ausência
16	02/02/2015	Mole	C	M4	3,6	Ausência
17	02/02/2015	Mole	C	M5	150	Ausência
18	03/02/2015	Barra	B	B1	28	Ausência
19	03/02/2015	Barra	C	B2	75	Ausência
20	03/02/2015	Barra	C	B3	290	Ausência
21	09/02/2015	Jurerê	A	J1	3,6	Ausência
22	09/02/2015	Jurerê	C	J2	23	Ausência
23	09/02/2015	Jurerê	A	J4	7,4	Ausência
24	09/02/2015	Jurerê	A	J5	210	Ausência
25	09/02/2015	Jurerê	A	J6	11	Ausência
26	09/02/2015	Jurerê	A	J7	20	Ausência
27	09/02/2015	Jurerê	A	J8	<3	Ausência
28	09/02/2015	Jurerê	C	J9	1100	Ausência
29	18/02/2015	Jurerê	A	J5	460	Ausência
30	18/02/2015	Jurerê	A	J7	460	Ausência
31	18/02/2015	Jurerê	A	J8	240	Ausência
32	18/02/2015	Jurerê	C	J9	240	Ausência
33	18/02/2015	Jurerê	A	J10	460	Ausência
34	18/02/2015	Jurerê	A	J11	93	Ausência
35	23/02/2015	Canasvieiras	C	C1	3,6	Ausência
36	23/02/2015	Canasvieiras	C	C2	93	Ausência
37	23/02/2015	Canasvieiras	C	C3	3,6	Ausência
38	23/02/2015	Canasvieiras	A	C4	23	Ausência
39	23/02/2015	Canasvieiras	A	C5	23	Ausência
40	23/02/2015	Canasvieiras	A	C6	460	Ausência

\*A: Armazenada a granel, B: Armazenada individualmente, C: Preparada sob demanda no momento da compra

\*NMP/g: Número Mais Provável por grama de alimento analisado

### Avaliação das BPF nos pontos de coleta

Entre os vinte e cinco quiosques nos quais foi possível coletar saladas de frutas, dois não dispunham de água corrente (M2 e B3) e a higienização das frutas, utensílios e mãos era feita com bacias e bombonas com água. Nestes dois quiosques o preparo foi feito no momento da compra, e mesmo não tendo condições mínimas necessárias apresentou resultados analíticos satisfatórios.

Os quiosques que apresentaram amostras reprovadas (M3 e J9) dispunham de pia com água corrente. No primeiro, a amostra se encontrava pronta, em embalagem individual com tampa, refrigerada. No segundo, a amostra foi preparada no momento da compra, porém a partir de frutas previamente fracionadas mantidas fora de refrigeração.

A manipulação das frutas somente pôde ser observada em quatorze das quarenta amostras coletadas. As demais se encontravam prontas, sob refrigeração, a maioria em recipientes grandes cobertos com tampas ou filme de PVC, sendo servida somente na hora da compra em embalagem individual com o auxílio de uma colher/concha. Somente três amostras já estavam armazenadas em embalagem individual com tampa no momento da compra (**Tabela 1**).

Nos quiosques em que foi possível observar a manipulação das saladas de frutas, a maioria dos manipuladores fez higienização das mãos, e alguns fizeram o uso de luvas. A higienização das frutas antes do fracionamento era feita rapidamente, sem a etapa de sanitização. O fracionamento era feito na superfície da pia/balcão que também servia de apoio para diversos objetos, geralmente um recipiente era utilizado para fazer a mistura das frutas já fracionadas. A casca das frutas e as superfícies de corte e utensílios utilizados foram identificadas como possíveis fontes de contaminação quando não higienizadas apropriadamente.

### DISCUSSÃO

Comparando os resultados apresentados com os de outros autores, observamos que Aguiar et al<sup>12</sup>, analisando amostras de salada

de frutas na cidade de Passo Fundo, encontraram 100 % das amostras aptas para o consumo, com contagem de coliformes termotolerantes abaixo do limite da legislação. No ano de 2004, Pinheiro et al<sup>13</sup> obtiveram resultado diferente, ao analisar cem amostras de frutos minimamente processados, encontrando 28 % das amostras com contagem de coliformes termotolerantes superior a  $5 \times 10^2$  NMP/g. Borges et al<sup>14</sup> analisaram amostras de alimentos em escolas do município de Lavras e encontraram uma amostra de salada de frutas com contagem de coliformes termotolerantes superior ao limite da RDC nº12/2001. Smanioto et al<sup>15</sup>, encontraram 100 % das amostras de frutas minimamente processadas aptas para o consumo.

A presença de coliformes termotolerantes em alimentos indica contaminação de origem fecal, além de contaminação por outros patógenos de origem não entérica<sup>5</sup>. Assim, é possível perceber a importância do uso de BPF no preparo destas saladas de frutas, já que a contaminação por coliformes termotolerantes está associada às más condições de higiene e contaminações cruzadas. Além da má qualidade higiênico-sanitária, o alimento representa risco para o consumidor.

De acordo com os resultados obtidos, não foi encontrada *Salmonella* em nenhuma das quarenta amostras. Da mesma forma, Aguiar et al<sup>12</sup> analisando dez amostras de salada de frutas em mercados e padarias do município de Passo Fundo, também encontraram 100 % das amostras livres deste micro-organismo. Resultado semelhante foi obtido por o Lins et al<sup>1</sup> que analisaram saladas de frutas no Ceará. Entretanto, Pinheiro et al<sup>13</sup> encontraram 25 % das amostras de abacaxi minimamente processado contaminadas por *Salmonella*. O pH ácido, característico deste fruto, associado à refrigeração inibem o crescimento deste micro-organismo, portanto a contaminação pode estar associada à manipulação e armazenamento inadequados.

O conhecimento das BPF pelos manipuladores de alimentos minimamente processados é crucial para um produto final de qualidade, a qual é diretamente influenciada pelos fatores: i) qualidade da matéria-prima;

ii) qualidade da água utilizada no processo;  
iii) condição de higiene do local, do manipulador e dos utensílios; iiiii) tempo e temperatura de armazenamento. Deve-se dar atenção principalmente às condições de higiene no preparo, para que não ocorra contaminação cruzada, pois este tipo de alimento é consumido *in natura* e não é tratado termicamente.

## CONCLUSÃO

As saladas de frutas foram amplamente comercializadas nos quiosques das praias de Florianópolis durante a temporada de verão, mesmo não fazendo parte do conjunto de alimentos permitidos pela prefeitura para estes estabelecimentos. Os valores de coliformes termotolerantes ultrapassam o limite estabelecido pela RDC nº 12/2001 - Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos, em apenas duas das 40 amostras, as quais foram classificadas como impróprias para o consumo humano. Não foi detectada a presença de *Salmonella* em nenhuma das amostras analisadas. O resultado satisfatório das análises microbiológicas pode estar associado ao horário em que as coletas foram realizadas, bem como às condições intrínsecas da salada de frutas, que mesmo sendo um alimento de alto teor de água, possui pH baixo o suficiente para inibir o crescimento dos micro-organismos pesquisados.

## REFERÊNCIAS

1. Lins ADF, Lima ALR, Moraes MS, Sampaio ACF, Costa ML, Quirino DJG. Qualidade microbiológica de saladas de frutas comercializadas em três municípios do Cariri Cearense. *Rev AGROTEC*. 2014;35(1):203-7. [acesso 2015 Jul 01]. Disponível em: [http://www.ies.ufpb.br/ojs/index.php/at/article/download/23369/12771].
2. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Pesquisa de Orçamentos Familiares: Aquisição alimentar domiciliar per capita. Brasil e Grandes Regiões. Brasília: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2010. [acesso 2015 Jul 01]. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/pesquisas/pesquisa\_resultados.php?id\_pesquisa=25].
3. International Commission on Microbiological Specification for Foods - ICMSF. Microorganismos em Alimentos. Utilização de dados para a avaliação do controle de processo e aceitação de produto. 1ª ed. São Paulo (SP): Blucher; 2015.
4. 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, nº7-E. p.45-53.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004. Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 16 set. 2004.
6. World Health Organization - WHO. The World Report 2002: Reducing Risks, Promoting Healthy Life. Geneva: World Health Organization; 2002. [acesso 2015 Jul 01]. Disponível em: [http://www.who.int/whr/2002/en/].
7. Ministério da Saúde (BR), Secretaria de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. [acesso 2016 Jul 13]. Disponível em: [http://u.saude.gov.br/images/pdf/2015/novembro/09/Apresenta---o-dados-gerais-DTA-2015.pdf].
8. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 218, de 29 de julho de 2005. Dispõe sobre Regulamento Técnico de Procedimentos Higiênico-Sanitários para Manipulação de Alimentos e Bebidas Preparados com Vegetais. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 01 ago. 2005.
9. Prefeitura Municipal de Florianópolis. Secretaria Municipal de Meio Ambiente e Desenvolvimento Urbano. EDITAL DE CREDENCIAMENTO Nº 012 / PMF / SMDU / SESP / 2014. [acesso 2015 Jul 01]. Disponível em: [http://www.pmf.sc.gov.br/arquivos/arquivos/pdf/15\_10\_2014\_11.30.35.7a13f9a168862e5cc69785d7b41c2f2a.pdf].
10. Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. São Paulo: Varela; 2010.
11. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo de 2010. Diário Oficial [da] União. Brasília: 2010. [acesso 2016 Jul 13]. Disponível em: [http://censo2010.ibge.gov.br/resultados.html].

12. Aguiar C, Oliveira AP, Nascimento GM, Ceolin G, Rodrigues LB, Nunes EAF. Avaliação microbiológica de saladas de frutas comercializadas em de Passo Fundo, RS. [acesso 2015 Jul 01]. Disponível em: [<http://www.sovergs.com.br/site/higienistas/trabalhos/10506.pdf>].
13. Pinheiro NMS, Figueiredo EAT, Figueiredo RW, Maia GA, Souza PHM. Avaliação da qualidade microbiológica de frutos minimamente processados comercializados em supermercados de Fortaleza. *Rev Bras Frutic*. 2005;27(1):153-6.
14. Borges JG, Mendonça KS, Batista LR. Qualidade higiênico-sanitária de alimentos oferecidos em escolas públicas no município de Lavras. [acesso 2015 Jul 01]. Disponível em: [<http://www.proex.ufla.br/conex/ivconex/arquivos/trabalhos/a126.pdf>].
15. Smanioto TE, Pirolo NJ, Simionato EMRS, Arruda MC de. Qualidade microbiológica de frutas e hortaliças minimamente processadas. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2009;68(1):150-4.



# Determinação do teor de proteínas e carboidratos totais em suplementos tipo *Whey Protein*

## Determination of proteins and total carbohydrates in *Whey Protein* supplements

RIALA6/1701

Renata Cristina SCARLATO<sup>1\*</sup>, Nara Godinho Motta MIRANDA<sup>1</sup>, Rafaelle Silva da COSTA<sup>2</sup>, Karla Mayara Arguelles SIMÕES<sup>3</sup>, Ingrid Kelle da Silva VIDAL<sup>4</sup>, Eliane Cristina Pires do REGO<sup>1</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Laboratório de Análise Orgânica, Divisão de Metrologia Química, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. Av. Nossa Senhora das Graças, 50, CEP: 25250-020, Xerém, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil. Tel: 21 2145 3069. E-mail: renatascarlato@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Universidade do Grande Rio Prof. José de Souza Herdy – UNIGRANRIO

<sup>3</sup>Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ

<sup>4</sup>Centro Educacional Cozzolino– CEC

Recebido: 07.04.2015 - Aceito para publicação: 16.12.2015

### RESUMO

O consumo de *whey protein*, no Brasil e no mundo, aumentou nos últimos anos em decorrência da preocupação com a saúde e bem-estar físico. Atualmente, estão disponíveis no comércio uma série de marcas e diferentes tipos de *whey protein*. Os estudos têm demonstrado irregularidades na composição química de amostras analisadas, e em especial, nos teores de proteínas e carboidratos totais, em comparação com os citados nos respectivos rótulos. Neste trabalho, foram avaliadas 15 amostras de *whey protein* concentrado quanto aos teores de carboidratos totais por meio de Lane Eynon e de nitrogênio total e proteínas por Kjeldahl. As metodologias utilizadas são oficiais e os métodos analíticos foram previamente validados. Os resultados obtidos foram comparados com os valores expressos nos rótulos dos produtos. Para o teor de carboidratos totais, das 15 amostras avaliadas, apenas quatro atenderam ao conteúdo indicado no rótulo. Quanto ao teor proteico, duas amostras não atenderam aos valores expressos no rótulo, considerando-se o limite de tolerância de  $\pm 20\%$ , de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Sugere-se a criação de normas específicas para esse tipo de produto, para estabelecer uma melhor fiscalização e garantia da qualidade, que beneficiarão os seus consumidores.

**Palavras-chaves.** informação nutricional, saúde, soro de leite, suplementos.

### ABSTRACT

In the recent years, the consumption of *whey protein* has increased in Brazil and in the world, due to the health concerns and the physical well-being. Currently, diverse brands and types of *whey protein* are commercially available. Several studies have shown irregularities in the chemical composition of analyzed samples, mainly in protein and total carbohydrate contents, when compared with those indicated in the labels. This study evaluated 15 samples of concentrated *whey protein* purchased in the Rio de Janeiro city. The total carbohydrate contents were determined by Lane Eynon, and the total nitrogen and protein by means of Kjeldahl. The used methodologies are official; and the analytical methods were previously validated. The results were compared with the values expressed in the respective products labels. For the total carbohydrate contents, of 15 evaluated samples only four complied with the labels. For protein contents, two samples did not meet the amounts stated on the label, considering the tolerance limit of  $\pm 20\%$ , according to the ANVISA (Brazilian Agency for Health Surveillance). It is suggested to institute the specific standards for this type of product, for establishing better supervision and quality assurance, which will be profitable to the consumers.

**Keywords.** nutritional facts, health, whey, supplements.

## INTRODUÇÃO

*Whey protein* é a proteína do soro do leite extraída durante a fabricação de queijo<sup>1</sup>. Atualmente, é utilizado como matéria-prima em suplementos proteicos para atletas e na indústria alimentícia como aditivo na fabricação de uma série de produtos, como fórmulas infantis, alimentos fortificados e com teor lipídico reduzido, produtos cárneos, lácteos e de panificação<sup>2</sup>.

O crescimento nas vendas desse tipo de suplemento foi impulsionado, no ano de 2005, com o lançamento de campanhas publicitárias com jogadores de *rugby* de alta visibilidade, que anunciaram aos consumidores em geral os suplementos proteicos associados ao ganho de massa muscular<sup>3</sup>.

As proteínas solúveis do soro do leite apresentam excelente perfil de aminoácidos essenciais, sendo caracterizadas como proteínas de alto valor biológico<sup>4</sup>.

Durante o processamento do suplemento, a gordura e a lactose são filtradas e separadas, para se obter uma proteína mais concentrada, com menor teor de carboidratos e de lipídios. A pureza do *whey protein* encontrado no comércio varia de 35 a 95 %, sendo o restante dos compostos essencialmente gorduras e carboidratos<sup>1</sup>. A utilização das proteínas presentes no soro do leite bovino evidenciam propriedades favoráveis à saúde, como a redução do risco de doenças crônicas, degenerativas e infecciosas, proteção do organismo contra micro-organismos patogênicos e proteção à mucosa gástrica contra ação de agentes ulcerogênicos<sup>5</sup>.

Diversos trabalhos têm demonstrado as propriedades fisiológicas e funcionais das proteínas do soro do leite como auxiliares na síntese proteica muscular esquelética, no processo de redução da gordura corpórea e no aumento do desempenho físico, embora sejam necessários novos estudos para verificar a real eficácia do *whey protein*<sup>6</sup>.

Apesar do aumento no estímulo ao consumo de *whey protein*, existem estudos que são contra sua utilização. Richard Miller<sup>3</sup>, da Associação Dietética Britânica diz que, para a maioria dos usuários de academia, um litro de

leite fornece proteína suficiente para a recuperação muscular, não sendo necessário o consumo do suplemento proteico para atletas.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) regula os alimentos para atletas através da RDC nº 18, no qual o *whey protein* é classificado como “suplemento proteico para atletas”. Segundo essa resolução, este deve conter, no mínimo, 10 g de proteínas por porção recomendada para consumo pelo fabricante<sup>7</sup>.

Segundo estudos recentemente divulgados, amostras de *whey protein* comercializadas no Brasil apresentaram irregularidades quanto à composição nutricional<sup>8-11</sup>, considerando-se os limites de tolerância de  $\pm 20$  % em relação aos valores de nutrientes declarados na rotulagem<sup>12</sup>.

Considerando o aumento do consumo de *whey protein* pelos brasileiros e as irregularidades na composição de proteínas e carboidratos em amostras analisadas no Brasil e recentemente divulgadas, o presente estudo teve como objetivo avaliar quantitativamente a composição química de carboidratos e proteínas em 15 amostras adquiridas no comércio varejista da cidade do Rio de Janeiro, avaliando-se a adequação da composição desses nutrientes com relação ao rótulo<sup>12</sup> e à legislação vigente<sup>7</sup>.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Materiais

Foram adquiridas, aleatoriamente, 15 amostras de *Whey Protein* no comércio varejista da cidade do Rio de Janeiro, sendo estas de marcas e sabores variados, a fim de se obter uma amostragem composta por produtos com diferentes características, que representasse algumas das diferentes opções existentes no mercado. As características descritas no rótulo (sabor, teor de carboidratos e teor proteico total, respectivamente) de acordo com a rotulagem, são descritas a seguir: 1) Chocolate, 17,95 %, 66,67 %; 2) Morango, 16,67 %, 70,00 %; 3) Chocolate, 10,33 %, 76,67 %; 4) *Cookies* de chocolate, 15,76 %, 69,70 %; 5) Chocolate, 13,67 %, 76,67 %; 6) Baunilha, 11,67 %, 73,33 %; 7) Baunilha com pedaços de banana, 11,25 %, 75,00 %; 8) Morango, 5,56 %, 72,22 %;



9) Chocolate, 25,00 %, 62,50 %; 10) Morango e banana, 36,37 %, 53,33 %; 11) *Cookies & cream*, 11,67 %, 73,33 %; 12) Morango, 10,00 %, 73,33 %; 13) Morango, 7,41 %, 74,07 %; 14) Chocolate, 5,56 %, 77,78 %; 15) Morango, 7,14 %, 78,57 %.

## Métodos

As análises foram realizadas no ano de 2014, nas dependências do Inmetro (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia), utilizando-se métodos oficiais<sup>13-16</sup> e validados no Laboratório de Análise Orgânica (Labor). Para a pesagem das amostras, utilizou-se balança analítica eletrônica, modelo XP 205, com resolução de 0,01 mg, devidamente calibrada.

## Determinação do teor de proteínas por Kjeldahl

Para determinar o teor de Nitrogênio total e proteínas nas amostras, utilizou-se Sistema Kjeldahl, composto por Bloco Digestor Speed Digestor modelo K-436, Scrubber ou Lavador de Gases modelo K-415 e Destilador Kjelflex modelo K-355. A etapa de titulação foi realizada utilizando-se Titulador Automático Titrino Plus 848 e Unidade de Troca 806.

Paralelamente às análises realizadas no sistema Kjeldahl, um grupo de pesquisadores do Inmetro avaliou qualitativamente a origem proteica das amostras de *whey*, a fim de detectar a presença de proteínas não lácteas nas amostras. Os resultados obtidos foram utilizados para determinar o fator de conversão de nitrogênio em proteínas a ser utilizado nos cálculos, sendo utilizado o fator 6,38 nas amostras cuja fonte proteica utilizada é exclusivamente láctea, e o fator 6,25 para mistura de proteína láctea com outras fontes proteicas, como proteínas de soja e de trigo<sup>16</sup>, sendo que a adição de outras fontes proteicas não lácteas em produtos denominados *Whey Protein* é caracterizada como fraude. A análise foi realizada em cinco replicatas verdadeiras para cada uma das 15 amostras. A massa pesada foi de 1,0 g e utilizou-se 20 mL de ácido sulfúrico concentrado para a digestão.

Para verificar a eficiência das etapas de digestão e de destilação, utilizou-se, respectivamente, padrão de glicina (ácido

aminoacético) e dihidrogenofosfato de amônio. Utilizou-se também um Material de Referência Certificado (MRC) de leite em pó integral, para garantia da rastreabilidade dos resultados (MRC BCR<sup>®</sup>-380 R – Whole Milk Powder - IRMM (Institute for Reference Materials and Measurements)) e para verificação da exatidão do método. Procedeu-se, paralelamente, a determinação do teor de água no MRC por meio de Titulação Karl Fischer Coulométrica, utilizando-se Titulador Karl Fischer Coulométrico, modelo 831, para cálculo do resultado em base seca, a fim de comparação com o valor certificado.

Todos os reagentes utilizados nas análises realizadas possuem elevado grau de pureza ( $\geq 99\%$ ).

## Determinação do teor de carboidratos totais por Lane Eynon

Utilizou-se Determinador de Açúcares Redutores, modelo TE-088 e na etapa de titulação, Dosadora Dosimat Plus modelo 876 e unidade de troca modelo 806, para quantificação dos carboidratos presentes nas amostras.

Inicialmente, foram realizados testes qualitativos para detecção de amido e de sacarose em todas as amostras<sup>14</sup>, para verificar a necessidade de utilização de diferentes metodologias e diferentes formas de preparo das amostras, de acordo com a complexidade dos carboidratos presentes nas mesmas (determinação de glicídios redutores em glicose, determinação de glicídios não redutores em sacarose e quantificação de teor de amido). O teste indicou ausência de sacarose em todas as amostras e presença de amido em uma das amostras. Foram realizados testes qualitativos falso-positivos, a fim de verificar a eficácia do método colorimétrico. Para estes, utilizou-se padrões de sacarose (CAS 126-14-7) e de amido (CAS 9005-25-8).

As análises foram realizadas em três replicatas verdadeiras e não se utilizou MRC na determinação desse nutriente, por não existir no mercado algum que seja certificado pelo mesmo método utilizado no ensaio.

## Análise estatística

Para cada amostra analisada, em cada

nutriente, determinou-se o Desvio Padrão (DP), o Desvio Padrão Relativo (DPR %) e a Variância. Por meio da análise do MRC, calculou-se a exatidão do método de determinação de proteínas, assim como o erro relativo (%), a fim de comparar o valor certificado com o obtido.

Calculou-se a incerteza expandida U (g/100g), considerando o fator de abrangência  $k = 2$  e nível de confiança de 95 %. O nível de significância foi de 5 % ( $p < 0,05$ ). As fontes de incerteza consideradas foram a incerteza da balança e da repetibilidade de medição.

A diferença entre teor expresso no rótulo e o obtido na análise também foi calculado para comparação com a legislação vigente.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise dos padrões de glicina e dihidrogenofosfato de amônio, obteve-se recuperação de 99 % e 98 % respectivamente, valores que estão dentro do critério de aceitação (98 % a 102 %). Para o MRC de leite em pó integral,

obteve-se 100,54 % de exatidão e uma média de 28,81 g/100 g de proteínas em base seca, estando dentro da faixa especificada no certificado (28,38 a 28,94 g/100 g em base seca). O erro relativo obtido foi de 0,5356 %, com critério de aceitação inferior a 2 %.

Na **Tabela 1** estão apresentados os resultados obtidos nas análises de teor de carboidratos das amostras de *whey protein* expressos em base úmida, e a comparação com os respectivos valores expressos no rótulo.

Não há uma legislação que estipule limites superiores e inferiores para os teores de carboidratos e proteínas em suplementos do tipo *whey protein*, existindo somente um limite de tolerância de  $\pm 20$  % entre o valor declarado no rótulo e o valor analítico obtido<sup>12</sup>. Sendo assim, a avaliação dos resultados obtidos na análise das amostras de *whey protein* foi feita considerando-se este limite de tolerância. Para carboidratos, podemos concluir que apenas as amostras 2, 9, 10 e 12, dentre as 15 amostras avaliadas, atenderam à resolução. Esta não conformidade

**Tabela 1.** Teor de carboidratos totais em base úmida (g/100 g ou %), Desvio padrão (DP), Desvio Padrão Relativo (DPR %), Variância, Incerteza Expandida (U, g/100 g ou %) e diferença entre o teor obtido e o teor expresso no rótulo (%) nas 15 amostras analisadas, Inmetro, 2014

Amostra	Carboidratos (%)	DP	DPR (%)	Variância	U (%)	Diferença obtido/rótulo (%)
01	8,95	0,06	0,68	0,0037	( $\pm 0,07$ )	- 50,14
02	18,54	0,72	3,87	0,5149	( $\pm 0,83$ )	+ 11,24
03	12,85	0,35	2,70	0,1202	( $\pm 0,40$ )	+ 24,35
04	20,87	0,27	1,28	0,0716	( $\pm 0,31$ )	+ 32,44
05	6,70	0,25	3,70	0,0615	( $\pm 0,29$ )	- 50,98
06	41,70	2,00	4,79	3,9940	( $\pm 2,31$ )	+ 257,43
07	45,06	1,01	2,24	1,0194	( $\pm 1,17$ )	+ 300,53
08	7,32	0,08	1,13	0,069	( $\pm 0,10$ )	+ 31,76
09	20,77	0,18	0,87	0,0323	( $\pm 0,21$ )	- 16,92
10	32,39	1,29	3,98	1,6591	( $\pm 1,49$ )	- 11,66
11	7,24	0,30	4,19	0,0921	( $\pm 0,35$ )	- 37,94
12	8,02	0,12	1,47	0,0139	( $\pm 0,14$ )	- 19,80
13	12,17	0,04	0,31	0,0014	( $\pm 0,04$ )	+ 64,30
14	6,75	0,03	0,39	0,0007	( $\pm 0,03$ )	+ 21,50
15	10,89	0,07	0,66	0,0051	( $\pm 0,08$ )	+ 52,46

do teor de carboidratos caracteriza uma fraude ao consumidor, tanto do ponto de vista econômico quanto nutricional, já que o consumidor espera ingerir uma quantidade maior de proteínas e acabar por ingerir uma maior quantidade de carboidratos, não obtendo os resultados corporais esperados como, por exemplo, o maior ganho de massa muscular. As amostras 06 e 07 apresentaram teores de carboidratos muito acima do expresso em seus respectivos rótulos (+ 257,43 e + 300,53), respectivamente, gerando um alto prejuízo ao consumidor, já que os carboidratos possuem menor valor econômico e biológico comparados às proteínas.

Laudos de análise fiscal emitidos pelo Instituto Adolfo Lutz também demonstraram resultado insatisfatório para o ensaio de carboidratos, por ter sido detectada quantidade de carboidratos superior, em mais de 20 %, ao valor declarado no rótulo do produto<sup>8-11</sup>.

Na **Tabela 2** estão apresentados os resultados obtidos nas análises de teor de proteínas das amostras de *whey protein* expressos em

base úmida, e a comparação com os respectivos valores expressos no rótulo.

Observando os resultados expressos na **Tabela 2**, pode-se concluir que as amostras 6 e 7 não atenderam à resolução no parâmetro teor proteico, apresentando-se abaixo do limite inferior de tolerância (-20 %) estabelecido<sup>12</sup>. Este tipo de inadequação causa prejuízos econômicos e nutricionais, já que o consumidor irá adquirir um alimento de valor econômico e nutricional inferior ao esperado, não obtendo os benefícios esperados à saúde.

A partir dos resultados obtidos neste estudo e no tamanho da porção declarada nos rótulos das amostras avaliadas, calculou-se a quantidade de proteínas por porção de amostra indicada pelo fabricante.

De acordo com o manual de referência orientativo para produtos à base de *whey* e lactose<sup>2</sup>, o *whey protein* concentrado é classificado conforme o teor de proteínas presente. As empresas que adquirem este produto devem atentar-se à sua classificação para não subestimarem

**Tabela 2.** Teor de proteínas em base úmida (g/100 g ou %), Desvio padrão (DP), Desvio Padrão Relativo (DPR %), Variância, Incerteza Expandida (U, g/100 g ou %) e diferença entre o teor obtido e o teor expresso no rótulo (%) nas 15 amostras analisadas, Inmetro, 2014

Amostra	Proteínas (%)	DP	DPR (%)	Variância	U (%)	Diferença obtido/rótulo (%)
01	71,31	0,10	0,13	0,0102	(± 0,08)	+ 6,97
02	65,09	0,39	0,57	0,1548	(± 0,33)	- 7,01
03	67,24	0,69	0,96	0,4798	(± 0,65)	- 12,31
04	69,30	0,24	0,33	0,0593	(± 0,21)	- 0,57
05	80,54	1,21	1,43	1,4616	(± 1,03)	+ 5,05
06	50,58	0,36	0,68	0,1312	(± 0,31)	- 31,02
07	53,77	0,41	0,71	0,1650	(± 0,34)	- 28,31
08	72,60	0,72	0,91	0,5220	(± 0,59)	+ 0,52
09	63,23	0,27	0,41	0,0744	(± 0,23)	+ 1,17
10	49,83	0,33	0,63	0,1093	(± 0,28)	- 6,57
11	77,02	0,48	0,59	0,2315	(± 0,41)	+ 5,03
12	71,10	0,54	0,71	0,2941	(± 0,45)	- 3,05
13	71,83	0,21	0,27	0,0448	(± 0,18)	- 3,03
14	71,12	0,42	0,55	0,1726	(± 0,35)	- 8,56
15	76,30	1,06	1,30	1,1184	(± 0,88)	- 2,89

ou superestimarem os teores de proteínas e carboidratos presentes, adotando um controle de qualidade rígido no recebimento do mesmo. Diferenças na matéria-prima, assim como nos sistemas de processamento do produto, podem ocasionar alterações nas propriedades funcionais e nutricionais do produto à base de *whey*<sup>2</sup>. As indústrias devem investir no processo de microfiltração, para aumentar a concentração de proteínas nas amostras de *whey* e reduzir a concentração de componentes indesejáveis neste tipo de produto, como lactose e gorduras<sup>1</sup>.

Comparando os teores de proteína na porção indicada para consumo pelos fabricantes nos rótulos dos produtos e os teores obtidos nas análises realizadas, calculados para as porções indicadas para consumo pelos fabricantes, podemos concluir que as 15 amostras de *Whey Protein* avaliadas atenderam à RDC nº 18<sup>7</sup>, que determina que o produto pronto para consumo deve conter, no mínimo, 10 g de proteína na porção. Os teores de proteínas (g) declarados pelo fabricante e obtidos nas análises (g) nas porções indicadas para consumo foram de, respectivamente, 39 g e 27,81 g; 30 g e 19,53 g; 30 g e 20,17 g; 33 g e 22,87 g; 30 g e 24,16 g; 30 g e 15,17 g; 40 g e 21,51 g; 36 g e 26,14 g; 40 g e 25,29 g; 30 g e 14,95 g; 30 g e 23,11 g; 30 g e 21,33 g; 27 g e 19,39 g; 36 g e 25,60 g; 28 g e 21,36 g, nas amostras de suplemento nomeadas de 01 a 15, respectivamente.

O fato de não existir um padrão de identidade e qualidade para produtos à base de *whey* dificulta o controle e monitoramento do produto, uma vez que não há especificação para as características qualitativas e quantitativas que defina um critério de qualidade aceitável. Sugerimos uma maior fiscalização desse tipo de produto, em especial da origem proteica, já que algumas fontes de proteínas presentes nestes produtos, quando não declaradas no rótulo, podem representar grave risco à saúde do consumidor, por tratar-se de compostos alergênicos.

## CONCLUSÃO

A inadequação nos teores de carboidratos e proteínas em amostras de *whey protein* lesa os

consumidores do produto, que os adquirem na tentativa de aumentar a ingestão proteica e que muitas vezes não obtêm a ingesta de proteínas esperada, sem obter, conseqüentemente, os resultados fisiológicos almejados.

Sugere-se que as empresas que comercializam esse tipo de suplemento nutricional realizem um controle de qualidade mais eficaz com relação às matérias-primas adquiridas, evitando assim a ocorrência desse tipo de alteração nas propriedades nutricionais dos produtos.

As normas existentes devem ser mais específicas no que concerne aos limites superiores e inferiores de tolerância para os teores de proteínas e carboidratos neste tipo de produto.

## AGRADECIMENTO

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo n. 563070/2010-2, pelo financiamento do projeto e concessão de bolsas de pesquisa científica.

## REFERÊNCIAS

1. Bachi G. *Dieta com Whey protein: os benefícios do soro do leite para a sua saúde*. Editora Matrix; 2013. 120 p.
2. Page J, Meyer D, Haines B, Lagrange V, Kenney A, Usdec Staff (Publishers), Contributor: Clark Jr; WS. Reference Manual for U.S. Whey and Lactose Products [Internet]. U.S. Dairy Export Council – USA, 226 p. Updated June; 2004. [acesso 2015 Jan 30]. Disponível em: [http://usdec.files.cms-plus.com/PDFs/2008ReferenceManuals/Whey\_Lactose\_Reference\_Manual\_Complete2\_Optimized.pdf].
3. The Economist. The protein-supplement industry takes a punch. Proteinshakes. Bruising. The Economist Newspaper Ltda. [acesso 2015 Jan 30]. Disponível em: [http://www.economist.com/news/britain/21576679-protein-supplement-industry-takes-punch-bruising].
4. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization). Protein quality evaluation; Report of Joint FAO/WHO expert consultation. Rome: WHO; 1991. 66 p.

5. Sgarbieri VC. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. *Rev Nutr*. 2004;17(4):397-409. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-52732004000400001>].
6. Haraguchi FK, Abreu WC, Paula H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. *Rev Nutr*. 2006;19(4):479-88. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-52732006000400007>].
7. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 18, de 27 de abril de 2010. Dispõe sobre alimentos para atletas. Aprova o Regulamento Técnico sobre Alimentos para Atletas. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 28 abr. 2010. Seção 1, nº 79. p. 211-2.
8. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 728, de 27 de fevereiro de 2014. Proíbe a distribuição e comercialização de produtos Suplementos/ Alimentos Proteicos para Atletas. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 28 fev. 2014. Seção 1, nº 42. p. 68.
9. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 729, de 27 de fevereiro de 2014. Proíbe a distribuição e comercialização de produtos Suplementos/ Alimentos Proteicos para Atletas. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 28 fev. 2014. Seção 1, nº 42. p. 68.
10. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 730, de 27 de fevereiro de 2014. Proíbe a distribuição e comercialização de produtos Suplementos/ Alimentos Proteicos para Atletas. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 28 fev. 2014. Seção 1, nº 42. p. 68.
11. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 731, de 27 de fevereiro de 2014. Proíbe a distribuição e comercialização de produtos Suplementos/ Alimentos Proteicos para Atletas. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 28 fev. 2014. Seção 1, nº 42. p. 68.
12. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Aprova o Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, de 26 dez. 2003. Seção 1, nº 251. p. 33-4.
13. Association of Official Analytical Chemists – AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th ed. Current through Revision 2. Washington (DC): AOAC International; 2007.
14. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA). Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes. II- Métodos físicos e químicos. Brasília (DF): LANARA; 1981.
15. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006. Métodos Analíticos Oficiais Físico Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 14 de dez. 2006. Seção 1, nº 239. p.8-30.
16. Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. Zenebon O, Pascuet N S, Tiglea P, coordenadores. 4ª ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz; 2008. 1020 p.



# Prevalência e perfil de sensibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de hemoculturas realizadas em hospitais particulares

## Prevalence and profile of antimicrobial sensitivity of bacteria isolated from blood culture performed at private hospitals

RIALA6/1702

Teline Scheffer DALLACORTE<sup>1</sup>, Denise Michelle INDRAS<sup>2</sup>, Jorge Juarez Vieira TEIXEIRA<sup>3</sup>, Leyde Daiane de PEDER<sup>1</sup>, Claudinei Mesquita da SILVA<sup>1</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Laboratório de Análises Clínicas, Centro Universitário da Fundação Assis Gurgacz, Avenida das Torres, 500, Cascavel, PR, Brasil, CEP: 85806-095. Tel: 45 3321 3900. Email: leydepeder@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Laboratório Biovel Análises e Pesquisas Clínicas, Cascavel, PR

<sup>3</sup>Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR

Recebido: 05.02.2016 - Aceito para publicação: 25.07.2016

### RESUMO

O presente estudo teve por objetivo determinar o perfil etiológico e a sensibilidade antimicrobiana dos principais micro-organismos isolados do sangue de pacientes internados em hospitais privados de Cascavel/PR, por meio de análise de laudos de hemoculturas, realizadas no período de janeiro de 2012 e dezembro de 2014. De 5059 exames realizados, 613 (12,12 %) apresentaram hemocultura positiva, com predominância em amostras de pacientes do sexo masculino (59,54 %) e em indivíduos acima de 50 anos (70,29 %). Foram isoladas 27 espécies bacterianas, sendo *Staphylococcus aureus* a mais prevalente (17,94 %), seguida por *Staphylococcus epidermidis* (16,26 %) e *Klebsiella pneumoniae* (14,52 %). Os cocos Gram positivos (CGP) apresentaram maior sensibilidade à vancomicina e minociclina, enquanto as Enterobacteriaceae e *Pseudomonas aeruginosa* foram sensíveis aos antibióticos imipenem e meropenem. *Acinetobacter baumannii* foi a espécie que apresentou maior resistência aos antimicrobianos, com sensibilidade intermediária apenas à polimixina B e tigeciclina. O presente estudo demonstrou que os CGP são as bactérias mais prevalentes em exames de hemoculturas realizados nos hospitais analisados, com destaque para *S. aureus* e *S. epidermidis*. O teste de sensibilidade aos antimicrobianos não é uma estratégia comumente aplicada apesar de sua importância na utilização adequada de antibioticoterapia, e para evitar o tratamento incorreto e a resistência bacteriana.

**Palavras-chaves.** bacteriemia, hospitais, epidemiologia, antimicrobianos, hemocultura.

### ABSTRACT

This study aimed at determining the etiologic profile and the antimicrobial sensitivity of the foremost microorganisms isolated from blood samples collected from in patients admitted in private hospitals in Cascavel/PR. For this purpose, the blood culture reports carried out from January 2012 to December 2014 were analyzed. Of 5059 patient records, 613 (12.12 %) indicated positive blood culture, predominantly in males (59.54 %) and in individuals over 50 years of age (70.29 %). Twenty-seven bacterial species were isolated, and *Staphylococcus aureus* was the most prevalent (17.94 %), followed by *Staphylococcus epidermidis* (16.26 %) and *Klebsiella pneumoniae* (14.52 %). Gram positive cocci (GPC) showed the highest sensitivity to vancomycin and minocycline, and Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* to imipenem and meropenem. *Acinetobacter baumannii* showed the highest resistance to antimicrobial drugs, with intermediate sensitivity to polymyxin B and tigecycline only. This study showed that the GCP are the most prevalent bacteria in blood cultures performed in the analyzed hospitals, particularly *S. aureus* and *S. epidermidis*. The antimicrobial sensitivity test has not been a methodology regularly applied, despite being very important for the properly and correctly use of antibiotics, and for preventing the incorrect treatment and the bacterial resistance.

**Keywords.** bacteremia, hospitals, epidemiology, antimicrobial agents, blood culture.

## INTRODUÇÃO

A bacteriemia, comprovada laboratorialmente pela hemocultura, consiste na presença de micro-organismos viáveis na corrente sanguínea. É um problema de grande relevância, relacionado diretamente ao aumento nas taxas de morbidade e mortalidade, e representa uma das mais significativas complicações no processo infeccioso<sup>1</sup>. As infecções da corrente sanguínea (ICS), no ambiente hospitalar, aumentam o tempo de hospitalização do paciente, elevando o custo do tratamento, o que exige a implantação de um processo de vigilância diária das hemoculturas<sup>2</sup>. Segundo o ILAS – Instituto Latino Americano de Sepsis, as ICS são responsáveis por 25 % da ocupação de leitos em UTI e a letalidade atribuída no Brasil é de 65 %, enquanto que a média mundial é de 30 a 40 %<sup>3</sup>.

O ambiente hospitalar possui fatores que tornam os pacientes mais susceptíveis aos micro-organismos. São exemplos de fatores, o número de procedimentos, o tempo de internação hospitalar, internação em unidade de terapia intensiva (UTI), cirurgia, *Diabetes mellitus*, cirrose hepática e queimaduras<sup>4,5</sup>. As ICS são importantes fontes de geração de custos tanto nos setores públicos quanto privados de saúde, devido à utilização de equipamentos sofisticados, medicamentos de alto custo e trabalho extra da equipe médica e de enfermagem. Estudos estatísticos realizados nos Estados Unidos da América estimaram que anualmente ocorrem 250.000 episódios de bacteriemias nosocomiais, o que representa a décima causa mais frequente de óbito naquele país<sup>6</sup>. No Brasil, aconteceram 227.000 mortes por choque séptico em 2003, com cerca de 17,34 bilhões de reais destinados ao tratamento<sup>5</sup>.

Em 1983, o Ministério da Saúde instituiu a Portaria 196, revogada pela Portaria 930/92, também revogada pela Portaria 2.616/98, que determinava que todos os hospitais do país deveriam manter uma Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) independente da entidade mantenedora<sup>7-9</sup>. A Portaria foi um passo importante na constituição de CCIHs por todo país. Em 1997, foi instituída a Lei Federal 9431 que obriga a todos os hospitais além de possuírem

CCIH, instaurar e manter um Programa de Controle de Infecções Hospitalares (PCIH)<sup>10</sup>. De acordo com Sydnor e Perl<sup>11</sup>, um PCIH bem conduzido dentro de um hospital, pode reduzir a taxa de infecção, principalmente pelas orientações de ações básicas de assistência à saúde, como prevenir o uso indiscriminado de antimicrobianos e germicidas hospitalares, o qual evita a resistência e contribui para uma diminuição dos custos hospitalares globais.

A determinação dos micro-organismos mais prevalentes em hemoculturas contribui para a adoção de medidas preventivas para a minimização de contaminações por tais bactérias, com a adoção de técnicas de punção mais seguras e diagnóstico precoce de infecções em outros sistemas orgânicos que podem migrar para a corrente sanguínea<sup>12</sup>. A vigilância de infecções nosocomiais é de grande importância na identificação e controle de cepas com multirresistência aos antimicrobianos, além de minimizar o impacto na morbidade e na mortalidade relacionadas às bacteriemias. Dessa forma, analisar a incidência de bactérias isoladas de hemoculturas realizadas em unidades hospitalares contribui na vigilância da saúde, evitando que toda a coletividade seja afetada por essas bactérias<sup>13</sup>.

A determinação do perfil etiológico e a sensibilidade antimicrobiana dos principais micro-organismos isolados do sangue de pacientes internados em hospitais são de suma importância, pois as infecções da corrente sanguínea são indicativas de infecções graves, levando ao prolongamento da internação hospitalar e aumentando o custo do tratamento de cada paciente. Trata-se, portanto, de assunto importante para a microbiologia médica. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivos a determinação das principais bactérias encontradas em hemoculturas de hospitais privados no município de Cascavel/PR, assim como, o perfil de sensibilidade aos principais antimicrobianos utilizados na prática clínica.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para a execução do presente trabalho, foi realizada a análise de laudos eletrônicos presentes no sistema SIAC (Sistema Integrado de

Análises Clínicas) de um laboratório particular de Cascavel/PR, relativos a pacientes internados em seis hospitais privados do mesmo município, denominados de H1 a H6. Os laudos referem-se ao período compreendido entre 01 de janeiro de 2012 a 31 de dezembro de 2014. Foram excluídas as instituições e hospitais de iniciativa pública e filantrópica localizadas no município e em outros municípios, laudos de hospitais privados de outras localidades e laudos solicitados por seguradoras de saúde que não informavam a unidade hospitalar. A seleção dos laudos eletrônicos e determinação dos dados foram realizadas entre fevereiro e abril de 2015.

De acordo com o laboratório que realizou as análises, o sangue foi coletado com punção venosa diretamente à garrafa de hemocultura específica para aeróbios, com anticoagulante Polianetol sulfonato de sódio (SPS), BacT/ALERT® PF Plus, da empresa bioMérieux, utilizando 10 mL de sangue para adultos, 3 mL para crianças e 1 mL para neonatos.

As garrafas de hemocultura foram incubadas no equipamento BacT/ALERT® 3D 60/240 (bioMérieux, Durham, NC, EUA), que tem como base a detecção por fluorescência ou colorimetria. Geralmente os protocolos são de cinco dias de incubação, mas a grande maioria dos resultados positivos ocorre nas primeiras 48 horas. Os meios de cultura das garrafas apresentam resinas ou carvão que possui ação inibitória para antimicrobianos, útil para amostras de pacientes que receberam antibioticoterapia prévia. Para o isolamento bacteriano das hemoculturas positivas, dois meios de culturas foram utilizados, ágar MacConkey e ágar sangue. Após as sementeiras, estas culturas foram incubadas por 24/48 horas. A identificação e o teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) das bactérias foram realizados pelo aparelho automatizado VITEK 2 compact (bioMérieux). Foram utilizados cartões de identificação para bacilos Gram negativos (GN REF 21 341 - bioMérieux) e cocos gram positivos (GP REF 21 342 - bioMérieux).

O TSA foi realizado por CIM (Concentração Inibitória Mínima) levando em consideração o disposto no Manual *Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI* de 2013<sup>14</sup>.

Para os bacilos Gram negativos, foi utilizado o painel de teste de sensibilidade aos antimicrobianos AST N 239 REF 413204 (bioMérieux), sendo os antimicrobianos testados amicacina, aztreonam, cefazolina, cefepima, cefotaxime, ciprofloxacino, ceftriaxona, ceftazidima, eritromicina, gentamicina, imipenem, levofloxacino, meropenem, piperacilina/tazobactam, polimixina B, trimetoprim/sulfametoxazol, tetraciclina, tigeciclina, tobramicina. E para os cocos Gram positivos, o painel de teste de sensibilidade aos antimicrobianos AST P585 REF 22263 (bioMérieux) compreendeu: clindamicina, daptomicina, eritromicina, gentamicina, linezolida, minociclina, oxacilina, rifampicina, trimetoprim/sulfametoxazol, tetraciclina e vancomicina.

As variáveis analisadas dos laudos foram gênero, idade, positividade ou negatividade na hemocultura de acordo com o hospital, microrganismos encontrados, sensibilidade ou resistência aos antimicrobianos.

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade Assis Gurgacz sob o parecer 857.540 de 08/10/2014.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O município de Cascavel/PR (24° 57' 21" S, 53° 27' 19" W) está localizado na região Oeste do Paraná, possui área territorial de 2.100,831 m<sup>2</sup> e população de 312.778 habitantes, conforme estimativa do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)<sup>15</sup>.

De janeiro de 2012 a dezembro de 2014, foram realizadas 9414 hemoculturas advindas dos 6 hospitais, no entanto, 5059 (53,73 %) laudos foram selecionados, por atenderem os requisitos de inclusão da metodologia. Desses, 613 (12,12 %) apresentaram crescimento bacteriano (hemocultura positiva). A média de prevalência de hemoculturas positivas foi de 19,39 % nos hospitais analisados, contudo, quando analisadas individualmente cada uma das unidades hospitalares, verificou-se que as unidades H4, H5 e H6 tiveram ocorrência de hemoculturas positivas superior a 20,00 %, com destaque para a unidade H6, onde 38,58 % das hemoculturas solicitadas apresentaram crescimento microbiano. Porém esses dados são insuficientes para conclusões, pois o fato de um



hospital ter mais amostras positivas pode indicar que o corpo clínico é mais criterioso para a solicitação da hemocultura, enquanto nos outros com menor positividade, o corpo clínico solicitou mais hemoculturas, mesmo com chance de serem negativas. A **Tabela 1** apresenta os valores relativos aos resultados das hemoculturas analisadas.

Estudos realizados em diferentes hospitais demonstraram perfis de positividade diversos. Enquanto que em um hospital privado da região leste de Minas Gerais verificou-se 18,60 % de

hemoculturas positivas, outro estudo realizado em UTI de um hospital escola de Goiânia/GO, constatou que 7,69 % das 2210 hemoculturas solicitadas apresentaram crescimento microbiano. Entretanto, em uma rede de hospitais privados de Fortaleza/CE, das 1321 hemoculturas solicitadas, 55,94 % apresentaram crescimento microbiano positivo e em outro estudo desenvolvido em um hospital filantrópico de Alfenas/MG, de 846 hemoculturas solicitadas, 47,52 % foram positivas<sup>5,16-18</sup>. Esses estudos demonstram que não há um perfil geral da prevalência e ocorrência de hemoculturas positivas em território brasileiro, corroborando com a necessidade de mais estudos regionais e locais, para conhecer a realidade de cada unidade hospitalar, permitindo que cada uma desenvolva estratégia necessária para a prevenção de bacteriemia e sepse.

Na **Tabela 2**, temos a distribuição da frequência das hemoculturas positivas de acordo com a unidade hospitalar, com o gênero e o ano de isolamento da bactéria.

**Tabela 1.** Distribuição das hemoculturas positivas de seis hospitais privados do município de Cascavel/ PR, no período de 2012 a 2014

	Hemoculturas					
	Positivas		Negativas		Total	
	nº	%	nº	%	nº	%
H1	275	9,38	2657	90,62	2932	100
H2	105	12,85	712	87,15	817	100
H3	93	12,14	673	87,86	766	100
H4	54	22,13	190	77,87	244	100
H5	37	21,38	136	78,61	173	100
H6	49	38,58	78	61,41	127	100
<b>Total</b>	<b>613</b>	<b>12,12</b>	<b>4446</b>	<b>87,88</b>	<b>5059</b>	<b>100</b>

**Tabela 2.** Frequência de hemoculturas positivas distribuídas de acordo com a unidade hospitalar, gênero e ano do estudo, em Cascavel/PR

	2012		2013		2014		Total	
	nº	%	nº	%	nº	%	nº	
H1	Masculino	15	53,57	103	66,02	42	46,15	-
	Feminino	13	46,42	53	33,97	49	53,84	-
	Total	28	100,00	156	100,00	91	100,00	275
H2	Masculino	29	85,29	25	73,52	23	62,16	-
	Feminino	5	14,70	9	26,47	14	37,83	-
	Total	34	100,00	34	100,00	37	100,00	105
H3	Masculino	4	50,00	17	35,41	28	75,67	-
	Feminino	4	50,00	31	64,58	9	24,32	-
	Total	8	100,00	48	100,00	37	100,00	93
H4	Masculino	6	50,00	9	50,00	10	41,66	-
	Feminino	6	50,00	9	50,00	14	58,33	-
	Total	12	100,00	18	100,00	24	100,00	54
H5	Masculino	2	66,67	14	46,67	3	75,00	-
	Feminino	1	33,33	16	53,33	1	25,00	-
	Total	3	100,00	30	100,00	4	100,00	37
H6	Masculino	11	78,57	11	55,00	13	86,67	-
	Feminino	3	21,47	9	45,00	2	13,33	-
	Total	14	100,00	20	100,00	5	100,00	49
<b>Total Geral</b>	<b>99</b>	<b>-</b>	<b>307</b>	<b>-</b>	<b>207</b>	<b>-</b>	<b>613</b>	

Verificou-se que 365 (59,54 %) das hemoculturas positivas correspondiam a pacientes do gênero masculino e 248 (40,45 %) no gênero feminino. Esse resultado difere do estudo realizado por Reis et al<sup>17</sup>, no qual 55,40 % das hemoculturas positivas eram de pacientes do gênero feminino; no entanto, aproxima-se do estudo de Alves et al<sup>2</sup>, no qual 60,00 % dos laudos positivos eram de pacientes do gênero masculino, demonstrando que não há um padrão de hemoculturas positivas e gênero.

Analisou-se também a faixa etária dos pacientes que tiveram hemoculturas positivas, conforme demonstrado na **Tabela 3**.

Grande amplitude de faixa etária foi verificada entre os pacientes acometidos, bebês com menos de um ano e idosos com mais de 100 anos apresentaram hemocultura positiva, sendo que a grande maioria dos casos foi verificada em pacientes com idade superior aos 50 anos, com positividade média de 70,29 % entre os hospitais analisados para essa faixa etária. Após os 50 anos, a grande maioria dos indivíduos já apresenta comprometimento das funções imunológicas. A fragilidade do sistema imunológico é um motivo importante para o desenvolvimento de bacteriemia, contudo, hábitos alimentares e de higiene, presença de alcoolismo e tabagismo, presença do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), câncer, e fatores relacionados com a própria estadia hospitalar, como o tempo de internação, utilização de cateteres, intubação

oro-traqueal e sondas são importantes para o desenvolvimento de bacteriemia e septicemia<sup>12, 19, 20</sup>.

Das 613 hemoculturas positivas analisadas, verificou-se a ocorrência de 27 espécies bacterianas, sendo que a bactéria que apresentou maior prevalência foi *Staphylococcus aureus*, com 17,94 %. A distribuição de todas as bactérias encontradas está compilada na **Tabela 4**.

Verificou-se uma grande diversidade de bactérias identificadas em hemoculturas, incluindo espécies pouco citadas em outros estudos, mas com grande potencial de risco aos pacientes, como *Serratia marscescens*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella oxytoca*, *Burkholderia cepacia*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella* spp. e *Morganella morganii*. Alves et al<sup>2</sup>, Freire et al<sup>21</sup> e Magalhães et al<sup>22</sup> também identificaram grande variedade de bactérias em seus estudos.

O trabalho desenvolvido por Alves et al<sup>2</sup>, para verificar a incidência bacteriana em hemoculturas, encontrou micro-organismos semelhantes, como *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*, mas também identificou *Serratia liquefaciens*, *Enterobacter cloacae* e *Proteus mirabilis*. Freire et al<sup>21</sup> realizou um estudo em uma UTI pediátrica e encontrou grande porcentagem de *S. aureus* e *S. epidermidis*, entretanto o estudo de Magalhães et al<sup>22</sup> encontrou *S. epidermidis*, *S. aureus*, *E. coli* e *Enterobacter* spp, sendo que o último foi o mais prevalente.

**Tabela 3.** Porcentagem de infecção bacteriana em hemoculturas por faixa etária nas diferentes unidades hospitalares, entre 2012 e 2014, em Cascavel/PR

Faixa etária (em anos)	H1		H2		H3		H4		H5		H6		Total	
	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%
0 – 10	12	4,72	6	5,71	7	7,61	2	3,70	5	13,51	7	14,89	39	6,62
11 – 20	2	0,59	3	2,86	5	5,43	0	0,00	0	0,00	0	0,00	10	1,69
21 – 30	13	5,12	4	3,81	8	8,70	3	5,56	0	0,00	0	0,00	28	4,75
31 – 40	12	4,72	7	6,67	1	1,09	1	1,85	1	2,70	1	2,13	23	3,90
41 – 50	21	8,27	17	16,19	13	14,13	7	12,96	3	8,11	8	17,02	69	11,71
51 – 60	60	23,62	22	20,95	15	16,30	12	22,22	6	16,22	8	17,02	123	20,88
61 – 70	53	20,87	19	18,10	20	21,74	12	22,22	14	37,84	11	23,40	129	21,90
71 – 80	57	22,44	17	16,19	13	14,13	12	22,22	6	16,22	10	21,28	115	19,52
81 – 90	19	7,48	9	8,57	9	9,78	5	9,26	2	5,41	2	4,26	46	7,81
91 – 102	5	1,97	1	0,95	1	1,09	0	0,00	0	0,00	0	0,00	7	1,19
<b>Total*</b>	<b>254</b>	<b>100</b>	<b>105</b>	<b>100</b>	<b>92</b>	<b>100</b>	<b>54</b>	<b>100</b>	<b>37</b>	<b>100</b>	<b>47</b>	<b>100</b>	<b>589</b>	<b>100</b>

\*Ausência de idade em alguns laudos

**Tabela 4.** Distribuição e ocorrência das espécies bacterianas identificadas em cada hospital analisado, no período de 2012 a 2014, em Cascavel/PR

Microorganismos	H1		H2		H3		H4		H5		H6		Total	
	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%
<i>Staphylococcus aureus</i>	44	7,18	23	3,75	12	1,96	14	2,28	8	1,30	9	1,47	110	17,94
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	56	9,22	10	1,63	15	2,47	6	0,98	9	0,49	3	1,47	99	16,26
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	43	7,02	22	3,59	6	0,98	6	0,98	4	0,65	4	0,65	89	14,52
<i>Escherichia coli</i>	18	2,94	10	1,63	3	0,49	3	0,49	8	1,30	3	0,49	55	8,97
<i>Acinetobacter baumannii</i>	22	3,59	10	1,63	5	0,82	5	0,82	2	0,33	3	0,49	54	8,81
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31	5,06	6	0,98	4	0,65	4	0,65	1	0,16	6	0,98	51	8,32
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	18	2,94	3	0,49	5	0,82	5	0,82	4	0,65	1	0,16	34	5,55
<i>Staphylococcus hominis</i>	11	1,79	1	0,16	4	0,65	4	0,65	1	0,16	2	0,33	29	4,72
<i>Enterobacter cloacae</i>	6	0,98	-	-	2	0,33	2	0,33	-	-	1	0,16	14	2,29
<i>Serratia marscescens</i>	4	0,65	2	0,33	1	0,16	1	0,16	3	0,49	2	0,33	14	2,29
<i>Enterococcus faecalis</i>	6	0,98	4	0,65	-	-	-	-	1	0,16	1	0,16	12	1,95
<i>Staphylococcus capitis</i>	2	0,33	1	0,16	-	-	-	-	-	-	4	0,65	8	1,30
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	0,16	3	0,49	1	0,16	1	0,16	-	-	1	0,16	7	1,13
<i>Citrobacter freundii</i>	5	0,82	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	0,98
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	-	3	0,49	-	-	-	-	-	-	-	-	5	0,82
<i>Burkholderia cepacea</i>	1	0,16	3	0,49	-	-	-	-	-	-	-	-	4	0,65
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	0,49	-	-	1	0,16	1	0,16	-	-	-	-	4	0,65
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0,16	1	0,16	-	-	-	-	-	-	1	0,16	3	0,48
<i>Streptococcus do grupo Viridans</i>	-	-	2	0,33	-	-	-	-	-	-	-	-	3	0,48
<i>Salmonella spp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0,33	-	-	2	0,32
<i>Streptococcus bovis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,16	2	0,32
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	-	-	-	1	0,16	1	0,16	-	-	-	-	2	0,32
<i>Streptococcus pyogenes</i>	2	0,33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0,32
<i>Enterococcus faecium</i>	-	-	1	0,16	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,16
<i>Enterococcus spp.</i>	1	0,16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,16
<i>Morganella morganii</i>	-	-	-	-	1	0,16	1	0,16	-	-	-	-	1	0,16
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,16	1	0,16
<b>Total</b>	<b>275</b>	<b>44,95</b>	<b>105</b>	<b>17,11</b>	<b>93</b>	<b>15,17</b>	<b>54</b>	<b>8,80</b>	<b>37</b>	<b>6,01</b>	<b>49</b>	<b>7,97</b>	<b>613</b>	<b>100</b>

As bactérias do gênero *Staphylococcus* tiveram alta prevalência; foram encontrados *S. aureus* (17,94 %), *S. epidermidis* (16,26), *S. haemolyticus* (5,55 %), *S. hominis* (4,72 %), *S. capitis* (1,30 %) e *S. saprophyticus* (0,16 %), todas com grande relevância epidemiológica. De acordo com Magalhães et al<sup>22</sup>, *S. aureus* é o principal agente patogênico de infecções nosocomiais e comunitárias, sendo comumente encontrado nas fossas nasais, exigindo bons hábitos de higiene e uma postura profissional asseada para evitar sua disseminação no meio hospitalar.

*S. epidermidis* são considerados saprófitas ou raramente patogênicos. São reconhecidos atualmente como oportunistas, já que fazem parte da microbiota da pele, podendo ser veiculados durante procedimentos invasivos pela equipe de saúde e causar bacteriemia, endocardite, peritonite e osteomielite. A patogenicidade dessas bactérias tem sido associada à resistência a determinados agentes antimicrobianos, chegando a multirresistência em 80 % dos casos, o que restringe o espectro de antimicrobianos disponíveis para o tratamento<sup>23</sup>.

Foram observados também bacilos Gram negativos como *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Proteus* e *E. coli*, os quais também são responsáveis por casos de infecção hospitalar e comunitária. Possuem patogenicidade variável, podem ser apenas comensais e fazerem parte da microbiota intestinal, ou serem agentes etiológicos de infecções graves por apresentarem alta prevalência de resistência aos antimicrobianos, principalmente pela presença da enzima beta-lactamase de espectro ampliado (ESBL)<sup>24</sup>. As ESBL conferem resistência às bactérias contra os antimicrobianos pertencentes à classe das cefalosporinas de amplo espectro (conhecidas como de 3ª geração), entre elas a cefotaxima, ceftazidima e ceftriaxona, além de aztreonam, um monobactâmico. As ESBL foram identificadas primeiramente em uma cepa de *Klebsiella pneumoniae*, e posteriormente em cepas de *E. coli*. Essa enzima é codificada por genes plasmidiais mutantes, que são normalmente transferidos para outras bactérias por meio da conjugação. O uso indiscriminado de cefalosporinas de espectro ampliado em ambientes hospitalares resultou em cepas que

produzem ESBL também na comunidade<sup>25</sup>.

As espécies *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Burkholderia cepacia* são bacilos Gram negativos não-fermentadores que tiveram sua incidência aumentada a partir da década de 70, em razão da sensibilidade diminuída a um grande número de antimicrobianos<sup>26</sup>.

Embora *S. aureus*, tenha sido a espécie mais prevalente no total geral, assim como individualmente nas unidades H2, H4 e H5, *S. epidermidis* foi visualizado como mais prevalente nas unidades H1 (9,22 %) e H3 (2,47%), respectivamente. Esse resultado é semelhante ao encontrado com os estudos de Cunha e Linardi<sup>5</sup>, Alves et al<sup>2</sup>, Andrade et al<sup>20</sup> e Coimbra et al<sup>27</sup>. Estudo de Leiser et al<sup>28</sup> teve como bactéria mais prevalente *S. aureus*.

A **Tabela 5** mostra o perfil de sensibilidade das principais espécies bacterianas isoladas das hemoculturas aos antibióticos mais utilizados na prática clínica. Verificou-se através do TSA que as diferentes bactérias apresentaram diferentes perfis de sensibilidade, e isso foi observado inclusive no mesmo gênero bacteriano.

Quanto à análise da sensibilidade aos antimicrobianos, verificou-se que somente para 411 (67,04 %) amostras foi realizado o TSA, isto é, para 202 (32,95 %) amostras o mesmo não foi realizado. Interessante notar que durante determinados períodos, algumas unidades hospitalares (H3, H4 e H6) não realizaram sequer um único antibiograma para determinados micro-organismos. A razão é desconhecida, mas preocupante, pois o TSA é determinante para avaliação, triagem e monitoramento da resistência e sensibilidade dos micro-organismos que causam bacteriemia e sepse nas instituições hospitalares, além de definir a melhor estratégia farmacológica, permitindo a realização de uma antibioticoterapia racional e eficiente<sup>4,12</sup>.

Os bacilos Gram negativos não fermentadores *A. baumannii* e *P. aeruginosa* são bactérias de grande relevância no estudo epidemiológico das bacteriemias e sepses, com grande preocupação por desenvolverem estratégias de resistência a antimicrobianos. As culturas de *A. baumannii* analisadas apresentaram-se resistentes à maioria

**Tabela 5.** Porcentagem de sensibilidade aos antimicrobianos dos microrganismos mais frequentes identificados nas hemoculturas positivas realizadas no período de 2012 a 2014, provenientes de hospitais privados do município de Cascavel/ PR

Microrganismos	Antimicrobianos*												
	AMC	CFP	CPX	GEN	IMI	LFX	MER	PTB	PXB	SXT	TET	TGC	TBM
<i>A. baumannii</i>	17%	4%	6%	4%	4%	4%	6%	6%	49%	6%	4%	47%	8%
<i>E. coli</i>	86%	79%	59%	88%	55%	72%	65%	79%	79%	93%	96%	90%	86%
<i>K. pneumoniae</i>	76%	24%	39%	24%	21%	29%	76%	50%	87%	31%	89%	29%	47%
<i>P. aeruginosa</i>	57%	43%	48%	31%	37%	46%	77%	34%	77%	63%	14%	48%	-
<i>S. aureus</i>	67%	28%	16%	22%	28%	91%	63%	78%	92%	86%	100%	-	-
<i>S. epidermidis</i>	29%	86%	15%	46%	93%	100%	18%	85%	50%	32%	100%	-	-
<i>S. haemolyticus</i>	29%	83%	12%	16%	92%	88%	0%	50%	25%	71%	92%	-	-
<i>S. hominis</i>	33%	94%	16%	33%	100%	100%	22%	83%	22%	61%	100%	-	-

\*AMC – Amicacina, AZM – Aztreonam, CFA – Cefazolina, CFP – Cefepima, CFX – Cefotaxime, CLI – Clindamicina, CPX – Ciprofloxacino, CXO – Ceftriaxona, CZD – Ceftazidima, DAP – Daptomicina, ERT – Eritromicina, GEN – Gentamicina, IMI – Imipenem, LZD – Linezolida, LFX – Levofloxacino, MER – Meropenem, MIN – Minociclina, OXA – Oxacilina, PTB – Piperacilina+Tazobactam, PXB – Polimixina B, RIF – Rifampicina, SXT – Trimetoprim/Sulfametoxazol, TET – Tetraciclina, TGC – Tigeciclina, TBM – Tobramicina e VAN – Vancomicina

dos antibacterianos utilizados na prática clínica, e sensibilidade bastante restrita foi verificada para polimixina B (49 %) e a tigeciclina (47 %). Esse resultado é bastante diverso. Estudo realizado em um hospital de ensino no Paraná foi encontrada sensibilidade média de 69 % para amicacina, ampicilina + sulbactam, aztreonam, imipenem, meropenem e piperacilina. O percentual elevado de resistência de *A. baumannii* aos antimicrobianos carbapenêmicos é preocupante, recomendando-se o monitoramento, devido à letalidade dos casos<sup>28</sup>.

*P. aeruginosa* teve um maior número de culturas investigadas em relação à resistência aos antimicrobianos e apresentou maior sensibilidade a estes, do que *A. baumannii*. Verificou-se uma sensibilidade maior que 50 % de sensibilidade para amicacina, imipenem, meropenem piperacilina + tazobactam. Estudo de Leiser et al<sup>28</sup> apresentou resultados semelhantes de sensibilidade antimicrobiana deste micro-organismo para amicacina, imipenem, meropenem e piperacilina. A doença pulmonar crônica, ventilação mecânica superior a oito dias, traqueostomia e uso prévio

de antimicrobianos são considerados fatores de risco para a infecção pulmonar por *P. aeruginosa*, e esta pode levar a bacteriemia e sepse<sup>29</sup>. Já *A. baumannii* é frequentemente isolado em pacientes submetidos à ventilação mecânica que desenvolveram pneumonia. Neurocirurgia, traumatismo e aspiração de conteúdo gástrico também são fatores de risco para desenvolvimento de infecções causadas por esse micro-organismo. *E. coli* é um bacilo Gram negativo de grande interesse para infecções hospitalares. Contudo, verificou-se que, para o hospital H4 não foram realizados TSA para esta bactéria (dados não demonstrados) em todo o período de estudo, mesmo verificando-se, conforme **Tabela 4** que ocorreram três hemoculturas positivas para essa espécie bacteriana. Nas outras unidades hospitalares analisadas, a sensibilidade desse micro-organismo a maioria dos antimicrobianos investigados variou entre 55 a 90 %. Imipenem e meropenem foram os mais eficazes contra a bactéria, com 93 % e 96 % de sensibilidade, respectivamente.

*K. pneumoniae*, bactéria de grande interesse

para infecções hospitalares, apresentou sensibilidade bastante diversa aos antimicrobianos. De maneira geral, a maior sensibilidade foi verificada com meropenem (89 %) e a menor com ceftazidima (21 %). As bacteremias causadas por *K. pneumoniae* e *E. coli* geralmente são oriundas de infecções do trato genitourinário, que normalmente são tratadas de forma empírica, aumentando a pressão seletiva e a probabilidade de ocorrência de resistência antimicrobiana<sup>28, 30</sup>.

No presente estudo, *K. pneumoniae* foi mais sensível aos antimicrobianos testados do que foi apresentado em um estudo realizado em hospital público do Rio de Janeiro<sup>27</sup>. Contudo, apesar de algumas cepas serem relativamente sensíveis a cefepima, ceftriaxona, ceftazidima e ciprofloxacino, os índices de sensibilidade a estes fármacos foram inferiores ao de imipenem, meropenem e tetraciclina, recomendando-se que as unidades hospitalares analisadas investiguem melhor a produção de ESBL pelas cepas de *K. pneumoniae*<sup>31</sup>.

O gênero *Staphylococcus* geralmente é encontrado em secreções, com destaque para as do trato respiratório, sendo agente etiológico importante de pneumonias. No presente estudo foi verificada sensibilidade em menos que 25 % das culturas dessa bactéria para gentamicina e eritromicina. *S. epidermidis* vem chamando a atenção por ter desenvolvido estratégias interessantes para conquistar o ambiente hospitalar, com a capacidade de colonizar a superfície inerte de dispositivos médicos invasivos (como cateteres), formando biofilmes, além de carrear diferentes elementos genéticos móveis, sendo identificados como os responsáveis pela resistência à oxacilina<sup>5</sup>. Para esse micro-organismo a resistência foi maior que 80 % no presente estudo.

Daptomicina, linezolida e vancomicina são as atuais estratégias para o tratamento da bacteremia e sepse causadas por *Staphylococcus* resistentes. Contudo, há algumas desvantagens, pela dificuldade destes antimicrobianos em alcançarem a concentração terapêutica nos tecidos atingidos. Linezolida apresenta toxicidade associada ao uso prolongado. Nefrotoxicidade é observada com o uso de vancomicina e daptomicina. A rifampicina também vem se destacando no tratamento de *Staphylococcus* resistentes,

entretanto, a nefrotoxicidade também é um efeito colateral grave a ser analisado durante a escolha farmacoterapêutica<sup>32</sup>.

## CONCLUSÃO

O estudo demonstrou que os cocos Gram positivos são as bactérias mais prevalentes em hemoculturas de hospitais privados do município de Cascavel/PR, com destaque para *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Vinte e sete espécies bacterianas foram identificadas em 613 hemoculturas positivas, de um total de 5059 hemoculturas advindas de seis unidades hospitalares e analisadas por um laboratório de análises clínicas do período de 2012 a 2014. Contudo, verificou-se que a realização de TSA não foi realizada em todas as hemoculturas positivas, prejudicando um estudo com maior precisão e impacto. A bactéria Gram negativa não fermentadora *Acinetobacter baumannii* foi a que apresentou uma maior resistência aos antimicrobianos.

É necessária a criação de consciência por parte das equipes de Controle de Infecção Hospitalar sobre a importância da realização de TSA para auxiliar na implantação da antibioticoterapia racional para com os pacientes. Assim como, da avaliação e monitoramento das medidas de controle de micro-organismos aplicadas na unidade hospitalar, levando com isso a uma diminuição do impacto da resistência antimicrobiana e dos gastos com bacteremia e sepse.

---

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Laboratório Biovel de Análises e Pesquisas Clínicas, por todos os dados fornecidos para a presente pesquisa.

---

## REFERÊNCIAS

1. Araujo MRE. Hemoculturas: recomendações de coleta, processamento e interpretação dos resultados. *J Infect Control*. 2012;1(1):8–19.

2. Alves NLS, Oliveira CR, Silva LAP, Gervásio SMD, Alves SR, Sgavioli GM. Hemoculturas: estudo da prevalência dos microrganismos e o perfil de sensibilidade dos antibióticos utilizados em Unidade de Terapia Intensiva. *J Health Sci Inst*. 2012;30(1):44-7.
3. Instituto Latino Americano da Sepse - ILAS. O que é a seps. [acesso 2016 Mai 27]. Disponível em: [http://www.ilas.org.br/o-que-e-seps.php].
4. Viana APP, Soares RS, Castro ARL, Kluczynik CEN, Catão RMR. Incidência bacteriana em hemoculturas de recém-nascidos e perfil de suscetibilidade frente aos antimicrobianos. *BioFar - Rev Biol Farm*. 2011;05(1):102-10.
5. Cunha MN, Linardi VR. Incidence of bacteremia in a tertiary hospital in eastern Minas Gerais. *Rev Med Minas Gerais*. 2013;23(2):146-50. [DOI: <http://www.dx.doi.org/10.5935/2238-3182.20130024>].
6. Bearman GM, Wenzel RP. Bacteremias: a leading cause of death. *Arch Med Res*. 2005;36(6):646-59. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.02.005>].
7. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria 196 de 02 de março de 1983. Institui a implantação de Comissões de Controle de Infecção Hospitalar. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 02 mar 1983. Seção 1, nº 50, p.751.
8. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria 930 de 27 de agosto de 1992. Expedir, na forma dos anexos, normas para o controle das infecções hospitalares. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 04 set 1992. Seção 1, p. 12279-81.
9. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 2.616 de 12 de maio de 1998. Expedir diretrizes e normas para a prevenção e o controle das infecções hospitalares. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 13 mai. 1998. Seção 1, nº 89. p. 133-5.
10. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Lei nº 9.431 de 6 de janeiro de 1997. Dispõe sobre a obrigatoriedade da manutenção de programa de controle de infecções hospitalares pelos hospitais do País. [acesso 2016 Jun 02]. Disponível em: [http://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/legislacao/item/lei-n-9431-1997].
11. Sydnor ER, Perl TM. Hospital epidemiology and infection control in acute-care settings. *Clin Microbiol Rev*. 2011;24(1):141-73. [DOI: 10.1128/CMR.00027-10].
12. Braz DML. Prevalência bacteriana nas hemoculturas do hospital de urgência da Região Sudoeste (HURSO) – GO [Monografia de conclusão de curso de Especialização em Farmácia Clínica e Atenção Farmacêutica]. Goiânia (GO): Pontifícia Universidade Católica de Goiás; 2013.
13. Bantar C, Sartori B, Vesco E, Heft C, Saúl M, Salamone F, et al. A hospitalwide intervention program to optimize the quality of antibiotic use: impact on prescribing practice, antibiotic consumption, cost savings, and bacterial resistance. *Clin Infect Dis*. 2003;37(2):180-6. [http://doi.org.br/10.1086/375818].
14. CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Document M100-523E.
15. IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia Estatística. Cidades. Paraná. Cascavel. [Acesso 2016 Mai 27]. Disponível em: [http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=410480].
16. Sousa MA, Medeiros NM, Carneiro JR, Cardoso AM. Hemoculturas positivas de pacientes da unidade de terapia intensiva de um hospital escola de Goiânia – GO. *Estudos*. 2014;41(3):627-35.
17. Reis HPLC, Vieira JB, Magalhães DP, Sartori DP, Fonseca DB, Viana JM et al. Avaliação da resistência microbiana em hospitais privados de Fortaleza – Ceará. *Rev Bras Farm*. 2013;94(1):83-7.

18. Damasceno DD, Terra FS, Dutra PO, Libânio SIC. Perfil da incidência bacteriana e resistência antimicrobiana em uma instituição hospitalar. *REME Rev Min Enferm*. 2008;12(1):104-9. [DOI: <http://www.dx.doi.org/S1415-27622008000100015>].
19. Millan LS, Benedette CEM, Maximo LZ, Almeida PCC, Gomes DS, Gemperli R et al. Infecções de corrente sanguínea por bactérias multirresistentes em UTI de tratamento de queimados: experiência de quatro anos. *Rev Bras Cir Plas*. 2012;27(3):374-8. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1983-51752012000300007>].
20. Andrade D, Leopoldo VC, Haas VJ. Ocorrência de bactérias multirresistentes em um centro de terapia intensiva de hospital brasileiro de emergências. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2006;18(1):27-33. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-507X2006000100006>].
21. Freire ILS, Araujo RO, Vasconcelos QLD, Menezes LCC, Costa IKE, Torres GV. Perfil microbiológico de sensibilidade bacteriana das hemoculturas de unidade de terapia intensiva pediátrica. *Rev Enferm UFSM*. 2013;3(3):429-39. [<http://dx.doi.org/10.5902/217976928980>].
22. Magalhães LS, Abreu ES, Pussente CG, Oliveira CGA. Incidência e perfil de sensibilidade e resistência das estirpes bacterianas isoladas das hemoculturas de um hospital oncológico. *Rev Cient FAMINAS*. 2014;10(2):39-53.
23. Michelim L, Lahude M, Araújo PR, Giovanaz DSH, Müller G, Delamare APL, et al. Pathogenic factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus epidermidis* associated with nosocomial infections occurring in intensive care units. *Braz J Microbiol*. 2005;36(1):17-23. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822005000100004>].
24. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical microbiology. 6<sup>o</sup> ed. Canada: Mosby Elsevier; 2009.
25. Emery CL, Weymouth LA. Detection and clinical significance of extended-spectrum beta-lactamases in a tertiary-care medical center. *J Clin Microbiol*. 1997;35(8):2061-7.
26. Paixão VA, Barros TF, Mota CM, Moreira TF, Santana MA, Reis JN. Prevalence and antimicrobial susceptibility of respiratory pathogens in patients with cystic fibrosis. *Braz J Infect Dis*. 2010;14(4):406-409.
27. Coimbra MVS, Coimbra Filho MVS, Lima NC. Estudo da prevalência e dos índices de resistência microbiana em um hospital público do Rio de Janeiro. *Revisa*. 2012;1(1):58-67.
28. Leiser JJ, Tognim MCB, Bedendo J. Infecções hospitalares em um centro de terapia intensiva de um hospital de ensino no Norte do Paraná. *Cienc Cuid Saúde*. 2007;6(2): 181-6. [DOI: <http://dx.doi.org/10.4025/ciencucidsaude.v6i2.4149>].
29. Carrilho CMDM, Grion CMC, Medeiros EAS, Saridakis HO, Belei R, Bonameti AM et al. Pneumonia em UTI: incidência, etiologia e mortalidade em hospital universitário. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2004;16(4):222-7.
30. Silveira SA, Araújo MC, Fonseca FM, Okura MH, Oliveira ACS. Prevalência e suscetibilidade bacteriana em infecções do trato urinário de pacientes atendidos no hospital universitário de Uberaba. *Rev Bras Anal Clin*. 2010;42(3):157-60.
31. Braoios A. Incidência de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* produtoras de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) em um hospital universitário. *Colloq Vitae*. 2009;1(2):109-16. [DOI: <https://doi.org/10.5747/cv.2009.v01.n2.v016>].
32. Correal JCD, Marques EA, Guilherme WL, Leão RS, Damasco PV. Infecções por *Staphylococcus aureus*: mudança no perfil etiológico no Hospital Universitário Pedro Ernesto. *Rev HUPE*. 2013;12(3):31-46. [DOI: <https://doi.org/10.12957/rhupe.2013.7529>].





# Qualidade de suplementos proteicos: avaliação da composição e rotulagem

## Quality of protein supplements: evaluation of composition and labeling

[RIALA6/1703](#)

Lizandra Vasconcellos SILVA, Scheilla Vitorino Carvalho de SOUZA\*

\*Endereço para correspondência: Laboratório de Bromatologia, Unidade de Pesquisa Análise de Alimentos (BRO-UPAA), Departamento de Alimentos (ALM), Faculdade de Farmácia (FAFAR), Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, Av. Antônio Carlos, 6627, Campus da UFMG, Pampulha, Belo Horizonte, MG, Brasil, CEP: 31270-010. Tel: 31 3409 6918/6919. E-mail: [scheilla@bromatologiaufmg.com.br](mailto:scheilla@bromatologiaufmg.com.br)

Recebido: 29.03.2016 - Aceito para publicação: 11.08.2016

### RESUMO

O consumo de suplementos alimentares por praticantes de atividade física tem se tornado um hábito comum, destacando-se aqueles de fonte proteica. Contudo, o uso indiscriminado destes suplementos no Brasil constitui tema de preocupação, pois dietas com elevados níveis proteicos podem ser prejudiciais à saúde. Soma-se a este quadro o fato de que levantamentos recentes sobre a qualidade desses produtos indicaram um número significativo de não conformidades em relação aos requisitos regulamentados. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a conformidade de suplementos proteicos para atletas, do tipo *whey protein*, quanto à composição centesimal e requisitos para rotulagem. Os parâmetros da composição nutricional para os quais foram identificadas não conformidades foram teores de lipídeos totais (70 %) e carboidratos (30 %). Não conformidades de rotulagem foram evidenciadas em 100 % das amostras, sendo mais frequentes aquelas relacionadas à informação da medida caseira, prazo de validade, indicação terapêutica e denominação de venda. A falta de padronização nas orientações de uso foi também considerada crítica, pelo potencial de induzir um consumo excessivo de proteínas. Os resultados desse estudo apontaram para a urgente necessidade de se assegurar a qualidade dos suplementos proteicos consumidos no país.

**Palavras-chaves.** suplementos proteicos, *whey protein*, rotulagem, legislação, qualidade, composição de alimentos.

### ABSTRACT

The consumption of dietary supplements for physical activity practitioners has become common, highlighting the protein source supplements. However, the indiscriminate use of these supplements is a topic of concern in Brazil, because diet with high protein levels can be harmful to health. An aggravating is the fact that recent surveys on the quality of protein supplements showed a significant number of non-compliance products considering the regulated requirements. In this context, the objective of this study was to evaluate the compliance of protein supplements for athletes, *whey protein* type, in relation to the chemical composition and regulated requirements for labelling. The parameters related to composition that were in disagreement with the Brazilian regulations were total lipids (70 %) and carbohydrates (30 %). Nonconformities were found in labelling of 100 % of samples, being more frequent those related to household measure information, validity, therapeutic indication and sale name. An important aspect of the labelling was the lack of standardization in the recommendations for use by the manufactures because some of which could lead the users to excessive protein intake. The results of this study indicated the urgent need of quality assurance of protein supplements consumed in Brazil.

**Keywords.** protein supplements, *whey proteins*, labeling, legislation, quality, food composition.

## INTRODUÇÃO

A busca por uma qualidade de vida melhor, recuperação ou prevenção de doenças e, especialmente, o anseio pela melhoria da estética e forma física têm feito um grande número de pessoas iniciarem a prática de exercícios físicos, principalmente em academias. Contudo, para que ocorra uma melhora efetiva na composição corporal aliada aos benefícios à saúde, é necessário que, além da prática de atividades físicas, se tenha uma alimentação equilibrada<sup>1</sup>.

Existe uma importante associação entre a nutrição e a prática de exercícios físicos, uma vez que o desempenho do organismo melhora quando o indivíduo se alimenta de forma adequada, com ingestão equilibrada de nutrientes como: carboidratos, proteínas, gorduras, minerais e vitaminas<sup>2</sup>.

No entanto, a dificuldade de se alimentar de forma adequada e o desejo de se obter resultados rápidos tem incentivado o consumo de suplementos alimentares por praticantes de atividade física, o que tem se tornado um hábito cada vez mais comum<sup>3</sup>.

Os alimentos para atletas são classificados como alimentos para fins especiais, sendo esses definidos como alimentos especialmente formulados ou processados, nos quais se introduzem modificações no conteúdo de nutrientes, adequados à utilização em dietas, diferenciadas e/ou opcionais, atendendo às necessidades de pessoas em condições metabólicas e fisiológicas específicas, conforme determina a Portaria nº 29, de 13 de janeiro de 1998, que aprova o Regulamento Técnico referente a Alimentos para Fins Especiais<sup>4</sup>.

A Resolução CFN nº 380, de 9 de dezembro de 2005<sup>5</sup>, define os suplementos nutricionais como alimentos que servem para complementar, com calorias e/ou nutrientes, a dieta diária de uma pessoa saudável, em casos onde sua ingestão, a partir da alimentação, seja insuficiente, ou quando a dieta requerer suplementação. Os suplementos de origem proteica estão entre os suplementos mais utilizados, principalmente pelos praticantes de atividade

física, com o objetivo de ganho de massa muscular e peso corporal, além do aumento da resistência física<sup>6</sup>.

Entre os suplementos proteicos, se destacam aqueles formulados a partir das proteínas do soro do leite, conhecida popularmente como *whey protein*, pois apresentam alto valor nutricional e seu consumo está relacionado à hipertrofia muscular. A vantagem do *whey protein* sobre o ganho de massa muscular é devido ao seu perfil de aminoácidos, principalmente à leucina, que tem sido associada ao processo de ativação da iniciação da síntese proteica<sup>7</sup>.

Estudos epidemiológicos têm evidenciado o uso indiscriminado de suplementos proteicos no Brasil<sup>1,8-11</sup>, configurando um panorama bastante preocupante, visto que elevados níveis proteicos nas dietas podem levar a quadros clínicos de cetose, gota e sobrecarga renal<sup>12</sup>.

A ANVISA estabelece os requisitos que esses alimentos devem atender, os quais incluem: i) o produto pronto para consumo deve conter, no mínimo, 10 g de proteína na porção; ii) o produto pronto para consumo deve conter, no mínimo, 50 % do valor energético total proveniente das proteínas; iii) este produto pode ser adicionado de vitaminas e minerais, conforme Regulamento Técnico específico sobre adição de nutrientes essenciais; iv) este produto não pode ser adicionado de fibras alimentares e de não nutrientes. Além disso, a composição proteica do produto deve apresentar escore aminoacídico corrigido pela digestibilidade da proteína (PDCAAS - *Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score*) acima de 0,9 e o conteúdo nutricional não pode variar mais que 20 % em relação às quantidades declaradas no rótulo<sup>13,14</sup>.

Além dos requisitos específicos desta classe de alimentos, a conformidade em relação aos requisitos de rotulagem básica e nutricional também é de fundamental importância, visto que a rotulagem é uma ferramenta de comunicação entre o fabricante e o consumidor, capaz de transmitir informações sobre um produto alimentício e subsidiar escolhas alimentares mais saudáveis<sup>15</sup>.

Recentes estudos têm demonstrado que muitos destes suplementos proteicos disponibilizados no mercado nacional não cumpriram com requisitos regulamentados para esta classe de produtos<sup>16-18</sup>, motivando o desenvolvimento do presente estudo. Neste contexto, a avaliação da qualidade de suplementos proteicos é de extrema relevância devido a aspectos de saúde pública e de direitos do consumidor.

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a conformidade de suplementos proteicos a base de soro do leite (*whey protein*) para atletas em relação à composição centesimal e aos requisitos regulamentados para rotulagem destes produtos.

## MATERIAL E MÉTODO

### Amostras

No período de agosto a setembro de 2015, em drogarias de Belo Horizonte - Minas Gerais, foram adquiridos 10 suplementos proteicos para atletas, do tipo *whey protein*, sendo de 10 diferentes marcas, entre produtos nacionais e importados disponíveis no comércio brasileiro. O experimento foi conduzido no Laboratório de Bromatologia - Unidade de Pesquisa de Análise de Alimentos, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em Belo Horizonte/MG.

No que se refere à apresentação do produto, quatro deles eram descritos como suplementos proteicos para atletas do tipo concentrado (identificados como C, D, H e I), três se tratavam de misturas contendo proteínas isoladas, concentradas e hidrolisadas (identificados como A, E, e G), dois eram misturas proteicas contendo proteínas concentradas e isoladas (identificados como F e J) e um apresentava proteínas isoladas exclusivamente (identificado como B).

No laboratório, as amostras foram mantidas em suas embalagens originais, em temperatura ambiente e protegidas da luz até o momento das análises.

### Composição centesimal

A determinação de umidade das

amostras de suplemento proteico para atletas foi realizada pelo método de secagem preconizado pela Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006, pela AOAC, 2007 e pelos Métodos físico-químicos para análise de alimentos do Instituto Adolfo Lutz<sup>19-21</sup>.

A determinação do resíduo mineral fixo (cinzas) das amostras de suplemento proteico para atletas foi realizada por incineração, conforme determina a Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006, a AOAC, 2007 e os Métodos físico-químicos para análise de alimentos do Instituto Adolfo Lutz.<sup>19-21</sup>

O Método de Rose-Gottlieb e Mojonier foi o método utilizado para determinação de lipídeos totais dos suplementos proteicos, baseado na ISO 1736:2008, que descreve o método de referência para determinação de lipídeos em produtos lácteos<sup>22</sup>.

A determinação de proteínas foi realizada por meio do método de Kjeldahl, executado de acordo com a Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006, com os Métodos físico-químicos para análise de alimentos do Instituto Adolfo Lutz e com a ISO 8968:2001<sup>19,21,23</sup>.

O teor de carboidratos dos suplementos proteicos foi obtido pelo cálculo da diferença entre 100 g de amostra e o somatório das porcentagens de umidade, cinzas, lipídeos totais e proteínas contidas em cada amostra<sup>14,24</sup>.

Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### Avaliação da rotulagem

Para avaliação da rotulagem das diferentes marcas de suplementos proteicos para atletas foram verificados os requisitos regulamentados relacionados a seguir, conforme proposto por Santos<sup>25</sup>. Os itens avaliados seguiram critérios apontados em regulamentos específicos.

RDC nº 259 de 20 de setembro de 2002 - Aprova o Regulamento Técnico sobre Rotulagem de Alimentos Embalados:

- Denominação de venda do alimento;
- Lista de ingredientes;
- Conteúdos líquidos;
- Identificação da origem;

- Nome e/ou razão social e endereço do importador, no caso de alimentos importados;
- Identificação do lote;
- Declaração de aditivo/ número do INS (Sistema Internacional de Numeração);
- Indicação terapêutica ou informação que induza o consumidor a erro;
- Prazo de validade;
- Instruções sobre o preparo e uso do alimento, quando necessário;
- Condições especiais de conservação.

RDC nº 360 de 23 de dezembro de 2003 - Aprova Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando Obrigatória a Rotulagem Nutricional:

- Declaração de valor energético e nutrientes;
- Apresentação correta da ordem dos componentes da informação nutricional;
- Apresentação correta da tabela de informação nutricional;
- Conversão kcal para kJ;
- Porcentagem de valor diário (% V.D.);
- Tolerância de  $\pm 20\%$  com relação aos valores dos nutrientes declarados no rótulo;
- As vitaminas e minerais, sempre que estiverem presentes em quantidade igual ou maior a 5% da Ingestão Diária Recomendada (IDR) por porção indicada no rótulo, podem ser declaradas.

RDC nº 359 de 23 de dezembro de 2003 - Aprova Regulamento Técnico de Porções de Alimentos Embalados para Fins de Rotulagem Nutricional:

- Informação da medida caseira.

RDC nº 54 de 12 de novembro de 2012 - Dispõe sobre Regulamento Técnico sobre Informação Nutricional Complementar:

- Quantidade do nutriente sobre o qual foi feita uma Informação Nutricional Complementar (INC) declarada na tabela de informação nutricional;
- Valores estabelecidos para o atributo “não contém”, declarados na tabela de informação nutricional como “zero”, “0” ou “não contém”;
- Indicação na tabela de informação nutricional da quantidade de açúcares abaixo dos carboidratos,

- para uma INC sobre a quantidade de açúcares;
- A INC refere-se ao alimento pronto para o consumo, preparado, quando for o caso, de acordo com as instruções de preparo indicadas pelo fabricante, sempre que estas propriedades não sejam perdidas;
- Declarações realizadas para os atributos “fonte” e “alto teor”, não podem considerar no cálculo da INC a contribuição nutricional dos ingredientes adicionados segundo as instruções de preparo;
- Para o cálculo da INC das declarações realizadas para os atributos “baixo”, “não contém” e “sem adição de”, deve ser considerada a contribuição nutricional dos ingredientes adicionados segundo as instruções de preparo;
- O rótulo de alimentos com INC, que necessitam ser reconstituídos com adição de outros ingredientes, deve apresentar a informação nutricional do alimento pronto para o consumo (preparado), conforme instruções de preparo indicadas pelo fabricante. Ficam excluídos desta obrigatoriedade os produtos que sejam reconstituídos somente com água;
- INC que não possibilite interpretação errônea pelo consumidor;
- INC que não incentive o consumo excessivo do produto;
- INC que não sugira que o produto seja nutricionalmente completo;
- INC redigida no idioma oficial do país de consumo (espanhol ou português), sem prejuízo da existência de textos em outros idiomas.

Lei nº 10.674 de 16 de maio de 2003 - Obriga que os produtos alimentícios comercializados informem sobre a presença de glúten, como medida preventiva e de controle da doença celíaca:

- Incrições “contém Glúten” ou “não contém Glúten”.

Portaria nº 157 de 19 de agosto de 2002 do INMETRO - Aprova o Regulamento Técnico Metrológico, estabelecendo a forma de expressar o conteúdo líquido a ser utilizado nos produtos pré-medidos:

- Apresentação da indicação quantitativa do conteúdo líquido;
- Dimensões mínimas dos caracteres

alfanuméricos das indicações quantitativas do conteúdo líquido.

RDC nº 18 de 27 de abril de 2010 - Aprova o Regulamento Técnico sobre Alimentos para Atletas:

- O tamanho da fonte utilizada para designação do produto deve ser no mínimo 1/3 do tamanho da marca;
- Presença da seguinte frase em destaque e negrito: “Este produto não substitui uma alimentação equilibrada e seu consumo deve ser orientado por nutricionista ou médico”;
- Imagens e/ou expressões que não induzam o consumidor a engano quanto a propriedades e/ou efeitos que não possuam ou não possam ser demonstrados referentes a perda de peso, ganho ou definição de massa muscular e similares;
- Imagens e/ou expressões que façam referências a hormônios e outras substâncias farmacológicas e/ou do metabolismo, não inscritas;
- Expressões do tipo: “anabolizantes”, “hipertrofia muscular”, “massa muscular”, “queima de gorduras”, “*fat burners*”, “aumento da capacidade sexual”, “anticatabólico”, “anabólico”, equivalentes ou similares, não inscritas.

Além da análise dos requisitos básicos regulamentados para rotulagem de alimentos e suplementos proteicos, também foram feitas avaliações das informações presentes nos rótulos a respeito das orientações de preparo e sugestão de uso.

### Análise estatística

Os resultados obtidos nas determinações de umidade, cinzas, proteínas, lipídeos e carboidratos foram submetidos à análise de variância. As médias estimadas para as diferentes marcas (tratamentos) foram discriminadas pelo teste de Tukey, com 95 % de significância.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Composição centesimal

Os teores de umidade das amostras analisadas variaram de 4,62 % a 7,49 %, com média de 5,93 %. Foram observadas diferenças significativas entre a maioria dos produtos

analisados ( $p < 0,05$ ). Não foi observada uma relação entre o teor de umidade e o tipo de suplemento analisado (**Tabela 1**). Apesar de não haver um nível regulamentado para umidade nesses produtos, a determinação deste parâmetro é fundamental, pois está relacionada com a estabilidade, segurança e qualidade dos produtos<sup>26</sup>.

O material da embalagem foi identificado como uma provável causa para os diferentes teores de umidade encontrados nos produtos analisados, visto que as marcas que apresentaram maiores teores de umidade foram aquelas comercializadas em embalagens de polietileno tereftalato, enquanto as que apresentaram menores teores de umidade estavam acondicionadas em frascos de polietileno de alta densidade (**Tabela 2**). Segundo Jorge<sup>27</sup>, o polietileno de alta densidade apresenta ótima barreira à umidade, enquanto o polietileno tereftalato apresenta alta permeabilidade ao vapor de água, o que justifica os resultados encontrados no presente estudo. Outro fator considerado foi o lacre interno, mas nenhuma relação foi evidenciada entre a presença ou ausência do lacre e os teores de umidade das amostras. Em todos os produtos havia *head space*, ou seja, as amostras não preencheram a totalidade das embalagens o que ocasionou presença de uma atmosfera não inerte em contato com os produtos.

A relação do teor de umidade e a vida de prateleira dos produtos (diferença entre as datas das análises e as datas de fabricação dos produtos) foi investigada para as amostras que apresentaram datas de fabricação declaradas nos rótulos (marcas B, F, G e I). No entanto, não foi observada uma relação entre a vida de prateleira dos produtos o teor de umidade, visto que a amostra fabricada há mais tempo não foi a que apresentou maior teor de umidade.

Considerando outros estudos realizados no país, de monitoramento da qualidade de suplementos proteicos, Oliveira et al<sup>17</sup> estimaram teores de umidade entre 3,99 % e 6,70 %, com média de 5,27 %, quando analisaram cinco suplementos proteicos do mercado de Natal - RN, empregando o mesmo método utilizado no presente estudo (secagem em estufa a 105 °C). Estes resultados corroboram com os aqui reportados.

Diferenças significativas também foram

**Tabela 1.** Teores experimentais de umidade, cinzas, lipídeos totais, proteínas e carboidratos das dez marcas de suplementos proteicos avaliadas, respectivos valores declarados nos rótulos, diferenças e erros relativos

Marca	Experimental	Rotulado	Diferença	Erro relativo
<b>Teor de umidade (%)</b>				
A	7,49 ± 0,04 <sup>h</sup>	-	-	-
B	4,62 ± 0,02 <sup>a</sup>	-	-	-
C	5,29 ± 0,09 <sup>b</sup>	-	-	-
D	5,46 ± 0,04 <sup>b,c</sup>	-	-	-
E	6,99 ± 0,07 <sup>g</sup>	-	-	-
F	5,58 ± 0,06 <sup>c,d</sup>	-	-	-
G	5,79 ± 0,15 <sup>d,e</sup>	-	-	-
H	5,91 ± 0,04 <sup>e</sup>	-	-	-
I	6,29 ± 0,07 <sup>f</sup>	-	-	-
J	5,89 ± 0,05 <sup>e</sup>	-	-	-
<b>Teor de cinzas (%)</b>				
A	1,81 ± 0,01 <sup>a</sup>	62,5 mg sódio 195 mg magnésio 14,5 mg zinco 26,25 µg cromo	-	-
B	2,33 ± 0,01 <sup>b</sup>	160 mg sódio	-	-
C	4,89 ± 0,02 <sup>i</sup>	345 mg sódio 602,5 mg cálcio	-	-
D	3,23 ± 0,01 <sup>h</sup>	169,4 mg sódio	-	-
E	2,88 ± 0,01 <sup>e</sup>	273,3 mg sódio	-	-
F	3,14 ± 0,02 <sup>f,g</sup>	427,63 mg sódio	-	-
G	2,57 ± 0,01 <sup>c</sup>	176,5 mg sódio	-	-
H	2,73 ± 0,01 <sup>d</sup>	175 mg sódio 330 mg cálcio	-	-
I	3,16 ± 0,07 <sup>g,h</sup>	262,50 mg sódio 406,25 mg cálcio 7,50 µg cromo 337,50 mg fósforo 22,81 µg iodo 75 mg magnésio 0,20 mg manganês 8,12 µg molibdênio 323,43 mg potássio 7,18 µg selênio 2,5 mg zinco	-	-
J	3,07 ± 0,01 <sup>f</sup>	430 mg sódio 675 µg cobre 25 µg selênio	-	-

Cont.

Cont. **Tabela 1**

Teor de lipídeos totais (%)				
A	4,19 ± 0,06 <sup>c</sup>	0	4,19	150,90
B	0,10 ± 0,01 <sup>a</sup>	0	0,10	-94,01*
C	6,95 ± 0,06 <sup>d</sup>	4,00	2,95	73,75
D	7,94 ± 0,11 <sup>f</sup>	2,78	5,16	185,61
E	6,92 ± 0,06 <sup>d</sup>	6,67	0,25	3,74
F	4,34 ± 0,06 <sup>c</sup>	3,30	1,04	31,51
G	6,70 ± 0,12 <sup>d</sup>	4,40	2,30	52,27
H	7,29 ± 0,17 <sup>e</sup>	7,75	-0,46	-5,93
I	7,11 ± 0,02 <sup>d,e</sup>	4,37	2,73	62,70
J	2,68 ± 0,07 <sup>b</sup>	1,50	1,17	78,67
Teor de proteínas (%)				
A	45,73 ± 0,09 <sup>b</sup>	52,50	6,77	-12,89
B	78,62 ± 0,05 <sup>c</sup>	90,00	11,38	-12,64
C	39,72 ± 1,49 <sup>a</sup>	40,00	0,28	-0,7
D	71,64 ± 1,42 <sup>d</sup>	77,70	6,06	-7,80
E	72,70 ± 2,92 <sup>d</sup>	76,70	4,00	-5,21
F	77,46 ± 1,41 <sup>c</sup>	78,90	1,44	-1,82
G	75,18 ± 1,55 <sup>d,e</sup>	73,50	1,68	2,28
H	72,92 ± 0,29 <sup>d</sup>	70,00	-2,92	4,17
I	72,76 ± 0,05 <sup>d</sup>	75,00	2,24	-2,98
J	64,50 ± 1,44 <sup>c</sup>	60,00	-4,50	7,5
Teor de carboidratos (%)				
A	40,78 ± 0,12 <sup>d</sup>	40,00	0,78	1,95
B	14,33 ± 0,03 <sup>b</sup>	11,00	3,32	30,27
C	43,15 ± 1,51 <sup>d</sup>	47,50	-4,35	-9,15
D	11,73 ± 1,36 <sup>a,b</sup>	5,56	6,17	110,97
E	11,36 ± 1,34 <sup>a,b</sup>	9,67	0,84	17,47
F	9,48 ± 1,38 <sup>a</sup>	9,87	-0,39	-3,95
G	9,76 ± 1,56 <sup>a</sup>	5,88	3,88	65,98
H	11,15 ± 0,37 <sup>a</sup>	11,75	-0,60	-5,10
I	10,69 ± 0,15 <sup>a,b</sup>	12,5	-1,82	-14,48
J	23,87 ± 1,53 <sup>c</sup>	27,5	-3,63	-13,20

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na horizontal, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). Número de observações: 3. Marcados em cinza as amostras para as quais o erro relativo entre o valor declarado e rótulo e o experimental foi maior que  $\pm 20$  %. Para amostras que declararam não conter lipídeos totais foi utilizado o limite máximo de 0,5 g de lipídeos totais por porção (1,67 %) para calcular o erro relativo. \* A amostra B apresentou teor de lipídeos totais abaixo do limite máximo estabelecido pela legislação de 1,67 %, sendo, portanto, considerada como conforme

**Tabela 2.** Especificações das embalagens das dez marcas de suplementos proteicos avaliadas

Marca	Especificações da embalagem							
	Material	Tipo de tampa	Lacre interno	Tamanho (altura x diâmetro da base em cm)	Quantidade de amostra (g)	Presença de head space	Data de fabricação (mês/ano)	Presença de dosador
A	Polietileno Tereftalato	Rosca	Não	25 x 14	900	Sim	Não declarada	Sim
B	Polietileno de Alta Densidade	Rosca	Sim Papel laminado	25 x 14	900	Sim	Declarada 11/2014	Sim
C	Polietileno de Alta Densidade	Rosca	Sim Plástico laminado	25 x 14	1000	Sim	Não declarada	Sim
D	Polietileno de Alta Densidade	Rosca	Sim Plástico	25 x 14	900	Sim	Não declarada	Sim
E	Polietileno Tereftalato	Rosca	Sim Papel laminado	25 x 14	900	Sim	Não declarada	Sim
F	Polietileno de Alta Densidade	Rosca	Não	27 x 13	909	Sim	Declarada 12/2014	Sim
G	Polietileno de Alta Densidade	Rosca	Sim Papel	25 x 14	907	Sim	Declarada 01/2015	Sim
H	Polietileno Tereftalato	Rosca	Não	25 x 14	900	Sim	Não declarada	Sim
I	Polietileno Tereftalato	Rosca	Sim Plástico laminado	25 x 14	900	Sim	Declarada 05/2015	Sim
J	Polietileno Tereftalato	Rosca	Sim Alumínio	25 x 14	900	Sim	Não declarada	Sim



observadas em relação aos teores de cinzas das amostras analisadas ( $p < 0,05$ ), para os quais a média global foi de 2,98 %, com mínimo de 1,81 % e máximo de 4,89 %. Não foi observada nenhuma relação entre o teor de cinzas e a forma das proteínas encontrada nas diferentes amostras (**Tabela 1**).

Considerando que há obrigatoriedade apenas para declaração do sódio na rotulagem nutricional de alimentos e que a declaração de outros minerais somente pode ser feita se os mesmos estiverem presentes em quantidades iguais ou maiores a 5 % da Ingestão Diária Recomendada<sup>14</sup>, os teores de cinzas, que representam o conteúdo mineral total do alimento, foram sempre superiores à soma dos minerais declarados individualmente nos rótulos, o que indica a conformidade da rotulagem em relação a este grupo de nutrientes.

No estudo de Oliveira et al<sup>17</sup> um teor médio de cinzas de 3,58 % foi obtido nas análises de suplementos proteicos do mercado de Natal/RN ( $n = 5$  marcas, em triplicata), também pelo método de queima seca, com amplitude de 2,81 % a 4,94 %, similares aos valores reportados no presente estudo.

A média para o teor de lipídeos das amostras analisadas foi de 5,42 %, variando de 0,10 % a 7,94 %. Diferenças significativas foram evidenciadas em relação às dez amostras avaliadas ( $p < 0,05$ ). A marca B, constituída por *whey protein* em sua forma isolada, foi a que apresentou o menor teor de lipídeos (0,10 %) (**Tabela 1**). Esse tipo de *whey protein* é a forma mais pura do produto, apresentando gordura em mínimas proporções ou até mesmo inexistente<sup>7</sup>.

Ao comparar os valores rotulados com os resultados obtidos neste trabalho (**Tabela 1**), foram observadas diferenças variando de -0,46 a 5,16 %. 70 % das amostras analisadas apresentaram teor de lipídeos superior aos 20 % preconizados pela legislação<sup>14</sup>.

Utilizando o método de Bligh Dyer, Oliveira et al<sup>17</sup> encontraram teores de lipídeos entre 0 e 2,81 %, inferiores aos rotulados para todas as amostras analisadas ( $n = 5$  marcas, em triplicata). Esse resultado pode ser devido à ausência de uma etapa de hidrólise no método empregado pelos

autores, visando romper ligações proteína-lipídeo, previamente à extração com solvente orgânico. Desta forma, o método selecionado não teria sido apropriado para o produto analisado, culminando em conclusões equivocadas em relação aos teores de lipídios totais dos suplementos avaliados.

O teor proteico das amostras variou de 39,72 % a 78,62 %, com média de 67,12 %. Foram observadas diferenças significativas entre os produtos analisados ( $p < 0,05$ ). A marca B, que apresentou o maior nível de proteínas, correspondeu ao único suplemento, dentre os analisados, que foi produzido a partir de proteínas isoladas, exclusivamente. No entanto, essa forma de *whey* deveria conter 90 % ou mais de proteína em sua composição, o que não foi evidenciado neste caso (**Tabela 1**). A quantidade de proteína das demais amostras, que apresentavam misturas de diferentes formas proteicas, variou entre 45,73 % e 77,46 %.

Quando confrontados os valores rotulados com os resultados analíticos reportados na **Tabela 1** foram evidenciadas diferenças entre 0,28 % e 11,38 %, ou seja, dentro do limite máximo de 20 % estabelecido pela legislação brasileira<sup>14</sup>. Vale destacar que, para a maioria das amostras, os valores experimentais foram inferiores aqueles relatados nos rótulos.

Diferentemente dos estudos realizados por Lovato et al<sup>16</sup>, INMETRO<sup>18</sup> e Oliveira et al<sup>17</sup> nos quais também foi empregado o método de Kjeldahl para análise proteínas de diferentes marcas de suplemento proteico do tipo *whey protein*, comercializadas em âmbito nacional, nesse experimento não foram encontradas irregularidades quanto ao teor proteico declarado pelos fabricantes, visto que todas as marcas estavam em concordância com o limite de 20 % permitido.

No estudo conduzido por Lovato et al<sup>16</sup>, 25 % ( $n = 4$  marcas, em triplicata) das amostras analisadas apresentaram teor proteico fora do limite de 20 % preconizado. No monitoramento realizado pelo INMETRO<sup>18</sup>, o percentual de amostras não conformes foi de 13,4 % ( $n = 15$  marcas, em triplicata), enquanto Oliveira et al<sup>17</sup> encontraram quantidades de proteínas inferiores ao rotulado e fora do limite estabelecido pela legislação em 60 % das amostras analisadas ( $n = 5$ ).

Entre as marcas analisadas nesse trabalho,

três foram coincidentes com as do estudo realizado pelo INMETRO<sup>18</sup> em 2014, no qual duas destas foram reprovadas no ensaio de determinação de proteínas. O resultado obtido nesse experimento indica que, provavelmente, as empresas tenham adequado seus produtos após a publicação dos resultados do INMETRO<sup>18</sup>.

Os teores de carboidratos das dez amostras analisadas variaram de 9,48 % a 43,15%, com média global de 18,63 %. Diferenças significativas foram observadas entre a maioria dos produtos analisados ( $p < 0,05$ ). Não foi observada uma relação entre o teor de carboidratos e o tipo de suplemento analisado (**Tabela 1**).

A fidedignidade dos rótulos, quanto aos teores de carboidratos declarados, foi verificada a partir da comparação com os resultados obtidos neste ensaio. Observou-se que 30 % das amostras analisadas apresentaram esse nutriente em quantidades que extrapolaram o limite de 20 % preconizado pela legislação<sup>14</sup>.

No estudo realizado por Lovato et al<sup>16</sup> para determinação do teor de carboidratos de suplementos proteicos, através do método de Lane-Eynon, todas as quatro amostras analisadas apresentaram variações no teor de carboidratos quando comparadas com os valores rotulados ( $n = 4$  marcas, em triplicata), no entanto, todas estavam em concordância com os 20 % estabelecidos pela ANVISA.

O INMETRO<sup>18</sup> que também analisou amostras de *whey protein* pelo método de Lane-Eynon, encontrou 11 marcas ( $n = 15$  marcas, em triplicata) apresentando diferença superior a 20 % em suas declarações de quantidade de carboidratos. Entre essas, 27,3 % continham teor de carboidratos abaixo do rotulado e 72,7 % acima.

Já no estudo de composição centesimal conduzido por Oliveira et al<sup>17</sup>, o teor de carboidratos de cinco amostras de suplementos proteicos do tipo *whey protein*, em triplicata, foi determinado por diferença. Nesse experimento, 100 % das marcas analisadas apresentaram teor de carboidratos diferente do rotulado, extrapolando o limite estabelecido pela legislação. Apenas um desses produtos apresentou teor de carboidratos inferior ao declarado.

### Avaliação da rotulagem

Os requisitos regulamentares de rotulagem avaliados para as diferentes marcas de suplementos proteicos para atletas encontram-se apresentados na **Tabela 3**.

Dentre as marcas avaliadas, todas apresentaram, no mínimo, um tipo de não conformidade frente à legislação, ou seja, 100 % dos rótulos analisados. Considerando todos os itens avaliados, foram encontrados 26,3 % de não conformidades, considerando-se o total de amostras. O percentual de não conformidades por amostra variou de 2,6 a 13,2 %. As marcas que apresentaram maior porcentagem de irregularidades foram as codificadas como A e H, que apresentaram 13,2 % de itens não conformes, cada. A marca E foi a que apresentou menor frequência de itens em desacordo com a legislação, correspondente a 2,6 % dos itens analisados.

Após analisar os rótulos segundo os requisitos estabelecidos pela RDC nº 259, de 20 de setembro de 2003<sup>28</sup>, as principais irregularidades observadas foram referentes à apresentação do prazo de validade (40 % das amostras); indicação terapêutica ou informação que induza o consumidor a erro (20 %); denominação de venda do alimento (10 %); e identificação da origem (10 %). A apresentação incorreta do prazo de validade, observada nas marcas C, F, G, H, pode prejudicar o entendimento do consumidor quanto ao período de estabilidade e segurança dos produtos. As marcas A e H traziam em seus rótulos, informações que poderiam induzir o consumidor ao engano, quanto às propriedades ergogênicas do produto. A marca C, foi denominada como: “Pó para o preparo de *shake* sabor artificial de chocolate”, não havendo indicações de que se trata de um suplemento proteico para atletas. Para identificar a origem, a marca A não utilizou nenhuma das seguintes expressões: “fabricado em...”, “produto...” ou “indústria...”.

Com relação aos itens da RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003<sup>14</sup> avaliados, 83,3 % encontraram-se em conformidade. O item referente à tolerância de  $\pm 20$  % com relação aos valores dos nutrientes declarados no rótulo deve ser

ressaltado, pois 80 % das amostras analisadas extrapolaram esse limite para alguns constituintes analisados (lipídeos totais e carboidratos). As irregularidades quanto ao teor de nutrientes são extremamente prejudiciais ao consumidor, uma vez que a maioria dos usuários desses produtos têm suas dietas baseadas no fracionamento do consumo de tais constituintes<sup>16</sup>.

Quanto aos requisitos estabelecidos pela RDC nº 54, de 12 de novembro de 2012<sup>29</sup>, foram observadas inconformidades em 18,2 % dos itens analisados. O *whey protein* é um tipo de produto que necessita ser reconstituído com adição de outros ingredientes, por isso seu rótulo deve apresentar a informação nutricional do alimento pronto para o consumo (preparado), conforme instruções indicadas pelo fabricante, no entanto essa exigência não foi vista em 20 % dos produtos analisados (marcas B e D), o que pode prejudicar o conhecimento do consumidor quanto às quantidades de nutrientes, de fato, encontradas no alimento pronto para consumo. Observou-se também que 10 % dos produtos analisados (marca F) não apresentaram a quantidade de açúcares, abaixo de carboidratos, em sua tabela de informação nutricional, o que impede a identificação correta do tipo de carboidrato presente naquele produto, pelo consumidor. Vale destacar que todas as amostras que fizeram INC declararam corretamente a quantidade do nutriente na tabela de informação nutricional atendendo as condições para sua declaração.

A informação da medida caseira, preconizada pela RDC nº 359, de 23 de dezembro de 2003<sup>30</sup>, não foi observada em 90 % dos rótulos. A ausência dessa informação pode prejudicar o consumidor ao preparar o alimento, caso perca o dosador original do produto, contido no interior de todas as amostras (**Tabela 2**). Somente a marca C apresentou esta informação.

Em nenhum dos rótulos analisados houve imagens e/ou expressões que fizessem referências a hormônios e outras substâncias farmacológicas e/ou do metabolismo, atendendo ao requisito estabelecido pela RDC nº 18 de 27 de abril de 2010<sup>13</sup>. Já expressões do tipo: “hipertrofia muscular”, “massa muscular”, foram encontradas em uma

das marcas analisadas (10 %), que foi a marca H. A inclusão dessas informações nos rótulos pode induzir consumidores a uma falsa ideia a respeito dos reais efeitos e/ou propriedades desses produtos, bem como estimular o consumo indiscriminado.

Observou-se que a frase “Este produto não substitui uma alimentação equilibrada e seu consumo deve ser orientado por nutricionista ou médico”, em destaque e em negrito, não estava presente em 10 % dos rótulos (marca C) e que imagens ou expressões que induzem o consumidor ao engano quanto a propriedades e/ou efeitos relacionado à perda de peso ou ganho de massa muscular foram encontradas em uma proporção de 20 % (marcas A e H). Essas não conformidades podem transmitir ao consumidor a ideia errada de que o uso desses produtos seria suficiente para suprir as suas necessidades nutricionais e proporcionar efeitos ergogênicos. É muito importante ainda, que a frase esteja presente para informar aos consumidores que o uso do produto deve ser orientado por profissionais de saúde, nutricionistas e médicos, que são habilitados para indicação correta dos suplementos proteicos e acompanhamento de seu uso, conforme as necessidades do paciente.

Os produtos analisados estavam de acordo com a Lei nº 10.674 de 16 de maio de 2003 e Portaria nº 157 de 19 de agosto de 2002.

O estudo realizado pelo INMETRO<sup>18</sup> para averiguação do atendimento dos rótulos dos suplementos proteicos do tipo *whey protein*, ao disposto na RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003<sup>14</sup>, relatou que todas as amostras estavam em concordância com os requisitos estabelecidos pela legislação, com exceção do item relacionado à tolerância de  $\pm 20\%$  com relação aos valores dos nutrientes declarados no rótulo. Além disso, 73,3 % destas apresentaram divergência de expressão de casas decimais.

Borges e Silva<sup>31</sup> realizaram um estudo observacional descritivo para avaliar 62 rótulos de suplementos proteicos a base de *whey protein* comercializados em Goiânia/GO. Nessa análise, todos os produtos analisados também apresentaram alguma inconformidade

**Tabela 3.** Requisitos de rotulagem para os quais foram detectadas não conformidades na verificação da adequação das dez marcas de suplementos proteicos avaliadas, segundo a legislação brasileira

Requisito regulamentado	Marca									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
<b>RDC nº 259/2002</b>										
Denominação de venda do alimento	C	C	NC	C	C	C	C	C	C	C
Identificação da origem	NC	C	C	NC	C	C	C	C	C	C
Nome e/ou razão social e endereço do importador, no caso de alimentos importados	NA	NA	NA	NA	NA	C	C	NA	NA	NA
Indicação terapêutica ou informação que não induza o consumidor a erro	NC	C	C	C	C	C	C	NC	C	C
Prazo de validade	C	C	NC	C	C	NC	NC	NC	C	C
<b>RDC nº 360/2003</b>										
Tolerância de $\pm 20\%$ com relação aos valores dos nutrientes declarados no rótulo	NC	NC	NC	NC	C	NC	NC	C	NC	NC
<b>RDC nº 359/2003</b>										
Informação da medida caseira	NC	NC	C	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
<b>RDC nº 54/2012</b>										
Quantidade do nutriente sobre o qual foi feita uma INC declarada na tabela de informação nutricional	C	C	C	C	C	C	C	NA	NA	C
Valores estabelecidos para o atributo “não contém”, declarados na tabela de informação nutricional como “zero”, “0” ou “não contém”	NA	C	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Indicação na tabela de informação nutricional da quantidade de açúcares abaixo dos carboidratos, para uma INC sobre a quantidade de açúcares	C	C	NA	C	C	NC	C	NA	NA	C
A INC refere-se ao alimento pronto para o consumo, preparado, quando for o caso, de acordo com as instruções de preparo indicadas pelo fabricante, sempre que estas propriedades não sejam perdidas	C	C	C	C	C	C	C	NA	NA	C
Declarações realizadas para os atributos “fonte” e “alto teor”, não podem considerar no cálculo da INC a contribuição nutricional dos ingredientes adicionados segundo as instruções de preparo	NA	C	C	C	NA	NA	NA	NA	NA	C

Cont.

Cont. **Tabela 3**

<i>RDC nº 54/2012</i>										
O rótulo de alimentos com INC, que necessitam ser reconstituídos com adição de outros ingredientes, deve apresentar a informação nutricional do alimento pronto para o consumo (preparado), conforme instruções de preparo indicadas pelo fabricante. Ficam excluídos desta obrigatoriedade os produtos que sejam reconstituídos somente com água	C	NC	C	NC	C	C	C	NA	NA	C
INC que não possibilite interpretação errônea pelo consumidor	C	C	C	C	C	C	C	NA	NA	C
INC que não incentive o consumo excessivo do produto	C	C	C	C	C	C	C	NA	NA	C
INC que não sugira que o produto seja nutricionalmente completo	C	C	C	C	C	C	C	NA	NA	C
INC redigida no idioma oficial do país de consumo (espanhol ou português), sem prejuízo da existência de textos em outros idiomas	C	C	C	C	C	C	C	NA	NA	C

<i>RDC nº 18/2010</i>										
Presença da frase “Este produto não substitui uma alimentação equilibrada e seu consumo deve ser orientado por nutricionista ou médico”	C	C	NC	C	C	C	C	C	C	C
Imagens e/ou expressões que induzam o consumidor a engano quanto a propriedades e ou efeitos que não possuam ou não possam ser demonstrados referentes a perda de peso, ganho ou definição de massa muscular e similares	NC	C	C	C	C	C	C	NC	C	C
Expressões do tipo: “anabolizantes”, “hipertrofia muscular”, “massa muscular”, “queima de gorduras”, “ <i>fatburners</i> ”, “aumento da capacidade sexual”, “anticatabólico”, “anabólico”, equivalentes ou similares, não inscritas	C	C	C	C	C	C	C	NC	C	C

Legenda: C (conforme), NC (não-conforme) e NA (não se aplica)

INC (Informação Nutricional Complementar), Demais regulamentos e respectivos requisitos avaliados foram considerados conformes para todas as marcas estudadas

em sua rotulagem quando comparados com a legislação vigente, destacando-se: a denominação do produto (27,63 %); a descrição dos cuidados de armazenamento e conservação (28,95 %); as informações incorretas que possam induzir o consumidor a equívoco em relação ao alimento (18,42 %); efeito ou propriedades do produto (7,89 %); a advertência de “contem ou não glúten” (3,29 %); e expressões “anabolizantes”, “*body buinding*”, “hipertrofia muscular” ou equivalentes (3,29 %), a qual se aproxima da porcentagem obtida no presente estudo (2,63 %).

Esses resultados mostram que muitos fabricantes distribuem produtos que não atendem aos requisitos estabelecidos pela legislação para rotulagem de suplementos proteicos. A fiscalização contínua desses produtos é importante para garantir que os consumidores tenham acesso a informações corretas sobre os produtos que adquirem.

Na **Tabela 4** estão apresentadas as orientações de preparo e as sugestões de uso recomendadas pelos fabricantes dos produtos analisados. Observou-se que 30 % das marcas analisadas (marcas, A, F e G) não ofereceram nenhuma indicação de uso, o que pode incentivar a busca do consumidor por orientação profissional ou favorecer o consumo inadequado do produto. Ademais, metade das sugestões de uso dadas pelos fabricantes poderiam levar o usuário a um consumo excessivo de proteínas (marcas B, C, E, H e J). Como visto anteriormente, a ingestão deste macronutriente acima dos níveis recomendados não favorece ganho de massa muscular adicional e nem promove melhora do desempenho no exercício físico, além de prejudicar órgãos como fígado e rins pela sobrecarga de atividade, já que estes são responsáveis por quebrar e excretar proteínas<sup>32</sup>.

Apenas 20 % das marcas (marcas D e H) acrescentaram nas sugestões de uso expressões como “ou de acordo com a orientação profissional”, essa baixa porcentagem de termos que podem estimular a busca por orientações médicas e nutricionais, favorece o uso indiscriminado dos suplementos

proteicos, como tem ocorrido atualmente.

## CONCLUSÃO

Os resultados encontrados nesse estudo mostram que há divergências entre os valores de nutrientes rotulados e os valores obtidos pela análise de composição centesimal, fato preocupante, pois quaisquer flutuações na quantidade de componentes essenciais podem afetar os resultados esperados tanto pelo consumidor quanto pelo profissional nutricionista, que baseiam suas expectativas de resultados no uso do suplemento prescrito.

É importante que haja maior controle da composição nutricional desses produtos, os quais geralmente fazem parte de uma dieta com elevado controle de nutrientes. Por isso, fica evidente a necessidade de um estreitamento do limite de 20 % permitido pela legislação, aliado a uma fiscalização mais efetiva, como forma de melhorar a qualidade e minimizar os impactos para a saúde dos consumidores destes produtos.

Quanto à avaliação da rotulagem, observou-se que todas as amostras apresentaram alguma irregularidade frente à legislação. Essa constatação ressalta a necessidade e a importância da fiscalização contínua e rigorosa dos rótulos de suplementos proteicos, de forma a garantir que os consumidores tenham acesso a informações fidedignas sobre os suplementos proteicos. Vale ressaltar a falta de padronização nas orientações de uso descritas pelos fabricantes, visto que algumas delas poderiam induzir os usuários a um consumo de proteínas superior a dose diária recomendada.

Alimentos fora de suas especificações técnicas geram impactos negativos para a saúde da população, de forma que os resultados apresentados no presente estudo são relevantes porque indicam uma necessidade premente de ações dos órgãos reguladores, bem como da responsabilização das empresas produtoras ou importadoras pela qualidade dos mesmos.

**Tabela 4.** Modos de preparo, indicação de uso e doses proteicas diárias estimadas, segundo recomendações dos fabricantes, para as dez marcas de suplementos proteicos avaliadas

Marca	Modo de preparo	Indicação de uso	Dose proteica diária estimada
A	Adicionar duas medidas dosadoras (40 g) em um copo (200 mL) de água ou bebida de sua preferência, mexer até a diluição completa ou de acordo com a orientação profissional	-	1 porção ao dia: 21 g, ou seja, 28 % V.D. (*)
B	Dissolva duas colheres medidas (30 g) em aproximadamente 300 mL de água gelada, leite de soja ou suco de sua preferência	Beba antes das refeições, ou, antes e depois das atividades físicas	3 porções ao dia: 81 g, ou seja, 108 % V.D. (*) 2 porções ao dia: 54 g, ou seja, 72 % V.D. (*)
C	Adicione 40 g de <i>whey protein</i> (dois dosadores cheios ou 4 colheres de sopa) em 300 mL de água gelada ou leite desnatado. Bater no liquidificador por 45 segundos e ingerir imediatamente após o preparo	Tomar uma porção até 2 horas antes da atividade física, outra até 1 hora após o treino e para complementar, mais uma porção pelo menos duas horas antes de dormir.	3 porções ao dia: 48 g, ou seja, 63 % V.D. (*)
D	Dissolva duas colheres dosadoras cheias (36 g) do produto em 250 mL (1 copo) de água, suco de fruta, ou leite desnatado	Tome 1 ou mais vezes ao dia, pela manhã e/ou logo após as atividades físicas ou de acordo com a orientação profissional.	1 porção ao dia: 28 g, ou seja, 37 % V.D. (*)
E	Adicionar duas medidas (em média 30 g) em 200 mL de água e misturar. Preparo instantâneo. Experimente também com leite desnatado, frutas ou com sua bebida preferida	Tome 1 a 2 porções ao dia	1 porção ao dia: 23 g, ou seja, 31 % V.D. (*) 2 porções ao dia: 46 g / 62 % V.D. (*)
F	Dissolva 1 colher medida a cerca de 300 mL de água, misture até obter uma mistura homogênea	-	1 porção ao dia: 24 g, ou seja, 32 % V.D. (*)
G	Dissolva 1 colher medida a 240 mL de água, misture até obter uma mistura homogênea	-	1 porção ao dia: 25 g, ou seja, 33 % V.D. (*)
H	Misture 40 g do pó (equivalente a duas medidas) em 200 mL de leite desnatado gelado ou água gelada e bata no liquidificador ou misturador elétrico até ficar homogêneo	Consumir 1 a 2 porções ao dia, próximo ao treino, ou conforme a sugestão do nutricionista ou médico.	1 porção ao dia: 28 g, ou seja, 37 % V.D. (*) 2 porções ao dia: 56 g, ou seja, 74 % V.D. (*)
I	Dissolver 32 g (2 ½ colheres medida) em 200 mL de água ou bebida de sua preferência e bater no mixer ou liquidificador	Consumir uma ou mais doses diariamente, conforme necessidade	1 porção ao dia: 24 g, ou seja, 32 % V.D. (*)
J	Adicionar 2 medidas do dosador interno (40 g) do pó para o preparo de bebida a base de proteína a 200 mL de água. Misture bem ou bata no liquidificador	Consumir de 1 a 2 porções ao dia	1 porção ao dia: 24 g, ou seja, 32 % V.D. (*) 2 porções ao dia: 48 g, ou seja, 64 % V.D. (*)

(\*) % Valores diários com base em uma dieta de 2000 kcal ou 8400 KJ

## REFERÊNCIAS

1. Reis C, Mello NA, Confortin FG. Conhecimento nutricional de usuários e não usuários de suplementos alimentares em academias de uma cidade do oeste de Santa Catarina. *Rev Bras Nutr Esportiva*. 2012;6(34):250-260.
2. Araújo ACM, Soares YNG. Perfil de utilização de repositores proteicos nas academias de Belém, Pará. *Rev Nutr*. 1999;12(1):5-19.
3. Santos MAA, Santos RP. Uso de suplementos alimentares como forma de melhorar a performance nos programas de atividade física em academias de ginástica. *Rev Pau Educ Fís*. 2002;16(2):174-185.
4. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 29, de 13 de janeiro de 1998. Aprova o regulamento técnico referente a alimentos para fins especiais. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, Brasília, 30 mar. 1998.
5. Conselho Federal de Nutricionistas. Resolução nº. 380, de 9 de dezembro de 2005. Dispõe sobre a definição das áreas de atuação do nutricionista e suas atribuições, estabelece parâmetros numéricos de referência, por área de atuação, e dá outras providências. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, Brasília, 10 jan. 2006; Seção 1.
6. Machado DZ, Schneider AP. Consumo de suplementos alimentares entre frequentadores de uma academia de ginástica de Porto Alegre - RS. *Rev Nutrição em Pauta*. 2006;35(1):12-17.
7. Carrilho LH. Benefícios da utilização da proteína do soro de leite whey protein. *Rev Bras Nutr Esportiva*. 2013;7(40):195-203.
8. Poll FA, Lima AP. Consumo de suplementos alimentares por universitários da área da saúde. *Cinergis*. 2013;14(1):33-37. [DOI: <http://dx.doi.org/10.17058/cinergis.v14i1.3961>].
9. Fayh APT, Silva CV, Jesus FRD, Costa GK. Consumo de suplementos nutricionais por frequentadores de academias da cidade de Porto Alegre. *Rev Bras Nutr Esportiva*. 2013; 3(17):423-431. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-32892013000100004>].
10. Costa DC, Rocha NCA, Quintão DF. Prevalência do uso de suplementos alimentares entre praticantes de atividade física em academias de duas cidades do Vale do Aço/MG: fatores associados. *Rev Bras Nutr Esportiva*. 2013;35(1):27-37.
11. Pontes MCF. Uso de suplementos alimentares por praticantes de musculação em academias de João Pessoa - PB. *Rev Bras Nutr Esportiva*. 2013;7(37):19-27.
12. Wagner M. Avaliação do uso de suplementos nutricionais e outros recursos ergogênicos por praticantes de musculação em academias de um bairro de Florianópolis-SC. *Rev Bras Nutr Esportiva*. 2011;5(26):130-134.
13. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 18, de 27 de abril de 2010. Aprova o regulamento técnico sobre alimentos para atletas. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, Brasília, 27 abr. 2010.
14. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. 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, 26 dez. 2003.
15. Moreira SSP, Cardoso FT, Souza GG, Silva EB. Avaliação da adequação da rotulagem de suplementos esportivos. *Corpus et Scientia*. 2013;9(2):45-55.
16. Lovato F, Kowaleski J, Santos LR, Silva SZ. Avaliação da conformidade de suplementos alimentares frente à legislação vigente. *Rev Bras Nutr Esportiva*. 2014;8(47):330-335.
17. Oliveira LCBP, Laruccia GS, Melo KCA, Diniz IG, Araújo LBA. Análise centesimal e comparativa de suplementos de proteínas do soro de leite bovino: whey protein. *Rev Bras Nutr Esportiva*. 2015;9(51):223-23.
18. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - INMETRO. Programa de Análise de Produtos: Relatório final sobre a análise em suplementos proteicos para atletas - whey protein. 2014. [acesso 2015 Out 15]. Disponível em: [[http://www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/Relatorio\\_Whey\\_Final.pdf](http://www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/Relatorio_Whey_Final.pdf)].



19. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 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, 12 dez. 2006.
20. Association of Official Analytical Chemists - AOAC. Official methods of analysis of the AOAC International. 18 ed. Rev. 2. Horwitz W, Latimer JR. G.W. (Editors) Gaithersburg, Maryland: AOAC; 2007.
21. 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.crq4.org.br/sms/files/file/analisedealimentosial\\_2008.pdf](http://www.crq4.org.br/sms/files/file/analisedealimentosial_2008.pdf)].
22. International Organization for Standardization - ISO. ISO 1736. Dried milk and dried milk - products determinations of fat content – Gravimetric method (Reference method). Geneva: ISO, 2008. 1-8 p.
23. International Organization for Standardization - ISO. ISO 8968. Milk - Determination of nitrogen content. Part 1: Kjeldahl method. Geneva: ISO, 2001. 1-11 p.
24. Nielsen SS. Food Analysis. 4ª ed. West Lafayette (IN): Springer; 2009.
25. Santos ALS. Potencial antioxidante e adequação da rotulagem de bebidas de uva [Trabalho de Conclusão de Curso]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais; 2014.
26. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. Princípio de Secagem em Alimentos. Planaltina (DF): Embrapa Cerrados, 2010. [acesso 2016 jun 21]. Disponível em: [<https://core.ac.uk/download/files/574/15445760.pdf>].
27. Jorge N. Embalagens para alimentos. São Paulo (SP): Cultura Acadêmica, 2013. [acesso 2015 nov 17]. Disponível em: [<http://www.santoandre.sp.gov.br/pesquisa/ebooks/360234.PDF>]
28. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 259, de 20 de setembro de 2002. Aprova o regulamento técnico sobre rotulagem de alimentos embalados. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 23 set. 2002.
29. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 54, de 12 de novembro de 2012. Dispõe sobre regulamento técnico sobre informação nutricional complementar. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 12 nov. 2012.
30. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 359, de 23 de dezembro de 2003. Aprova regulamento técnico de porções de alimentos embalados para fins de rotulagem nutricional. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 23 dez. 2003.
31. Borges NRA, Silva PP. Avaliação da rotulagem de suplementos proteicos comercializados na cidade de Goiânia-GO [Trabalho de Conclusão de Curso]. Goiânia (GO): Universidade Paulista; 2011.
32. Sociedade Brasileira de Medicina do Esporte - SBME. Modificações dietéticas, reposição hídrica, suplementos alimentares e drogas: comprovação de ação ergogênica e potenciais riscos para a saúde. *Rev Bras Med Esporte*. 2009;15(3):3-12.



# Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in bovine milk samples consumed in different regions of Brazil

## Ocorrência de aflatoxina M<sub>1</sub> em amostras de leite bovino consumido em diferentes regiões do Brasil

RIALA6/1704

Luzia SHUNDO<sup>1\*</sup>, Adriana Palma de ALMEIDA<sup>1</sup>, Janete ALABURDA<sup>2</sup>, Leda Conceição Antonia LAMARDO<sup>1</sup>, Sandra Aparecida NAVAS<sup>3</sup>, Valter RUVIERI<sup>1</sup>, Myrna SABINO<sup>1</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Núcleo de Contaminantes Orgânicos, Centro de Contaminantes, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, São Paulo, SP, Brasil. CEP: 01246-000. Tel: 11 3068 2922. E-mail: lushundo@ial.sp.gov.br

<sup>2</sup>Centro de Contaminantes, Instituto Adolfo Lutz

<sup>3</sup>Núcleo de Águas e Embalagens, Centro de Contaminantes, Instituto Adolfo Lutz

Recebido: 27.11.2015 - Aceito para publicação: 31.05.2016

### ABSTRACT

Two hundred and fifty-seven samples of milk proceeding from different geographical regions of Brazil were analyzed for determining the presence of aflatoxin M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>). The AFM<sub>1</sub> extraction was carried out using immunoaffinity column, separated by reversed-phase (C-18) high performance liquid chromatography (HPLC), and quantified by fluorescence detector. The Limits of Quantification (LOQ) were 0.008 µg/kg and 0.080 µg/kg to the fluid and the powder milk, respectively. AFM<sub>1</sub> were detected in 209 (81.3 %) samples, being 26 (63.4 %), 105 (84.0 %) and 78 (85.7 %) of pasteurized, UHT (Ultra-high Temperature) and powder milk, respectively. The highest concentration of AFM<sub>1</sub> in powder milk was found in one sample from Minas Gerais (1.210 µg/kg). In UHT and pasteurized milk, the highest levels were detected in one sample from Sergipe (0.120 µg/kg) and one sample from Goiás (0.050 µg/kg), respectively. None of the samples analyzed in this study exceeded the Brazilian legal limits for AFM<sub>1</sub>.

**Keywords.** mycotoxins, immunoaffinity column, high performance liquid chromatography, exposure assessment.

### RESUMO

Duzentas e cinquenta e sete amostras de leite provenientes das diferentes regiões geográficas do Brasil foram analisadas para realizar a determinação de aflatoxina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>). As AFM<sub>1</sub> foram extraídas por meio de colunas de imunoafinidade, separadas por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (C-18) e quantificadas por detector de fluorescência (CLAE-FL). Os limites de quantificação (LQ) foram de 0,008 µg/kg e 0,080 µg/kg para o leite fluido e em pó, respectivamente. AFM<sub>1</sub> foi detectada em 209 (81,3 %) amostras, sendo 26 (63,4 %), 105 (84,0 %) e 78 (85,7 %) para o leite pasteurizado, UHT (*Ultra-high Temperature*) e em pó, respectivamente. A maior concentração de AFM<sub>1</sub> no leite em pó foi encontrada em uma amostra proveniente de Minas Gerais (1,210 µg/kg). No leite UHT e pasteurizado, os maiores níveis foram encontrados em uma amostra de Sergipe (0,120 µg/kg) e Goiás (0,050 µg/kg), respectivamente. Nenhuma amostra analisada ultrapassou os limites da legislação brasileira em vigor para AFM<sub>1</sub>.

**Palavras-chaves.** micotoxinas, coluna de imunoafinidade, cromatografia líquida de alta eficiência, estimativa de exposição.

## INTRODUCTION

In the last decades, there is an increasing concern on quality of animal products consumed by Brazilian population. Among these products, dairy products represents an important segment in the agribusiness, once concerning milk and their products play an important role in the food supply, job generation and income for society. It is placed among the six most important products of Brazilian agriculture and livestock sector. Besides its economic relevance, the consumption of milk is of great importance in view of its high nutritional value and represents a natural source of carbohydrates, proteins, fats, vitamins and minerals in different dispersion forms. Milk production and consumption in Brazil is increasing at an annual rate of 4 % with a significant growth potential for the next years. Among the MERCOSUL member countries, the Brazilian milk production account for 66 % of the total volume production<sup>1</sup>.

Even though the milk consumption offers health benefits, milk could also be a source of toxic substances such as Aflatoxin M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>). Derived from Aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) presents in feed consumed by dairy cattle, the presence of AFM<sub>1</sub> is considered undesirable due to its carcinogenic properties<sup>2,3</sup>. Although AFM<sub>1</sub> is less carcinogenic and mutagenic than AFB<sub>1</sub>, it exhibits similar genotoxic activity to AFB<sub>1</sub> demonstrates in studies conducted in animals and certainly represents health risk to population exposed to this mycotoxin<sup>4</sup>. According to IARC (International Agency for Research on Cancer), AFM<sub>1</sub> is classified as Group 2B agent<sup>5</sup>.

The presence of AFM<sub>1</sub> in milk and milk products represents a worldwide concern, mainly because these products are widely consumed by children who are more susceptible to the adverse effects of mycotoxins. The maximum tolerable limits of AFM<sub>1</sub> established by Brazilian Ministry of Health<sup>6</sup> are 0.5 µg/kg and 5.0 µg/kg for fluid and powder milk, respectively.

The aim of this study was to investigate the occurrence of AFM<sub>1</sub> in milk samples proceeding from different Brazilian geographical regions, determined by high performance liquid

chromatography (HPLC) with fluorescence detection (FL), using immunoaffinity column (IC) for clean-up.

## MATERIAL AND METHODS

### Samples

A total of 257 samples of ultra-high temperature (UHT) treated milk (n=125), powder milk (n=91) and pasteurized milk (n=41) proceeding from different geographical regions of Brazil, were analyzed for AFM<sub>1</sub>, during 2010. The samples were collected at random according to market availability by local health offices (state and municipal) and sent to the laboratory properly cooled, when it is required. All information on samples was taken from the labels.

### Reagents and standard

AFM<sub>1</sub> standard was purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA) and prepared as described by Scott<sup>7</sup>. Acetonitrile and methanol were HPLC grade from Merck (Darmstadt, Germany) and others chemicals were analytical grade from Merck (Darmstadt, Germany). Water was ultrapurified by Synergy UV System (Millipore SAS, Molsheim, France).

### Preparation of samples

*Fluid milk:* Homogenized milk samples were centrifuged 15 min/1780xg/4 °C. After centrifugation the upper cream layer was discarded and the skimmed milk was used to be applied to immunoaffinity column extraction.

*Powder milk:* Ten grams of powder milk was dissolved with ultrapurified water and make up to 100 mL by stirring for 10 min/approximately 37 °C. Following, these samples were treated as fluid milk (described previously).

### Immunoaffinity column clean-up

An aliquot of 50 mL of skimmed milk at room temperature was passed through immunoaffinity column (AflaM<sub>1</sub> HPLC-VICAM). The proceedings of washing and elution steps were performed following the manufacturer's instructions. The eluate was evaporated to dryness using a N<sub>2</sub> stream, the residue was dissolved

in 400 µL mobile phase and an aliquot (20 µL) was injected into the HPLC equipment<sup>8</sup>.

### Determination of AFM<sub>1</sub> by HPLC with FL

HPLC was performed on GBC system (GBC, Dandenong, Victoria, Australia) equipped with a LC 1110 HPLC pump, LC 1255 fluorescence detector. The HPLC column was a LiChrosorb C-18 (250 x 4 mm, 5 µm – Merck, Darmstadt, Germany) and guard column was Phenomenex C-18 (4 x 3 mm). The mobile phase consisted of acetic acid 2 % aqueous solution-acetonitrile-methanol (40:35:25; v/v/v) and flow rate was 0.6 mL/min. The excitation and emission wavelengths were 360 nm and 430 nm, respectively.

Linearity was expressed by the linear correlation coefficient (r) of analytical curve obtained from five different points (triplicate) of external standard calibration with concentration ranging from 1 - 10 ng/mL of AFM<sub>1</sub> solution, equivalent to 0.008 µg/kg – 0.080 µg/kg for fluid milk and to 0.080 µg/kg – 0.800 µg/kg for powder milk.

The Limits of Detection (LOD) and LOQ values were calculated as 3-fold and 10-fold, respectively of the standard deviation concentration plus the mean values of five replicate of blank matrix.

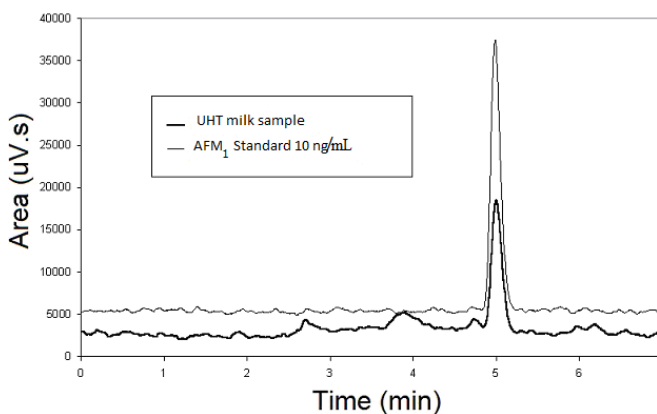
Recovery experiments were carried out in triplicate by spiking aflatoxin-free fluid milk with amounts of AFM<sub>1</sub> standard solution, resulting as final concentration 0.010 µg/kg, 0.020 µg/kg and 0.050 µg/kg.

To use the same units described in the legislation, the concentration of the samples taken in µg/L was expressed in µg/kg using the factor 0.971 (average density of milk) as the volume/weight compensation.

## RESULTS AND DISCUSSION

The analytical curve obtained by least-squares regression were linear presenting linear in the range 1 - 10 ng/mL (equivalent to 0.008 µg/kg - 0.080 µg/kg for fluid milk and 0.080 µg/kg - 0.800 µg/kg for powder milk) with correlation coefficient of 0.9992. The recoveries were 87.2 %, 85.5 % and 80.7 % at levels of 0.010 µg/kg, 0.020 µg/kg and 0.050 µg/kg and the relative standard deviations were 5.5 %, 5.0 % and 4.2 %, respectively, for fluid milk. The LOD were 0.003 µg/kg and 0.030 µg/kg and the LOQ were 0.008 µg/kg and 0.080 µg/kg, respectively, for fluid and powder milk. **Figure 1** shows chromatograms of AFM<sub>1</sub> standard and a naturally contaminated UHT milk sample.

The incidence and the range of AFM<sub>1</sub> levels are presented in **Table 1**. From a total of 257 milk samples, AFM<sub>1</sub> was found in 209 (81.3 %) and none of samples exceeded the Brazilian legislation<sup>6</sup>.



**Figure 1.** Chromatograms of AFM<sub>1</sub> standard and a naturally contaminated UHT milk sample

**Table 1.** Occurrence of AFM<sub>1</sub> in pasteurized, UHT and powder samples

Type of milk	Nº of samples	Nº of contaminated samples (%)	Frequency distribution of AFM <sub>1</sub> (µg/kg)		
			LOD*†-0.05	0.05†-0.10	≥0.10
Pasteurized	41	26 (63.4)	26	0	0
UHT	125	105 (84.0)	97	7	1
Powder	91	78 (85.7)	9	16	53
<b>Total</b>	<b>257</b>	<b>209 (81.3)</b>	<b>132</b>	<b>23</b>	<b>54</b>

\* Limits of Detection (LOD) = 0.003 µg/kg and 0.030 µg/kg for fluid and powder milk, respectively

The frequency of AFM<sub>1</sub> in UHT and powder milk, as well as its distribution in different Brazilian geographic regions were summarized in **Tables 2** and **3**. AFM<sub>1</sub> determination in pasteurized milk was carried out in samples originating from Brazilian Southeast (n=36) and Central west (n=5) region. AFM<sub>1</sub> was found in 21 (58.3 %) and 5 (100 %) of samples, respectively.

The results of the present study indicate a high incidence of AFM<sub>1</sub> in all type of milk samples. Although the number of pasteurized milk samples might not be considered enough to comparison, in a general way the incidence of the AFM<sub>1</sub> in fluid milk presented major variations among the different regions when compared with powder milk.

**Table 2.** Distribution of UHT milk samples by geographic region, number of positive samples and range of AFM<sub>1</sub> concentration

Region	N° of samples	≥ LOD* (%)	Range (µg/kg)
Southeast	29	28 (96.6)	LOD-0.100
Central west	30	25 (83.3)	LOD-0.041
Northeast	29	21 (72.4)	LOD-0.120
North	11	6 (54.5)	0.010-0.029
South	26	25 (96.2)	LOD-0.033
<b>Total</b>	<b>125</b>	<b>105 (84.0)</b>	

\* Limit of Detection (LOD) = 0.003 µg/kg

**Table 3.** Distribution of powder milk samples by geographic region, number of positive samples and range of AFM<sub>1</sub> concentration

Region	N° of samples	≥ LOD* (%)	Range (µg/kg)
Southeast	39	36 (92.3)	LOD-1.210
Central west	28	23 (82.1)	0.036-0.378
Northeast	10	7 (70.0)	LOD-0.140
North	7	6 (85.7)	LOD-0.760
South	7	6 (85.7)	0.117-0.420
<b>Total</b>	<b>91</b>	<b>78 (85.7)</b>	

\*Limit of Detection (LOD) = 0.030 µg/kg

The highest concentration of AFM<sub>1</sub> was found in Northeast region (0.120 µg/kg) and in Southeast region (1.210 µg/kg) for fluid and powder milk, respectively. In Brazil, the largest producer states are located in the Southeast (Minas Gerais state), Central west (Goiás state) and South (Paraná and Rio Grande do Sul state) regions<sup>9</sup>.

As summarized in **Table 4**, different studies carried out in Brazil reported varied levels both in frequency of AFM<sub>1</sub> in milk and its levels of contamination.

The differences between results observed in these studies may be explained by the higher efficiency of analytical methods with better extraction and clean up steps, as well as improvement of separation and detection process occurred along the past years. In addition, ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) techniques have been used to determine presence of AFM<sub>1</sub> in milk<sup>25-27</sup>. This method provides speed and high sensitivity although its considered a screening method.

In comparison with recent data, the results of this study are comparable with the incidence of AFM<sub>1</sub> reported by others investigators in different countries<sup>25-31</sup>, showing high incidence and predominantly low levels.

The estimated daily intake (EDI) was calculated on UHT milk, considering its availability and increased consumption of this type of milk in the last decades<sup>32</sup>. On the basis of mean concentration of AFM<sub>1</sub> in UHT milk (0.021 µg/kg) and an intake of 400 mL of milk for 23 kg as body weigh (bw) for children<sup>8</sup>, the ingestion of AFM<sub>1</sub> was 0.365 ng/kg bw. For adult, the EDI was 0.123 ng/kg bw, assuming a body weigh of 60 kg and milk consumption of 350 mL. The results found in this study was similar to Santili et al<sup>10</sup> which calculated EDI was 0.358 ng/kg bw and 0.120 ng/kg bw for children and adult, respectively, for fluid milk. Santos et al<sup>12</sup> found an EDI for fluid and powder milk of 0.468 ng/kg bw for adolescents and 0.384 ng/kg bw for adult. In a study conducted in 2009 Shundo et al<sup>8</sup> found an EDI of 0.23 ng/kg bw and 0.08 ng/kg bw for children and adult, respectively, for fluid milk.

**Table 4.** Occurrence of AFM<sub>1</sub> in cattle milk in Brazil

Type of milk	N° of samples	N° of positive samples (%)	Range (µg/kg)	Method	Reference
raw	635	334 (52.6)	0.012-0.725	HPLC	10
UHT	152	133 (87.5)	----	HPLC	11
different types	42	42 (100.0)	0.010-0.810	ELISA	12
raw	30	11 (36.7)	0.010-0.645	HPLC	13
different types	125	119 (95.2)	0.010-0.200	HPLC	8
raw	50	21 (42.0)	0.010-0.645	HPLC	14
fluid	48	37 (77.1)	0.011-0.251	HPLC	15
fluid	139	111 (79.9)	-----	HPLC	16
different types	61	50 (82.0)	0.006-0.077	HPLC	17
raw	42	10 (23.8)	0.29-1.97	ELISA	18
different types	110	5 (4.5)	-----	ELISA/TLC	19
reconstituted	300	33 (11.0)	0.01-1.000	ELISA	20
different types	144	0 (0.0)	---	TLC	21
fluid	224	4 (1.8)	traces-2.000	TLC	22
different types	100	1 (1.0)	0.100-1.700	TLC	23
raw	50	9 (18.0)	0.100-1.700	TLC	23
fluid	6	3 (50.0)	0.025-0.500	Fluorodensitometry	24

HPLC: High performance liquid chromatography; ELISA: Enzyme linked immunosorbent assay; TLC: Thin-layer chromatography; traces: < 0.025 µg/kg

Leblanc et al<sup>33</sup> estimated a daily intake in french population in 0.09 ng/kg bw for adult and 0.22 ng/kg bw per day for children. In Spain, Cano-Sancho et al<sup>25</sup> reported values of 0.305 ng/kg bw for the adult population and Duarte et al<sup>34</sup> described an EDI of 0.08 ng/kg bw per day for adult Portuguese citizen.

The mycotoxins especially the AFM<sub>1</sub> are usually present at low levels in food, and the chronic effects take the greatest role to health. In addition since it is a genotoxic carcinogens, no tolerable daily intake (TDI) can therefore be set. The JECFA (Joint Expert Committee on Food Additives)<sup>4</sup> concluded that daily exposure as low as <1 ng/kg bw does not contributes to the risk of liver cancer and recommended to reduce the levels of this type

of substances to limits as low as reasonable achievable (ALARA principle)<sup>35</sup>.

Data and information of AFM<sub>1</sub> occurrence available in literature are used by internationally recognized organization such as Codex Alimentarius Commission (CAC), Food Drug and Administration (FDA) and European Communities (EC) to carry out studies of exposure assessment and set the maximum tolerable limit of these substances in food. Relating to this mycotoxin regulation, the Commission of the European Communities<sup>36</sup> has set more strict limits (0.050 µg/kg) than established in our country. This low level in European countries has in turn resulted in the fairly stringent regulation of AFB<sub>1</sub> in complementary feed stuffs in dairy cattle in the EC.

## CONCLUSION

Although none of samples exceeded the Brazilian legislation, the presence of AFM<sub>1</sub> in milk represents an important public health problem, mainly because it is consumed by the infant population, who are more susceptible to the toxic and carcinogenic effects.

Besides, the aflatoxins are recurrent and their formation in food and feed may sometimes be difficult to avoid due to the fact that these contamination have a directly relation with the climatic conditions such as temperature and humidity. For these reasons, an effective strategy to control AFB<sub>1</sub> in feed and a systematic AFM<sub>1</sub> monitoring program under obligatory mycotoxin regulation limits, altogether with an accurate and validated analytical technique constitutes an important strategy to reduce their health risk and economic loss.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank CNPq/MAPA (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico)/(Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) for supporting this study (n° 578224/2008-9).

## REFERENCES

1. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA. Gado de leite/Importância econômica. [cited 2014 Nov 21]. Available from: [http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/LeiteSudeste/importancia.html].
2. Pong RS, Wogan GN. Toxicity and biochemical and fine structural effects of synthetic aflatoxin M<sub>1</sub> and B<sub>1</sub> in rat liver. *J Natl Cancer Inst*. 1971;47(3):585-601. [DOI: https://doi.org/10.1093/jnci/47.3.585].
3. Hsieh DPH, Cullen JM, Ruebner BH. Comparative hepatocarcinogenicity of aflatoxins B<sub>1</sub> and M<sub>1</sub> in the rat. *Food Chem Toxicol*. 1984;22(12):1027-8. [DOI: https://doi.org/10.1016/0278-6915(84)90160-1].
4. Joint Expert Committee on Food Additives - JECFA. Fifty-sixth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Safety evaluation of certain mycotoxins in food; Geneva: World Health Organization; 2001. (WHO Food Additives Series; 47/FAO Food and Nutrition; Paper 74).
5. International Agency for Research on Cancer – IARC. Aflatoxins. In: Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon: World Health Organization; 1993. p.362 (Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins; vol. 56).
6. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC nº 07, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. *Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 9 mar. 2011. Seção 1, nº46. p.66.
7. Scott PM. Natural Toxins. In: Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists - AOAC. 16th edition, Maryland: AOAC; 1997, v. II, p.3-4.
8. Shundo L, Navas SA, Lamardo LCA, Ruvieri V, Sabino M. Estimate of Aflatoxin M<sub>1</sub> exposure in milk and occurrence in Brazil. *Food Control*. 2009;20(7):655-7. [DOI: https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.09.019].
9. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Estatística da produção agropecuária. [cited 2014 Nov 21]. Available from: [http://www1.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos\_201401\_publ\_completa.pdf].
10. Santili AB, Camargo AC, Nunes RSR, Gloria EM, Machado PF, Cassoli LD, et al. Aflatoxin M<sub>1</sub> in raw milk from different regions of São Paulo state – Brazil. *Food Addit Contam Part B Surveill*. 2015;8(3):207-14. [DOI: https://doi.org/10.1080/19393210.2015.1048538].

11. Silva MV, Janeiro V, Bando E, Machinsky Junior M. Occurrence and estimative of aflatoxin M<sub>1</sub> intake in UHT cow milk in Paraná State, Brazil. *Food Control*. 2015;53:222-5. [DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.01.025>].
12. Santos JS, França VR, Katto S, Santana EHW. Aflatoxin M<sub>1</sub> in pasteurized, UHT milk and milk powder commercialized in Londrina, Brazil and estimation of exposure. *Arch Latinoam Nutr*. 2015;65(3):181-5.
13. Oliveira CAF, Sebastião LS, Fagundes H, Rosim RE, Fernandes AM. Determinação de aflatoxina B<sub>1</sub> em rações e aflatoxina M<sub>1</sub> no leite de propriedades do Estado de São Paulo. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2010;30(1):221-5. [DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612010000500034>].
14. Oliveira CAF, Sebastião LS, Fagundes H, Rosim RE, Fernandes AM. Aflatoxins and cyclopiazonic acid in feed and milk from dairy farms in São Paulo, Brazil. *Food Addit Contam Part B Surveill*. 2008;1(2):147-52. [DOI: <https://doi.org/10.1080/02652030802382865>].
15. Oliveira CA, Rosmaninho J, Rosim R. Aflatoxin M<sub>1</sub> and cyclopiazonic acid in fluid milk traded in São Paulo, Brazil. *Food Addit Contam*. 2006;23(2):196-201. [DOI: <https://doi.org/10.1080/02652030500398379>].
16. Garrido NS, Iha MH, Ortolani MRS, Fávaro RMD. Occurrence of aflatoxins M<sub>1</sub> and M<sub>2</sub> in milk commercialized in Ribeirão Preto-SP, Brazil. *Food Addit Contam*. 2003;20(1):70-3. [DOI: <https://doi.org/10.1080/0265203021000035371>].
17. Prado G, Oliveira MS, Abrantes FM, Santos LG, Soares CR, Veloso T. Ocorrência de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite consumido na cidade de Belo Horizonte – Minas Gerais/Brasil – agosto/98 a abril/99. *Ciênc Tecnol Aliment*. 1999;19(3):420-3. [DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-20611999000300022>].
18. Sassahara M, Pontes Netto D, Yanaka EK. Aflatoxin occurrence in foodstuff supplied to dairy cattle and aflatoxin M<sub>1</sub> in raw milk in the North of Paraná state. *Food Chem Toxicol*. 2005;43(6):981-4. [DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.02.003>].
19. Souza SVC, Vargas EA, Junqueira RG. Eficiência de um kit de ELISA na detecção e quantificação de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite e investigação da ocorrência no estado de Minas Gerais. *Ciênc Tecnol Aliment*. 1999;19(3):401-5. [DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-20611999000300019>].
20. Oliveira CAF, Germano PML, Bird C, Pintot CA. Immunochemical assessment of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk powder consumed by infants in São Paulo, Brazil. *Food Addit Contam*. 1997;14(1):7-10. [DOI: <https://doi.org/10.1080/02652039709374491>].
21. Corrêa B, Galhardo M, Costa EO, Sabino M. Distribution of molds and aflatoxins in dairy cattle feeds and raw milk. *Rev Microbiol*. 1997;28(4):279-83.
22. Martins JLS, Martins IS. Aflatoxina no leite tipo “B” comercializado no município de São Paulo, SP (Brasil). *Rev Saúde Pública*. 1986;20(4):303-8. [DOI: <https://doi.org/10.1590/S0034-89101986000400006>].
23. Sabino M, Purchio A, Zorzetto MAP. Variations in the level of aflatoxin in cows milk consumed in the city of São Paulo, Brazil. *Food Addit Contam*. 1989;6(3):321-6. [DOI: <https://doi.org/10.1080/02652038909373786>].
24. Della Rosa HV. Determinação de resíduos de aflatoxinas em leite por fluorodensitometria. [dissertação de mestrado]. São Paulo (SP): Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 1979.
25. Cano-Sancho G, Marin S, Ramos AJ, Peris-Vicente J, Sanchis V. Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> and exposure assessment in Catalonia (Spain). *Rev Iberoam Micol*. 2010;27(3):130-5. [DOI: <https://doi.org/10.1016/j.riam.2010.05.003>].
26. Zheng N, Wang JQ, Han RW, Zhen YP, Xu XM, Sun P. Survey of aflatoxin M<sub>1</sub> in raw milk in the five provinces of China. *Food Addit Contam Part B Surveill*. 2013;6(2):110-5. [DOI: <https://doi.org/10.1080/19393210.2012.763191>].



27. Kos J, Lević J, Đuragić O, Kokić B, Miladinović I. Occurrence and estimation of aflatoxin M<sub>1</sub> exposure in milk in Sérbia. *Food Control*. 2014;38:41-6. [DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.09.060>].
28. Ruangwises S, Ruangwises N. Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in pasteurized milk of the School Milk Project in Thailand. *J Food Prot*. 2009;72(8):1761-3.
29. Iqbal SZ, Asi MR. Assessment of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and milk products from Punjab, Pakistan. *Food Control*. 2013;30(1):235-9. [DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.06.026>].
30. Dutton MF, Mwanza M, de Kock S, Khilosia LD. Mycotoxins in South African foods: a case study on aflatoxin M<sub>1</sub> in milk. *Mycotoxin Res*. 2012;28(1):17-23. [DOI: <https://doi.org/10.1007/s12550-011-0112-9>].
31. Londoño VAG, Boasso AC, de Paula MCZ, Garcia LP, Scussel VM, Resnik S, et al. Aflatoxin M<sub>1</sub> survey on randomly collected milk powder commercialized in Argentina and Brazil. *Food Control*. 2013;34(2):752-5. [DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.030>].
32. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA. A Indústria de laticínios no Brasil: passado, presente e futuro. [cited 2016 May 23]. Available from: [<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/24349/1/CT-102.pdf>].
33. Leblanc JC, Tard A, Volatier JL, Verger P. Estimated dietary exposure to principal food mycotoxins from the first French Total Diet Study. *Food Addit Contam*. 2005;22(7):652-72. [DOI: <https://doi.org/10.1080/02652030500159938>].
34. Duarte SC, Almeida AM, Teixeira AS, Pereira AL, Falcão AC, Pena A, et al. Aflatoxin M<sub>1</sub> in marketed milk in Portugal: Assessment of human and animal exposure. *Food Control*. 2013;30(2):411-7. [DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.08.002>].
35. Food and Agriculture Organization - FAO. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. Hazard Identification and hazard characterization. [cited 2014 Jan 09]. Available from: [<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/007/y5499e/y5499e0o.pdf>].
36. European Commission. Commission Regulation (EC) n. 1881/2006 of 19 December 2006. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L 364, p.5-24.



# Avaliação da estabilidade da capacidade antioxidante e de parâmetros físico-químicos de néctares de frutas caseiros

## Assessment of the antioxidant capacity and of the physical-chemicals parameters stability in homemade fruit nectars

RIALA6/1705

Bárbara Pereira da SILVA<sup>1\*</sup>, Karla Pereira BALBINO<sup>1</sup>, Leandro de Moraes CARDOSO<sup>2</sup>, Priscila Peixoto AQUINO<sup>1</sup>, Helena Maria PINHEIRO-SANT'ANA<sup>1</sup>, Sônia Machado Rocha RIBEIRO<sup>1</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Laboratório de Análise de Vitaminas, Departamento de Nutrição e Saúde, CCB II, Universidade Federal de Viçosa, Avenida Ph Rolfes, s/n, Viçosa, MG, Brasil, CEP: 36571-000. Tel: 31 3899 1684. E mail: barbarapereira2805@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Juiz de Fora, Governador Valadares, MG, Brasil

Recebido: 05.07.2016 - Aceito para publicação: 05.09.2016

### RESUMO

Este estudo avaliou a capacidade antioxidante e os indicadores físico-químicos de néctares caseiros de laranja, manga e maracujá, mantidos sob refrigeração ( $5 \pm 2$  °C) por 24 horas. Os néctares foram preparados em laboratório e mantidos sob refrigeração, simulando as condições domésticas. As análises foram realizadas após o preparo (T0) e durante o acondicionamento sob refrigeração (1 h, 4 h e 24 h). Os sólidos solúveis, pH e cor foram determinados respectivamente por refratometria, potenciometria e colorimetria. Carotenoides e ácido ascórbico foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência; a concentração de compostos fenólicos foi determinada utilizando-se o reagente de Folin Ciocalteu e a atividade antioxidante pelo teste do DPPH. Ácido ascórbico,  $\beta$ -caroteno e compostos fenólicos foram identificados em todos os néctares. Foram encontrados  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -criptoxantina no néctar de laranja e licopeno no néctar de manga. Durante 24 horas de refrigeração, os compostos analisados e a atividade antioxidante mantiveram-se estáveis. De forma geral, os parâmetros físico-químicos também se mantiveram estáveis durante o período avaliado. Em conclusão, sob as condições utilizadas no presente estudo, os néctares não apresentaram alteração da capacidade antioxidante, podendo ser considerados fontes de carotenoides e vitamina C, mesmo se consumidos após 24 horas de preparo.

**Palavras-chaves.** laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck), manga (*Mangifera indica* L.), maracujá (*Passiflora edulis*), compostos fenólicos, ácido ascórbico, carotenoides.

### ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate the antioxidant capacity and the physical-chemical indicators of homemade nectars of orange, mango and passion fruit, kept under refrigeration ( $5 \pm 2$  °C) for 24 hours. The nectars were prepared in laboratory and kept under refrigeration simulating the domestic conditions. The samples analyses were performed after their preparations (T0) and during the refrigerated storage (1 h, 4 h and 24 h). Soluble solids, pH and color were determined by refractometry, colorimetry and potentiometry, respectively. Carotenoids and ascorbic acid were analyzed by high performance liquid chromatography, the concentration of phenolic compounds were determined by using Folin Ciocalteu reagent, and the antioxidant activity by the DPPH test. Ascorbic acid,  $\beta$ -carotene and phenolic compounds were identified in all of the analyzed nectars samples. The  $\alpha$ -carotene and  $\beta$ -cryptoxanthin were found in orange nectar and the lycopene in mango nectar samples. During the refrigeration for 24 hours, the analyzed compounds and the antioxidant activity remained stable. In general, the physical-chemicals parameters also remained stable during the storage for 24 hours. In conclusion, under the conditions used in this study, the nectars might be considered as antioxidant sources, even if consumed after being prepared 24 hours before.

**Keywords.** orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck), mango (*Mangifera indica* L.), passion fruit (*Passiflora edulis*), phenolic compounds, ascorbic acid, carotenoids.

## INTRODUÇÃO

As frutas, na forma integral ou de suco, são nutricionalmente importantes para a alimentação humana, uma vez que são fontes de vitaminas, minerais e fibras alimentares. Estudos experimentais e epidemiológicos demonstraram que a ingestão de frutas está associada à menor incidência de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), tais como obesidade, câncer, síndrome metabólica, diabetes *mellitus* e doenças cardiovasculares<sup>1-4</sup>. Estes efeitos estão relacionados à presença de compostos antioxidantes, dentre os quais se destacam os compostos fenólicos,  $\beta$ -caroteno, vitamina C e E<sup>2,4-6</sup>.

O Brasil é um dos principais produtores de frutas tropicais, tais como laranja, manga e maracujá. Do total de frutas produzidas pelo país, 47 % são consumidas no seu estado natural e 53 % são transformados em produtos, especialmente suco<sup>7</sup>. No Brasil, os consumidores têm preferência por néctares caseiros, preparados na hora, sendo muitos consumidores avessos ao consumo de néctares industrializados<sup>8</sup>. Por razões práticas, estes néctares permanecem armazenados na geladeira algumas horas após a preparação.

Uma das grandes preocupações da população em geral refere-se à possibilidade de perda do valor nutricional e compostos bioativos dos néctares caseiros durante o armazenamento em geladeira. Sabe-se que os compostos antioxidantes presentes em néctares industrializados, armazenados por longo período de tempo, podem ser afetados por calor, luz e oxigênio<sup>9,10</sup>. No entanto, são desconhecidas as alterações na capacidade antioxidante de néctares caseiros durante refrigeração.

A fim de contribuir para o conhecimento das propriedades funcionais de néctares de frutas tropicais, o presente estudo investigou a estabilidade da capacidade antioxidante e dos parâmetros físico-químicos de néctares caseiros de laranja, manga e maracujá armazenados sob refrigeração por 24 horas, por meio da concentração de carotenoides, ácido ascórbico, compostos fenólicos e atividade antioxidante.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Matéria-Prima

Laranja “pêra” (*Citrus sinensis* L. Osbeck), maracujá “amarelo” (*Passiflora edulis*) e manga “Tommy Atkins” (*Mangifera indica* L.) foram adquiridas, em três repetições, no comércio local abastecido pelo CEASA-Minas Gerais. As repetições foram constituídas por 15 unidades de cada fruta, adquiridas em semanas distintas e consecutivas.

Os frutos foram adquiridos parcialmente maduros, com as seguintes características: laranja “pêra”: casca amarela-alaranjada; manga “Tommy Atkins”: frutos macios quando levemente pressionados com os dedos, casca amarelo- avermelhado e polpa amarelo escuro; maracujá “amarelo”: frutos com casca lisa e de coloração predominantemente amarelada. No laboratório, os frutos íntegros foram lavados em água corrente e secos em temperatura ambiente para posterior preparo.

### Preparo dos néctares caseiros

Néctares de laranja, manga e maracujá (com e sem semente) foram preparados considerando as características de cada fruta e os hábitos da população brasileira. O de laranja foi extraído em espremedor elétrico (Walita, Brasil) e preparado na proporção laranja: água filtrada de 2:1 (m/v); o de manga foi preparado homogeneizando-se a polpa de manga com água filtrada 4:6 (m/v) em liquidificador (Walita, Brasil), seguido de filtração em peneira. O néctar de maracujá com semente foi preparado homogeneizando-se a polpa de maracujá com água filtrada 2:8 (m/v) em liquidificador (Walita, Brasil), seguido de filtração em peneira. O néctar de maracujá sem semente foi preparado conforme descrito para o com semente, utilizando-se polpa previamente separada da semente.

### Armazenamento e análises de indicadores físico-químicos dos néctares caseiros

Os néctares foram acondicionados em jarras de vidro e mantidos sob refrigeração ( $4 \pm 2$  °C), por 24 horas, simulando condições domésticas de acondicionamento. Para análise, alíquotas

dos néctares foram coletadas imediatamente após o preparo (T0) e em três tempos durante o armazenamento sob refrigeração: 1, 4 e 24 horas. Devido ao grande volume de análises, as alíquotas foram acondicionadas em embalagens de polipropileno e armazenadas na ausência de luz, sob congelamento ( $-18 \pm 2$  °C) por, no máximo, 2 dias.

Os néctares foram caracterizados após o preparo (T0) e durante o armazenamento (1, 4 e 24 horas após o preparo) quanto à concentração de sólidos solúveis, utilizando-se um refratômetro digital (28 A, 65 °Brix, modelo 105-de) e o pH (modelo PH-2800) foi avaliado por meio de potenciometria direta<sup>11</sup>.

As determinações das coordenadas de cor ( $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ ) foram medidas quantitativamente usando um colorímetro (HunterLab, Miniscan XE, Reston). O valor de  $L^*$  indica luminosidade do branco ao preto,  $a^*$  indica luminosidade do vermelho ao verde e  $b^*$  indica luminosidade do amarelo ao azul.

### Estimativa de fenólicos totais e avaliação da atividade antioxidante

#### Preparo dos extratos

Um grama de amostra previamente homogeneizada foi acrescentada a 10 mL de solução de extração, composta de metanol: água 60:40 (v/v) e submetida à agitação (80 g), em temperatura ambiente por 15 minutos. Após esse procedimento, a amostra foi centrifugada a 3.500 rpm (1.000 g), por 5 minutos. As frações do sobrenadante foram diluídas para obter extratos na concentração de 0,066 g de polpa/mL. Alíquotas dos extratos foram utilizadas nos testes antioxidantes e para a estimativa de fenólicos totais<sup>12</sup>.

As amostras ficaram protegidas da luz (solar e artificial) e do oxigênio através da utilização de cortinas do tipo *blackout*, vidrarias âmbar, papel alumínio, vidrarias com tampas e ambiente com gás nitrogênio.

#### Concentração de compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos foram determinados utilizando-se o reagente de Folin-Ciocalteu<sup>13</sup>.

Alíquotas de 0,5 mL de extrato foram adicionadas a 0,5 mL de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, Alemanha) (diluído 5 vezes em água), e após homogeneização foi acrescentado 0,5 mL de carbonato de sódio (7,5 %). A mistura de reação foi homogeneizada em vórtex (3.000 rpm, 10 segundos) e incubada à temperatura ambiente (30 minutos). Em seguida, a absorvância foi lida em espectrofotômetro (Shimadzu, UV-VIS 1601), a 765 nm, contra o branco, constituído por todos os reagentes exceto o extrato.

A quantificação foi realizada por meio de curva analítica, obtida a partir da leitura da absorvância de soluções de ácido gálico (Sigma-Aldrich, Alemanha) com concentrações entre 0,005 e 0,08 g/L. O total de fenólicos foi expresso em miligrama de equivalentes de ácido gálico por mL de néctar (mg EAG/mL) e considerado como a soma do conteúdo de fenólicos dos extratos aquoso e aquoso-metanólico.

#### Avaliação da atividade antioxidante (2,2-diphenil-2-picril-hidrazil)

A atividade antioxidante foi avaliada por meio do teste de retirada do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila<sup>12</sup>. Para o preparo dos extratos os néctares foram descongelados, homogeneizados em vórtex (80 g, 10 segundos) e centrifugados (1000 g, 10 minutos). Em seguida, 100 µL do sobrenadante foi adicionado a 1,5 mL de solução metanólica de DPPH (Sigma-Aldrich, Alemanha) 0,1 mM. A mistura de reação foi homogeneizada (80 g, 10 segundos) e mantida em repouso por 30 minutos. A absorvância do extrato foi lida em espectrofotômetro (Shimadzu, UV-VIS 1601) a 517 nm. A capacidade para eliminar o radical DPPH• foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$\text{Atividade de retirada de radical (\%)} = 100 \% - \left\{ \left( \text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco da amostra}} / \text{Abs}_{\text{controle}} \right) \times 100 \right\}$$

Em que:

$\text{Abs}_{\text{controle}}$  é a absorvância do controle (solução de DPPH• sem a amostra);  $\text{Abs}_{\text{amostra}}$  é a absorvância da amostra-teste (solução de DPPH• mais a amostra-teste);  $\text{Abs}_{\text{branco}}$  é a absorvância da solução de extração apenas, sem amostra ou solução de DPPH•.

Padrões comerciais de antioxidantes (hidroxianisol butilado – BHA - Sigma-Aldrich, Alemanha) na concentração de 100 ppm e ácido gálico na concentração de 0,005 g/mL foram utilizados como controles positivos.

### Determinação de carotenoides

Os carotenoides ( $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno, licopeno e  $\beta$ -criptoxantina) dos néctares foram extraídos<sup>14</sup>. Aproximadamente 5 gramas de amostra foram homogeneizadas em 20 mL de acetona resfriada, com o auxílio de um microtritador, por 2 minutos. A suspensão obtida foi filtrada à vácuo em funil de Büchner com papel de filtro, mantendo-se o resíduo no tubo de extração. Em seguida, o procedimento de extração foi repetido adicionando-se 20 mL de acetona resfriada ao resíduo, com posterior homogeneização e filtração à vácuo.

Posteriormente, foi realizada a partição dos carotenoides da acetona para o éter de petróleo. O filtrado foi transferido, em três frações, para um funil de separação contendo 50 mL de éter de petróleo resfriado. Após a transferência de cada fração, foi adicionado 100 mL de água destilada para a separação de fases (carotenoides-éter de petróleo e acetona-água), sendo a fase inferior (acetona-água) descartada. Foi acrescentado sulfato de sódio anidro ao extrato etéreo para remover o resíduo de água. Em seguida, o extrato foi concentrado em evaporador rotativo a  $35 \pm 2$  °C (2 minutos), transferido para balão volumétrico e redissolvido para 25 mL com éter de petróleo. Para a análise, alíquotas de 2,0 mL do extrato foram evaporadas sob fluxo de gás nitrogênio e o resíduo seco foi retomado em 2,0 mL de acetona grau HPLC. Em seguida o extrato foi filtrado (0,45  $\mu$ m, Millipore, Brasil) e injetado (40  $\mu$ L)<sup>15</sup>.

As análises de carotenoides foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência, com detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD) e detecção a 450 nm; coluna cromatográfica Phenomenex Gemini (250 x 4 mm i.d., 5  $\mu$ m) munida de coluna de guarda Phenomenex ODS (C18), (4mm x 3mm); fase móvel composta por metanol: acetato de etila: acetonitrila (80:10:10); eluição isocrática; fluxo da fase móvel

de 2,0 mL/min, tempo de corrida de 12 min.

A identificação dos carotenoides foi realizada pela comparação dos tempos de retenção de padrões autênticos e amostras em relação aos espectros de absorção dos padrões e picos de interesse nas amostras, analisados sob as mesmas condições. A quantificação foi realizada por padronização externa, utilizando curvas analíticas construídas a partir da injeção, em duplicata, de seis diferentes concentrações de soluções padrão.

O valor da vitamina A foi calculado, sendo que 1 Equivalente de Atividade de Retinol (RAE) correspondeu a 1  $\mu$ g de retinol, 12  $\mu$ g de  $\beta$ -caroteno e 24  $\mu$ g de outros carotenoides pró-vitâmicos<sup>16</sup>.

### Determinação de ácido ascórbico

Aproximadamente 5 gramas de amostra e 15 mL da solução extratora (ácido metafosfórico 3 %, ácido acético 8 %, ácido sulfúrico 0,3 N e EDTA 1 mM) foram homogeneizados (microtritador) por 5 minutos, centrifugadas a 1789 g (30 minutos), sendo o sobrenadante transferido para um balão volumétrico e o volume completado para 25 mL com água ultrapura<sup>17</sup>.

Para análise do AA as condições cromatográficas utilizadas foram: coluna cromatográfica RP-18 Lichrospher 100, 250 x 4 mm, 5  $\mu$ m, sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O fluxo da fase móvel (1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA, pH 3,00) foi de 1,0 mL/min e o tempo de corrida de 7 min. A eluição foi detectada utilizando detector de arranjo de diodos (Shimadzu SOD-M10 AVP), com comprimento de onda ajustado para 245 nm. A identificação do AA foi feita comparando-se os tempos de retenção obtidos para o padrão e para as amostras, analisados sob as mesmas condições. Além disso, foram comparados os espectros de absorção do padrão e dos picos de interesse nas amostras.

### Delineamento experimental e análise estatística dos dados

Para avaliar a estabilidade dos componentes analisados ao longo do armazenamento foi empregado o delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos (0; 1; 4 e

24 horas após o preparo), em três repetições.

A normalidade dos dados foi avaliada utilizando o teste de *Shapiro-Wilk*. Para comparar as características dos néctares no tempo 0, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Duncan. A diferença entre as médias dos parâmetros nos tempos 0 e 24 horas foi avaliada utilizando o teste *t pareado*. A dispersão dos dados durante o armazenamento foi avaliada por análise de regressão. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa *SigmaPLOT* 11.0, adotando-se um nível de significância ( $\alpha$ ) de 5 %.

## RESULTADOS

Os resultados do presente estudo são de grande importância uma vez que demonstram informações sobre a estabilidade de néctares caseiros de laranja, maracujá e manga, relativas à de antioxidantes e compostos bioativos, durante o armazenamento por até 24 horas, em temperatura

de refrigeração. Esse tempo foi utilizado a fim de imitar as reais condições de armazenamento pela população, que muitas vezes, devido à praticidade do dia a dia, não possuem disponibilidade para preparar os néctares de frutas próximo ao horário de ingestão.

As características físico-químicas e a ocorrência e concentração de carotenoides, vitaminas, compostos fenólicos e da capacidade antioxidante dos néctares de laranja, maracujá e manga diferiam entre si. No entanto, os néctares de maracujá com ou sem sementes apresentam características semelhantes ( $p > 0,05$ ) em relação à concentração de carotenoides, vitamina C e compostos fenólicos totais (**Tabela**).

Os néctares apresentaram luminosidade intermediária (44,82 a 51,72), com prevalência do amarelo ( $b^+$ : 21,95 a 32,36) em detrimento ao vermelho ( $a^+$ : 1,63 a 7,06), e sólidos solúveis variando entre 0,5 e 6,7 °Brix. Após o preparo, os néctares caseiros de frutas apresentaram pH muito ácido (inferior a 4) ou ácido (entre 4 e 4,5) (**Tabela**).

**Tabela.** Características físico-químicas, ocorrência, concentração de antioxidantes e capacidade antioxidante dos néctares caseiros de frutas imediatamente após o preparo

	Laranja	Manga	Maracujá sem semente	Maracujá com semente
<b>Parâmetros Físico-Químicos</b>				
Sólidos solúveis (°Brix)	6,97 <sup>a</sup> ± 0,15	2,10 <sup>b</sup> ± 0,26	0,90 <sup>c</sup> ± 0,17	0,50 <sup>d</sup> ± 0,10
pH	3,45 <sup>b</sup> ± 0,05	4,53 <sup>a</sup> ± 0,25	2,8 <sup>c</sup> ± 0,12	2,77 <sup>c</sup> ± 0,12
<b>Colorimetria</b>				
L*	44,82 <sup>b</sup> ± 0,54	44,97 <sup>b</sup> ± 0,88	51,47 <sup>a</sup> ± 2,0	51,72 <sup>a</sup> ± 4,06
a*	1,63 <sup>d</sup> ± 0,30	2,94 <sup>c</sup> ± 0,47	7,06 <sup>a</sup> ± 2,68	4,31 <sup>b</sup> ± 1,27
b*	21,95 <sup>b</sup> ± 1,25	24,01 <sup>b</sup> ± 1,20	31,80 <sup>a</sup> ± 2,80	32,36 <sup>a</sup> ± 2,31
<b>Compostos antioxidantes (em 100 mL)</b>				
Vitamina C (mg)	42,90 <sup>a</sup> ± 7,60	2,41 <sup>b</sup> ± 0,08	1,54 <sup>c</sup> ± 0,12	1,54 <sup>c</sup> ± 0,29
β-caroteno (μg)	10,21 <sup>c</sup> ± 0,63	144,77 <sup>a</sup> ± 57,08	76,06 <sup>b</sup> ± 2,48	68,79 <sup>b</sup> ± 2,52
α-caroteno (μg)	310,05 ± 166,9	nd	nd	nd
β-criptoxantina (μg)	2787,05 ± 607,05	nd	nd	nd
Licopeno (μg)	nd	6,40 ± 4,20	nd	nd
Carotenoides totais (μg)	3107,31 <sup>a</sup> ± 789,76	151,17 <sup>b</sup> ± 54,87	186,68 <sup>b</sup> ± 19,45	187,10 <sup>b</sup> ± 13,88
Valor de Vitamina A (EAR)	129,89 <sup>a</sup> ± 8,40	12,06 <sup>b</sup> ± 3,89	6,34 <sup>c</sup> ± 1,57	5,23 <sup>c</sup> ± 1,89
Fenólicos totais (mg EAG)	1,29 <sup>a</sup> ± 0,09	0,84 <sup>c</sup> ± 0,03	1,08 <sup>b</sup> ± 0,07	1,04 <sup>b</sup> ± 0,09
<b>Capacidade Antioxidante</b>				
Atividade antirradical (%)	89,95 <sup>a</sup> ± 0,18	26,74 <sup>b</sup> ± 0,46	15,59 <sup>c</sup> ± 0,79	12,21 <sup>d</sup> ± 0,56

Médias seguidas por uma mesma letra minúscula nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade, EAR: equivalente de atividade de retinol; EAG: equivalente de ácido gálico; nd: não detectado.

Com uma ampla variação na concentração, o ácido ascórbico (1,54 a 42,90 mg/100 mL) e o  $\beta$ -caroteno (10,21 a 144,77  $\mu$ g/100g) foram identificados em todos os néctares. Por outro lado,  $\alpha$ -caroteno (310,05  $\mu$ g) e a  $\beta$ -criptoxantina (2787,05  $\mu$ g) foram encontrados somente nos néctares de laranja e o licopeno, apenas no néctar de manga (**Tabela**).

A concentração de compostos fenólicos variou de 0,84 a 1,29 mg EAG/100 mL (**Tabela**). Os néctares de maracujá com e sem semente não diferiram quanto ao conteúdo de compostos fenólicos ( $p > 0,05$ ). A atividade antirradical dos néctares variou entre 12,21 e 89,95 % e não correlacionou com nenhum dos compostos analisados ( $p > 0,05$ ) (**Tabela**). Em relação à concentração de vitamina A e C nos néctares, o de laranja foi o que apresentou maior conteúdo e o de maracujá menor.

De forma geral, as características físico-químicas e o perfil antioxidante dos néctares caseiros não sofreram alterações deletérias durante 24 horas de refrigeração. Pelo fato de que, para a maioria das alterações verificadas não foi possível ajustar modelos de regressão linear ou quadrática significativos, os resultados foram apresentados em percentual de variação em relação ao tempo 0 (**Figuras 1 e 2**).

Entre as características físico-químicas, apenas o pH dos néctares manteve-se estável ao longo das 24 horas de armazenamento sob refrigeração ( $p < 0,05$ ) (**Figura 1A**). Os sólidos solúveis aumentaram significativamente em todos os néctares (**Figura 1B**). A coordenada de cor  $L^*$  aumentou no néctar de laranja e reduziu nos néctares de maracujá (com e sem semente),  $a^*$  aumentou em ambos os néctares de maracujá e  $b^*$  reduziu no de maracujá sem semente (**Figuras 1C, 1D e 1E**, respectivamente).

Os compostos antioxidantes dos néctares apresentaram excelente estabilidade, sendo observada a manutenção ou aumento significativo da maioria dos parâmetros. A concentração de ácido ascórbico não alterou durante o armazenamento dos néctares de maracujá ( $p > 0,05$ ) e aumentou no néctar de manga ( $\Delta T0$ -24h: +2 %) ( $p < 0,05$ ). Apenas o néctar de laranja apresentou

alteração indesejável no conteúdo de vitamina C, com aumento na primeira hora (+2 %), seguida de redução de 4 % após 24 horas de armazenamento ( $p < 0,05$ ) (**Figura 2A**).

O néctar de maracujá sem semente não apresentou alteração significativa na concentração de  $\beta$ -caroteno. Para os demais néctares, este carotenoide aumentou entre 6 e 10 % após 24 horas de armazenamento ( $p < 0,05$ ) (**Figura 2B**). A concentração de  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -criptoxantina no néctar de laranja e licopeno no de manga aumentaram em até 5 % durante o armazenamento ( $p < 0,05$ ) (gráficos não apresentados). Após 24 horas de armazenamento, os néctares apresentaram concentração de carotenoides totais e vitamina superior ao tempo inicial (pós preparo) (**Figuras 2C e 2D**, respectivamente).

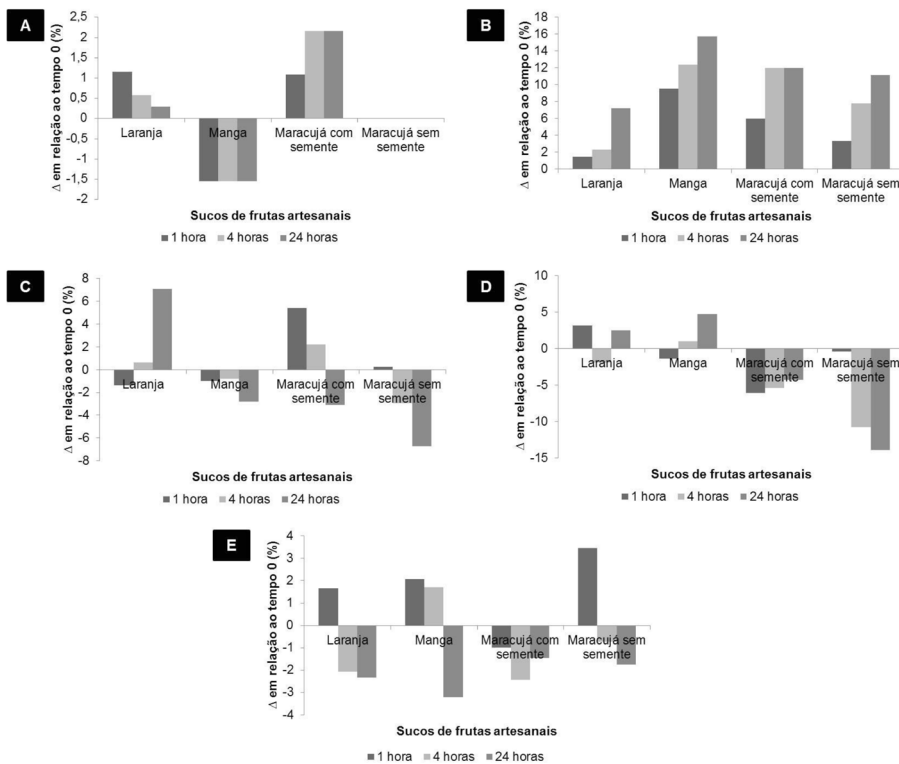
A concentração de compostos fenólicos totais não alterou durante o armazenamento (**Figura 2E**). Em consequência à excelente estabilidade dos compostos bioativos, a atividade antioxidante dos néctares manteve-se constante ( $p > 0,05$ ) (**Figura 2F**).

## DISCUSSÃO

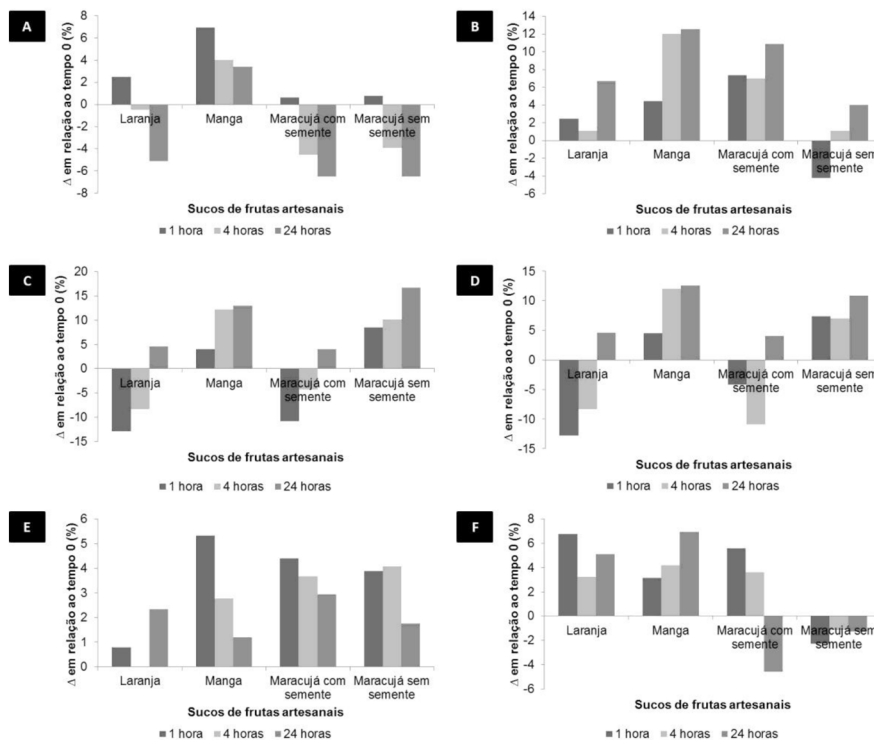
O pH inferior a 4, observado nos néctares de frutas caseiros, constitui um importante fator para o controle microbiológico, uma vez que esses não são submetidos à pasteurização. Isso contribui para a redução do crescimento de bactérias, fungos e leveduras e, conseqüentemente, para a manutenção da qualidade microbiológica da preparação<sup>18</sup>.

O perfil de antioxidantes de néctares de frutas caseiros ainda é pouco conhecido e amplamente influenciado pela variedade da fruta. Estudos sobre a estabilidade do perfil antioxidante de néctares caseiros são escassos na literatura. Diante deste contexto, a comparação dos resultados obtidos no presente estudo com os disponíveis da literatura, incluído para néctares industrializados, não é pertinente.

A presença de ácido ascórbico,  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -criptoxantina em néctares de manga, laranja e maracujá é corroborada por outros estudos<sup>19-22</sup>.



**Figura 1.** Alterações no pH (a), sólidos solúveis (b), valor de L\* (c), valor de a\* (d) e valor de b\* (e) de néctares caseiros de frutas armazenados sob refrigeração ( $5 \pm 2$  °C), por 24 horas



**Figura 2.** Alterações no conteúdo de vitamina C (a), β-caroteno (b), carotenoides totais (c), valor de vitamina A (d), compostos fenólicos totais (e) e atividade antioxidante (f) de néctares caseiros de frutas armazenados sob refrigeração ( $5 \pm 2$  °C), por 24 horas



Embora as sementes, em geral, sejam ricas em compostos fenólicos<sup>23</sup>, o néctar de maracujá com semente não apresentou maior concentração de fenólicos em relação ao sem semente. A ausência de diferença na concentração de fenólicos entre ambos os néctares de maracujá sugere que as condições de preparo dos néctares, tais como pH e o meio aquoso, não sejam ideais para a extração dos compostos fenólicos das sementes do maracujá.

Apesar do conteúdo de compostos fenólicos das amostras não ter sido elevado, a contribuição destes para a capacidade antioxidante total de néctares não pode ser desconsiderada, uma vez que se define como um antioxidante biológico “aquela substância que, quando presente em baixas concentrações em relação à concentração de oxidantes, reduz significativamente ou impede a oxidação do substrato oxidável”<sup>24</sup>.

A atividade antirradical dos néctares não correlacionou com os compostos antioxidantes analisados, sugerindo que esses contêm vários outros constituintes que podem agir sinergicamente e aumentar o potencial antioxidante<sup>25</sup>.

Considerando os critérios propostos por Philippi<sup>26</sup>, os néctares podem ser classificados como fontes das vitaminas A e C se suprem de 5 a 10 % da *Recommended Dietary Allowance* (RDA) destes nutrientes, como boas fontes se suprem de 10 a 20 % da RDA e como excelentes fontes se suprem mais de 20 % da RDA<sup>26</sup>. Dessa forma, uma porção de néctar de laranja (200 mL) foi considerada excelente fonte de vitamina C para crianças (4 e 8 anos) e adultos (19 e 30 anos)<sup>16</sup>.

Os demais néctares foram categorizados como boa fonte de vitamina C para crianças. Além disso, o néctar de laranja foi considerado excelente fonte de vitamina A para crianças (4 e 8 anos) e adultos (19 e 30 anos) e os néctares de manga e maracujá com semente foram classificados como fonte desta vitamina.

O ácido ascórbico é um importante indicador de qualidade para definir a meia vida de néctares de frutas<sup>27</sup>. Apesar da elevada susceptibilidade à degradação, a estabilidade do ácido ascórbico aumenta com a diminuição da temperatura<sup>28</sup>. Dessa forma, o controle da

temperatura mostrou-se eficaz para estender o tempo de armazenamento e manter a qualidade nutricional de néctares caseiros.

As alterações no conteúdo dos isômeros de carotenoides contribuíram para que os néctares apresentassem maior concentração de carotenoides totais e vitamina A, após 24 horas de armazenamento. Informações sobre as alterações no conteúdo de carotenoides em néctares mantidos sob refrigeração por um curto período (24 horas), bem como os mecanismos responsáveis por estas alterações são escassos na literatura.

Os resultados sugerem que, na condição de armazenamento utilizada no presente estudo, existe uma fase de balanço neutro/positivo, onde a taxa de conversão de carotenoides não analisados (ex: luteína, zeaxantina, formas *cis*-carotenoides, entre outros) aos *trans* carotenoides analisados (*all-trans*- $\alpha$ -caroteno, *all-trans*- $\beta$ -caroteno, *all-trans*- $\beta$ -licopeno e *all-trans*- $\beta$ -criptoxantina) foi similar e/ou maior que as reações de degradação (oxidação e formação de compostos voláteis de baixo peso molecular)<sup>29,30</sup>.

Resultados semelhantes ao do presente estudo foram verificados em polpas de frutas mantidas sob refrigeração (4 °C, por 30 dias)<sup>31</sup>, onde os autores observaram estabilidade de compostos fenólicos de néctares caseiros.

## CONCLUSÃO

Os néctares caseiros de laranja, manga e maracujá apresentaram ácido ascórbico,  $\beta$ -caroteno e compostos fenólicos. Além disso, outros carotenoides foram encontrados em néctares de laranja ( $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -criptoxantina) e de manga (licopeno).

Sob as condições de preparo e armazenamento sob refrigeração por 24 horas, nota-se estabilidade da capacidade antioxidante dos néctares de frutas tropicais. Portanto, estes néctares podem ser considerados fonte de antioxidantes. Assim, o consumo de néctares caseiros deve ser incentivado sem a necessidade de se recomendar a ingestão imediatamente após o preparo, o que poderia constituir um

obstáculo para o consumidor por alterar a dinâmica da vida moderna.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPEMIG pelo apoio financeiro e bolsa de iniciação científica e ao CNPq pelas Bolsas de Iniciação Científica.

## REFERÊNCIAS

1. Dauchet L, Amouyel P, Dallongeville J. Fruits, vegetables and coronary heart disease. *Nat Rev Cardiol*. 2009;6(9):599-608. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1038/nrcardio.2009.131>].
2. Stowe CB. The effects of pomegranate juice consumption on blood pressure and cardiovascular health. *Complement Ther Clin Pract*. 2011;17(2):113-5. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.ctcp.2010.09.004>].
3. Mattei J, Malik V, Hu FB, Campos H. Substituting homemade fruit juice for sugar-sweetened beverages is associated with lower odds of metabolic syndrome among hispanic adults. *J Nutr*. 2012;142(6):1081-7. [DOI: <https://dx.doi.org/10.3945/jn.111.149344>].
4. Coelho RCLA, Hermsdorff HHM, Bressan J. Anti-inflammatory properties of orange juice: possible favorable molecular and metabolic effects. *Plant Foods Hum Nutr*. 2013;68(1):1-10. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1007/s11130-013-0343-3>].
5. Zibadi S, Farid R, Moriguchi S, Lu Y, Foo LY, Tehrani PM, et al. Oral administration of purple passion fruit peel extract attenuates blood pressure in female spontaneously hypertensive rats and humans. *Nutr Res*. 2007;27(7):408-16. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.nutres.2007.05.004>].
6. Joshipura KJ, Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, Rimm EB, Speizer FE, et al. The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease. *Ann Intern Med*. 2001;134(12):1106-14.
7. Poll H, Kist BB, Santos CE, Reetz ER, Carvalho C, Silveira DN. *Anuário Brasileiro da Fruticultura*. Santa Cruz do Sul (RS): Editora Gazeta; 2013.
8. Rosa SES, Cosenza JP, de Souza Leão LT. Panorama do setor de bebidas no Brasil. *BNDDES Setorial*. 2006;23:101-50.
9. Verbeyst L, Hendrickx M, Loey A. Characterisation and screening of the process stability of bioactive compounds in red fruit paste and red fruit juice. *Eur Food Res Technol*. 2012;234(4):593-605. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1007/s00217-012-1667-1>].
10. Igual M, García-Martínez E, Camacho MM, Martínez-Navarrete N. Effect of thermal treatment and storage on the stability of organic acids and the functional value of grapefruit juice. *Food Chem*. 2010;118(2):291-9. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.118>].
11. 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; 2005.
12. Bloor SJ. Overview of methods for analysis and identification of flavonoids. In: Lester P, editor. *Methods in Enzymology (Volume 335)*. Cambridge: Academic Press; 2001. p. 3-14.
13. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In: Lester P, editor. *Methods in Enzymology (Volume 299)*. Cambridge: Academic Press; 1999. p. 152-78.
14. Rodriguez-Amaya DB, Raymundo LC, Lee T-C, Simpson KL, Chichester CO. Carotenoid changes in ripening *Momordica charantia*. *Annals of Botany*. 1976;40:615-24.
15. Pinheiro-Sant'Ana HM, Stringheta PC, Brandão SCC, Azeredo RMC. Carotenoid retention and vitamin A value in carrot (*Daucus carota* L.) prepared by food service. *Food Chem*. 1998;61(1-2):145-51. [DOI: [https://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(97\)00084-8](https://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(97)00084-8)].
16. Institute of Medicine (Washington, DC - United States). Dietary Reference Intakes (DRIs): vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc. Washington, DC: National Academy Press; 2001. [DOI: [10.17226/10026](https://doi.org/10.17226/10026)].

17. Campos FM, Ribeiro SMR, Della Lucia CM, Pinheiro-Sant'Ana HM, Stringheta PC. Optimization of methodology to analyze ascorbic and dehydroascorbic acid in vegetables. *Quím Nova*. 2009;32(1):87-91. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000100017>].
18. Ramos AM, Benevides SD, Perez R. Manual de boas práticas de fabricação (BPF) para indústrias processadoras de polpa de frutas. Visconde do Rio Branco (MG): Suprema Gráfica e Editora; 2010.
19. Devi Ramaiya S, Bujang JS, Zakaria MH, King WS, Shaffiq Sahrir MA. Sugars, ascorbic acid, total phenolic content and total antioxidant activity in passion fruit (*Passiflora*) cultivars. *J Sci Food Agric*. 2013;93(5):1198-205. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1002/jsfa.5876>].
20. Velázquez-Estrada RM, Hernández-Herrero MM, Rüfer CE, Guamis-López B, Roig-Sagués AX. Influence of ultra high pressure homogenization processing on bioactive compounds and antioxidant activity of orange juice. *IFSET*. 2013;18:89-94. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2013.02.005>].
21. Sogi DS, Siddiq M, Roidoung S, Dolan KD. Total phenolics, carotenoids, ascorbic acid, and antioxidant properties of fresh-cut mango (*Mangifera indica* L., cv. Tommy Atkin) as affected by infrared heat treatment. *J Food Sci*. 2012;77(11):C1197-202. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02933.x>].
22. Rodriguez-Amaya DB, Kimura M, Amaya-Farfan J. Tabela Brasileira de Composição de Carotenóides em Alimentos. Brasília (DF): Ministério do Meio Ambiente; 2008.
23. Soong Y-Y, Barlow PJ. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chem*. 2004;88(3):411-7. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.02.003>].
24. Halliwell B, Gutteridge JM, Guohua C, Cutler R. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med*. 1995;18(1):125-6.
25. Wang S, Meckling KA, Marcone MF, Kakuda Y, Tsao R. Synergistic, additive, and antagonistic effects of food mixtures on total antioxidant capacities. *J Agric Food Chem*. 2011;59(3):960-8. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1021/jf1040977>].
26. Philippi ST. Pirâmide dos alimentos: fundamentos básicos da nutrição. Barueri (SP): Editora Manole; 2008.
27. Zanoni B, Pagliarini E, Galli A, Laureati M. Shelf-life prediction of fresh blood orange juice. *J Food Eng*. 2005;70(4):512-7. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.10.019>].
28. Martí N, Mena P, Cánovas JA, Micol V, Saura D. Vitamin C and the role of citrus juices as functional food. *Nat Prod Commun*. 2009;4(5):677-700.
29. Zepka LQ, Borsarelli CD, da Silva MAAP, Mercadante AZ. Thermal degradation kinetics of carotenoids in a cashew apple juice model and its impact on the system color. *J Agric Food Chem*. 2009;57(17):7841-5. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1021/jf900558a>].
30. Pénicaud C, Achir N, Dhuique-Mayer C, Dornier M, Bohuon P. Degradation of  $\beta$ -carotene during fruit and vegetable processing or storage: reaction mechanisms and kinetic aspects: a review. *Fruits*. 2011;66(6):417-40. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1051/fruits/2011058>].
31. Piljac-Žegarac J, Šamec D. Antioxidant stability of small fruits in postharvest storage at room and refrigerator temperatures. *Food Res Int*. 2011;44(1):345-50. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2010.09.039>].



# Validation of PCR method for mycoplasma detection in the Yellow Fever-vaccine quality control

## Validação de método de PCR para detecção de micoplasmas no controle de qualidade da vacina de Febre Amarela

RIALA6/1706

Rafael LAWSON-FERREIRA<sup>1\*</sup>, João Pedro Sousa SANTOS<sup>2</sup>, Danilo PARMERA<sup>3</sup>, Rosane Cuber GUIMARÃES<sup>3</sup>, Joyce Brito de Carvalho COELHO<sup>3</sup>, Simone Cascardo FROTA<sup>3</sup>, Josiane Machado Vieira MATTOSO<sup>3</sup>, Carina Cantelli Pacheco DE OLIVEIRA<sup>3</sup>, Darcy Akemi HOKAMA<sup>3</sup>, Ivano DE FILIPPIS<sup>1</sup>, Elmiro Rosendo do NASCIMENTO<sup>4</sup>, Elena Cristina CARIDE<sup>3</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Instituto Nacional de Controle de Qualidade, Fiocruz. Avenida Brasil, 4365. Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Tel: 21 3865 5246. E-mail: lawson@fiocruz.br

<sup>2</sup>Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>3</sup>Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos - Bio-Manguinhos, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>4</sup>Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil

Recebido: 17.03.2016 - Aceito para publicação: 06.09.2016

### ABSTRACT

Among the vaccines produced by Bio-Manguinhos, a major centre for manufacturing the immunobiological products in Latin America, stands out the yellow fever (YF) vaccine. To guarantee the excellence and safety of the YF vaccine, the quality control tests has to be performed throughout its production. The World Health Organization (WHO) demands the producers to guarantee the absence of *Mycoplasma orale*, *M. pneumoniae*, *M. gallisepticum* and *M. synoviae* in the biological products. Mycoplasma is a fastidious microorganism, requiring about 35 days for attaining the conclusive culturing test. In this study PCR methods were selected for amplifying 16S rRNA gene fragments for detecting mycoplasma in the intermediate products of YF vaccine. This standardized methodology was specific and sensitive to detect the low concentrations of mycoplasma in spiked intermediary vaccine products; and the absence of unspecific amplification was also demonstrated. The detection rates ranged from 3.1 to 12.5 colony forming units and showed 100 % of sensitivity and specificity in the tested samples. The PCR protocol for detecting mycoplasma DNA in YF vaccine was validated by analysing 286 samples. Bio-Manguinhos produces annually 10,000,000 YF vaccine doses, and this method has been successfully employed, complementing the traditional approach in the mycoplasma detection since 2008.

**Keywords.** mycoplasma, PCR, vaccine, yellow fever.

### RESUMO

Dentre as vacinas produzidas por Bio-Manguinhos, um importante centro de produção de imunobiológicos da América Latina, destaca-se a vacina de febre amarela (FA) que é produzida em ovos embrionados. Para garantir a excelência e a segurança da vacina, testes de controle de qualidade são realizados durante a produção. A Organização Mundial de Saúde (OMS) exige dos produtores a ausência de *Mycoplasma orale*, *M. pneumoniae*, *M. gallisepticum* e *M. synoviae* em produtos biológicos. Micoplasmas são micro-organismos fastidiosos, sendo necessários 35 dias para que os testes de cultura sejam conclusivos. Neste estudo foram selecionados métodos de amplificação de fragmentos do gene 16S rRNA para detecção de micoplasmas em produtos intermediários da vacina de FA. Esta metodologia padronizada foi capaz de detectar baixas concentrações de micoplasmas nos produtos intermediários e a ausência de amplificação inespecífica foi demonstrada. O limite de detecção variou entre 3,1 e 12,5 unidades formadoras de colônia; e nas amostras testadas a sensibilidade e a especificidade foram de 100 %. O protocolo de PCR para detecção de micoplasmas na vacina foi validado pela análise de 286 amostras. Bio-Manguinhos produz 10.000.000 doses de vacina de febre amarela por ano e, desde 2008, este método tem sido empregado com sucesso, complementando-se a abordagem tradicional.

**Palavras-chaves.** micoplasmas, PCR, vacina, febre amarela.

## INTRODUCTION

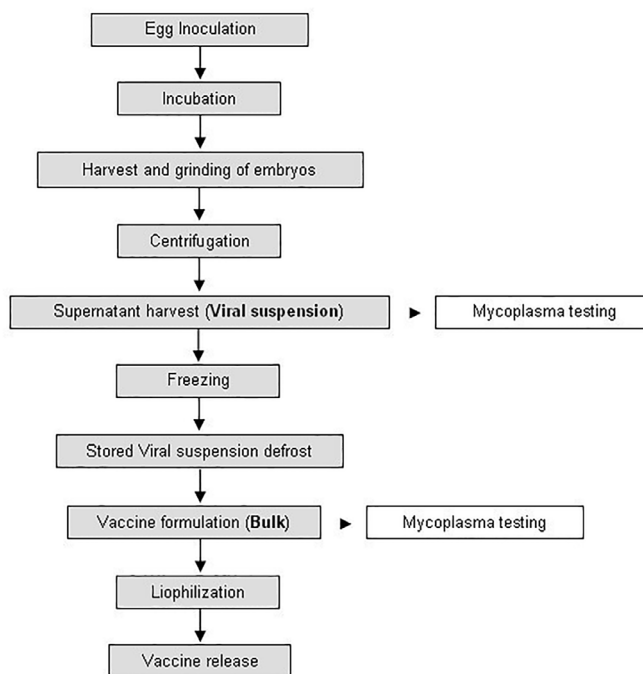
Yellow fever (YF) is an acute, viral, mosquito-borne haemorrhagic fever that affects the immunologically susceptible individuals. YF virus is endemic in the tropical and subtropical regions in Africa and South-America where 200,000 cases with 30,000 deaths are estimated annually<sup>1</sup>. A live attenuated YF vaccine is already attainable, and it is one of the most effective available vaccines which have been administered to more than 400 million people worldwide with minimal incidence of severe side effects<sup>2</sup>. Max Theiler and his associates at Rockefeller University created the YF virus vaccine 17D, after performing several tissue sub-culturing passages of the Asibi strain, isolated from a Ghanaian patient in 1927. In Brazil the first vaccines were tested in 1937, and its production was later standardised with 17DD sub-strain<sup>3</sup>.

Since it was pre-qualification by World Health Organization (WHO) in 2001, more than 155 million of YF vaccine doses were produced by Bio-Manguinhos/Fiocruz, and they have been exported to more than seventy countries, through the Pan-American Health Organization (PAHO) and United Nations Children Fund (UNICEF). This vaccine has been produced in the specific pathogen-free (SPF) chicken embryos according to the guidelines established by WHO<sup>4</sup>. Following three days of inoculation and incubation under controlled temperature and moisture, the viable embryos are harvested, grinded and centrifuged. The resulting viral suspension is frozen with samples harvested for quality control testing. Following the quality control approval, the viral suspension is thawed, and diluted by adding the stabilizers, originating the bulk product. The formulated bulk is lyophilised in vials containing 5, 10 or 50 doses (**Figure 1**). Before the vaccine release, several quality control tests should be performed according to the WHO guidelines. The mycoplasma controlling devices in the YF vaccine intermediates, e.g. viral suspension and bulk, are mandatory<sup>5</sup>.

Mycoplasmas are the smallest self-replicating bacteria, without a cell wall and require the sterols

and fatty acids for providing the cytoplasm membrane stability, being taxonomically separated from other bacteria, and belonging to the Mollicutes class (mollis = soft; cutis = skin in Latin). Additionally, they present reduced genomes and biosynthetic capabilities. Infections in animals and humans are rarely fulminant - mycoplasmas usually live in harmony with their host. Mycoplasma researches and laboratory diagnosis performances have been hampered because of its fastidious cultivation features<sup>6</sup>. However, they might also accidentally infect the cell cultures. This contamination invalidate the results achieved from cell culture, and it is harmful for the diversity of biological products<sup>7,8</sup>.

The mycoplasmal culturing takes about 35 days to provide the final result, and this work is particularly laborious and expensive. However, this procedure is a “Gold-Standard” methodology stated by WHO for performing mycoplasma testing in biological products, including YF vaccine and intermediates. Even though, the culture media formulations for mycoplasma detection are not described in the WHO requirements.



**Figure 1.** Flowchart of YF vaccine produced in Bio-Manguinhos. The words in bold and inside the parenthesis highlight the vaccine intermediate samples used in this study

PCR-based and other alternative methods for mycoplasma detection have been considered for being applied to the biological products manufacture, and these techniques can also be used as long as they have been validated<sup>5</sup>.

Method validation assures that a new analytical assay shows the true results confirming the procedure as “adequate to use”. For validating an alternative qualitative molecular methodology, such as PCR, it is critical to determine the essential parameters of the assay<sup>10</sup>. Thus, the objective of this study was to standardize and to validate a rapid and accurate diagnostic PCR assay for detecting mycoplasma contamination in YF vaccine, by analyzing the vaccine intermediates, according to the WHO requirements.

## MATERIAL AND METHODS

### Bacterial Strains, Media and Growth Conditions

The following mycoplasma strains (all acquired from the American Type Culture Collection, ATCC) were used throughout this study: *M. gallisepticum* (ATCC 15302), *M. orale* (ATCC23714), *M. synoviae* (ATCC25204) and *M. pneumoniae* (ATCC 15492).

The medium used for mycoplasma growth was a variation of Modified Frey's Medium<sup>11</sup>. This medium, called as PPLO medium, is composed of 22.5 g/L mycoplasma base broth (Becton Dickinson, Phoenix, AZ, USA), 12 g/L glucose (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA; 0.025 g/L phenol red (Sigma Chemical Company) and 20 % (v/v) supplement. This supplement is consisted of 62.5 g/L yeast extract (Becton Dickinson), 1.25 g/L thallium acetate (Sigma Chemical Company), 5x10<sup>6</sup> U/L penicillin (Sigma Chemical Company), 0.625 g/L NAD (Sigma Chemical Company), 0.625 g/L cysteine-HCl (Sigma Chemical Company), 30 % (v/v) horse serum (Hyclone, Logan, UT, USA) and 30 % (v/v) swine serum (Hyclone). For solid medium, 12 g/L noble agar (Beckton Dickinson) were added. Before use, the horse and swine sera were inactivated at 56 °C for 30 minutes, and NAD and cysteine-HCl were mixed and

incubated during 15 minutes at room temperature. The final pH was adjusted to 7.8.

The growth of mycoplasma strains was set up from the freeze-dried sample vials. Initially the growth was confirmed by the change of liquid media colour and production of the “fried egg”-shaped colonies observed under a stereomicroscope on solid media. From broth cultures, the strains were ten-fold diluted into 9 mL of broth medium from 10<sup>-1</sup> to 10<sup>-5</sup> and incubated at 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub>. *Mycoplasma orale* was grown in anaerobic conditions. As the mycoplasma growth does not cause turbidity, therefore it was detected by acidifying the broth medium, observing the color change from red to yellow (except for *M. orale*, in which the arginine is hydrolysed and the broth is alkalized).

Non-Mollicutes class microorganisms were also obtained from the ATCC by the selectivity tests, e.g., *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Clostridium sporogenes* (ATCC 11437), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). These microorganisms were grown in the broth and solid soy casein medium (Becton Dickinson, Phoenix, AZ, USA) at 37 °C, except *C. Albicans* grown at 25 °C. All of these strains were cultivated in aerobiosis, excepted *C. sporogenes* (anaerobiosis).

### Production and titration of mycoplasma seed lots

Forty milliliters of each fresh mycoplasma culture, i.e. before colour changing or after 96 hours-incubation, the suspensions were mixed with 40 mL of sterile medium and 20 mL of sterile glycerol PA (Merck, Darmstadt, Germany). One mL aliquots were stored in vials at -20 °C, generating the seed lot. Before and after storage, three of these 1 mL-vials were ten-fold diluted in liquid medium up to 10<sup>-9</sup>, and 200 µL of each dilution were plated on the solid medium. The plates were incubated for seven days, and then they were observed in a stereomicroscope at 40 X magnification. After incubating for one week, the colonies were counted. Quantification of seed lots took into account only the plates

containing 50 to 300 colonies, and it was prepared from each reference strain upon its fifth passage. The determination was done by calculating the average among the replicates.

Seed lots of non-Mollicutes class microorganisms were also prepared and quantified in their specific medium as mycoplasma seed lots.

### Sampling

The vaccine intermediates (viral suspension and bulk) were analyzed without (plain) and with the adding of microorganisms (spiked) at known concentrations by seed lots dilution.

### DNA extraction

DNA extraction was carried out using the commercial Wizard SV Genomic DNA Purification System (Promega, Madison, USA) with 1 mL of each sample. The manufacturer protocol for DNA extraction from mouse tail tissue was followed, with slight modifications. The incubation at 55 °C for 16-18 hours was shortened to three hours. The suspension washings were done with 500 µL instead of 650 µL of washing buffer, and the DNA elution was performed in a single step after two minutes incubation with 50 µL of DNase-free water.

### Polymerase Chain Reaction (PCR)

Four primer sets were assessed for detecting mycoplasma by means of PCR technique (Table). The primer sets were conceived by following groups: van Kuppeveld et al<sup>12</sup>, the *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* – DSMZ<sup>13</sup>, Bruchmuller et al<sup>14</sup>, and the Japanese Pharmacopoeia<sup>15</sup>. Initially, the PCR techniques were set up with varied reagent molarities and cycling temperatures, i.e., following the protocols described by the diverse authors. After testing these protocols, the assays were carried out using those primers in the standard PCR conditions. Further tests were performed for optimizing the magnesium chloride concentration, the annealing temperature and the primer concentration. In order to minimize the deviations in methods comparison, the PCR standardization assays were set up with the same DNA samples.

The optimized protocol for PCR reaction comprised of 25 µL final volume of 200 µM of each dNTP (Invitrogen, San Diego, USA), 0.6 µM of each primer, 0.5 U Taq Go Flexi polymerase, enzyme buffer 1X, 2 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega, Madison, WI, USA) and 5 µL of template DNA. This mix was heated at 95 °C for 10 min, then cycled 30 times,

**Table.** List of synthetic DNA oligonucleotide primers used in this study

Primers Reference	Forward	Reverse	Amplicon size
12	5'actcctacgggaggcagcagta3'	5'tgcacatctgtcactctgttaacctc3'	~700 bp
13	5'cgctgagtagtacgttcgc3' 5'cgctgagtagtacgtacgc3' 5'tgcctgagtagtacattcgc3' 5'tgcctgggtagtacattcgc3' 5'cgctgggtagtacattcgc3' 5'cgctgagtagtagtgcgc3'	5'gcggtgtgtacaagaccgca3' 5'gcggtgtgtacaaaaccgca3' 5'gcggtgtgtacaaaaccgca3'	~500 bp
14	5'gagcaaacaggattagatac3'	5'accatgcaccayctgtcaytc3'	~300 bp
15	5'acaccatgggagytgtaaat3' 5'gtgsggmtggatcacctct3'	5'cttcwtcgacttycagaccaaggcat3' 5'gcattccawawacyctt3'	~400 bp

Footnote: The amplicons size may vary slightly among the mycoplasma species

and submitted to the denaturation at 94 °C for 30s; annealing at 55 °C for 30s and extension at 72 °C for 90s. The final extension took place at 72 °C for 7 minutes.

All of the primers used in this study were synthesized by Integrated DNA Technologies, Inc. (Coralville, IA, USA), and the amplifications were carried out in the thermocycler T3000 (Whatman Biometra, Goettingen, Germany). Following the DNA amplification, the results were analyzed on 1 % (w/v) agarose gels in 1X TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1mM EDTA). The electrophoresis was set up on 5V/cm. After the assay running, the gels were stained by incubating in 0.5µg/mL ethidium bromide solution for 10 min and destained in water for 30 min. Data were recorded by the Photodocumentation EDAS 290 System (Kodak, Rochester, NY, USA), under the UV light emission.

### PCR Methodology Validation

PCR methodology validation was performed by running this assay and analysing 286 samples of vaccine intermediates and the saline solution with or without mycoplasma spiked with other microorganisms unrelated to the Mollicutes class. In order to improve the reliability, each replica of the same assay was set up by new spiked samples, i.e., diluted the microorganisms from a different seed lot vial performed at different day.

### Selectivity

Seventeen samples of vaccine and its intermediates with 25 CFU were used, including pure vaccine and those spiked with each one of the four mycoplasma species, and also the microorganisms unrelated to the Mollicutes class diluted in saline solution. For this assay, 25 colony forming units (CFU) of each of the four mycoplasma species were employed. The used mycoplasma inoculum is close to the WHO requirements for liquid medium approval in growth promotion test. In order to evaluate whether higher amounts of unrelated microorganisms could produce false-positive results, they were diluted into 200 CFU per sample in saline solution. The assay acceptance criteria were (i) the observation of a band with roughly 500 bp in 1 %

agarose gel for spiked mycoplasma samples and (ii) the absence of this band for samples spiked with *C. sporogenes*, *M. luteus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *C. albicans*, *E. coli* and *P. aeruginosa* as well as in non-spiked samples. This parameter was evaluated in two replicas, totalizing 34 samples.

### Limit of detection (LOD)

Pure and spiked vaccine intermediates were used with different mycoplasma concentrations. The assay took place in duplicate for every intermediary product of each mycoplasma species and their respective controls (plain products), analyzing 112 samples. This assay aimed at determining the lowest amount of each mycoplasma, which could be detected in the YF-vaccine intermediates.

### Sensitivity, Specificity, Positive Predictive Value, Negative Predictive Value, Analytical Accuracy and Kappa Index

Samples of both vaccine intermediates were spiked with 30 CFU of each mycoplasma species. Each test was performed with five samples of every intermediary product, one plain and four spiked with each one of assayed mycoplasmas. This parameter was evaluated in 14 replicas, i.e., eight replicas performed by one operator and two replicas by each one of the three other different operators, totalizing 140 samples. The objective was to use these data in a contingency table, and the assay acceptance criteria achieving 100 % sensitivity, at least 95 % analytical accuracy and 0,61 of Kappa Index, i.e., no false-negative results and a strong agreement rate among the evaluated parameters.

## RESULTS

### Methods Comparison

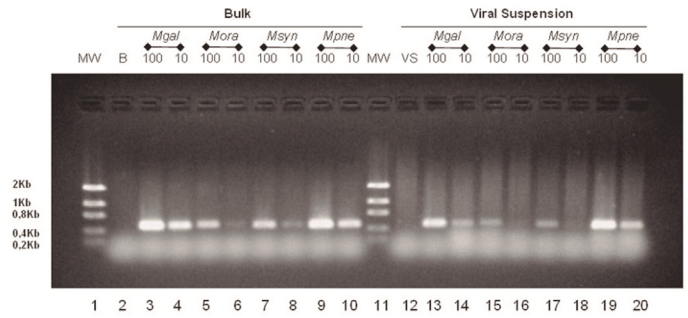
Initially, the PCR efficiency was evaluated using each of the four primer sets as previously described by other authors<sup>12-15</sup>. The *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* (DSMZ) primers were used following the protocol previously described, but no amplicon was produced from the templates of YF vaccine intermediates spiked with mycoplasma.



Next, we tested the Japanese Pharmacopoeia methodology<sup>15</sup> and PCR targeted products were obtained in three of four analysed mycoplasma (e.g., *M. orale*, *M. synoviae* and *M. pneumoniae*) in the second round of amplification, both at 100 CFU and 10 CFU spiked samples. However, the absence of amplification in the material spiked with *M. gallisepticum* made this protocol unsuitable. The primers mentioned by van Kuppeveld et al<sup>12</sup> were tested using the described parameters. Like the Japanese Pharmacopoeia primers, the van Kuppeveld oligonucleotides yielded amplicons for three mycoplasma species, but not for *M. gallisepticum*. Finally, the Bruchmuller primer set<sup>14</sup> was tested, and no bands with the predicted sizes were produced. All of this initial comparison was performed with the same extracted DNA samples.

After testing the four protocols to detect mycoplasma targeted DNA (e.g., *M. gallisepticum*, *M. orale*, *M. synoviae* and *M. pneumoniae*), we concluded that none of the assays met the WHO criteria set up at the beginning of the present study.

Each of the four primers sets was tested in the standard PCR conditions, and using the same DNA samples extracted from 100 and 10 CFU of each mycoplasma diluted in the vaccine intermediates. Only the set described by DSMZ group<sup>13</sup> showed positive amplification of all of the species. For this reason, DSMZ primer set was used in several amplification reactions, differing in magnesium chloride concentration, primer molarity, and annealing temperature, to define an optimized protocol in order to improve the detection limit of the assay (data not shown). The best amplification efficiency was achieved with 2 mM magnesium chloride, 0.6 μM of each primer and at 55 °C annealing temperature. This modified protocol produced amplicons in all of the four tested mycoplasma species both in bulk and in spiked viral suspension with 100 CFU and 10 CFU (Figure 2). Therefore, this protocol was selected for conducting the method validation evaluation.



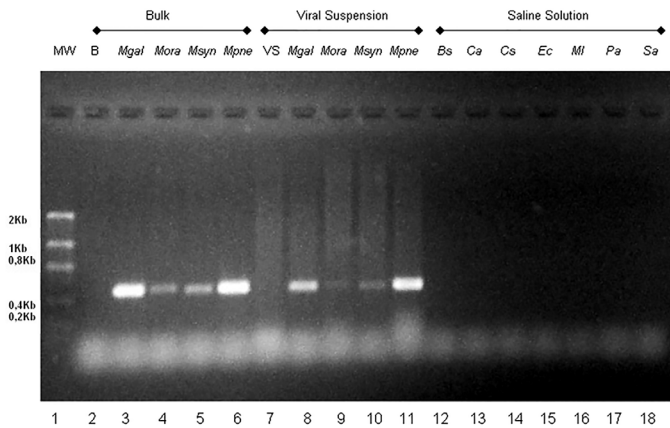
**Figure 2.** Electrophoretic analysis of amplicons produced by using optimized protocol employing DSMZ primers set. The whole volume of PCR product was used for performing electrophoretic analysis on 1 % agarose gel. Lane 1 and 11: Molecular weight marker “Low Mass DNA Ladder”. Lane 2: Bulk negative control. Lanes 3-10: Bulk spiked with 100 and 10 CFU of *M. gallisepticum*, *M. orale*, *M. synoviae* and *M. pneumoniae*, respectively. Lane 12: Viral suspension negative control. Lanes 13-20: Viral suspension spiked with 100 and 10 CFU of *M. gallisepticum*, *M. orale*, *M. synoviae* and *M. pneumoniae*, respectively

## Method Validation

### Selectivity

In order to demonstrate the specificity of the primers used in the PCR reactions, we tested the plain and spiked samples of vaccine intermediates with each of the four mycoplasma species, as well as the quantified microorganisms unrelated to the Mollicutes class. The expected amplicon was obtained for all of the four tested mycoplasmas, spiked in both intermediary products (Figure 3, lanes 3 to 6 and 8 to 11). No amplification was detected for the negative controls of vaccine intermediates as expected (Figure 3, lanes 2 and 7).

Out of the seven bacterial and fungal species tested as unrelated microorganisms, none provided DNA amplification, determining the specificity of the primers and of the protocol employed for mycoplasma amplification (Figure 3, lanes 12 to 18). This assay was prepared in duplicate, for demonstrating the absence of unspecific amplification products both for pure vaccine intermediates and for unrelated microorganisms.



**Figure 3.** Electrophoretic analysis of PCR products of one of the two replicates from the selectivity assay. Whole volume was applied on 1 % agarose gel. Lane 1. “Low Mass” molecular weight marker. Lane 2. Bulk negative control. Lane 3-6. Bulk spiked with 25 CFU of *M. gallisepticum*, *M. orale*, *M. synoviae* and *M. pneumoniae*, respectively. Lane 7. Viral suspension negative control. Lane 8-11. Viral suspension spiked with 25 CFU of *M. gallisepticum*, *M. orale*, *M. synoviae* and *M. pneumoniae*, respectively. Lane 12-18. Saline spiked with 200 CFU of *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Clostridium sporogenes*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, respectively

### Limit of detection (LOD)

Aiming at establishing the minimal mycoplasma concentration detectable through the proposed methodology, we used the intermediary products which were intentionally contaminated with decreasing concentrations of each of the mycoplasma species. This assay was prepared in duplicate.

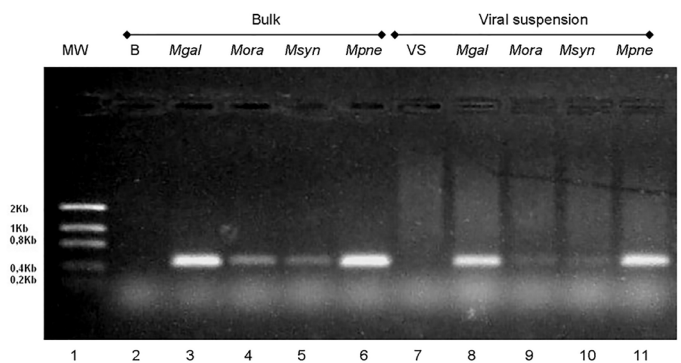
For *M. gallisepticum* and *M. pneumoniae* the determined LOD in both bulk and viral suspension samples was roughly 3.1 CFU; and regarding *M. orale* and *M. synoviae*, this limit value was roughly 3.1 CFU for bulk and 12.5 CFU for viral suspension. LOD was not specifically defined when concentration of 3.1 CFU generated PCR products, suggesting an even lower limit of detection.

*Sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value, analytical accuracy and Kappa index*

In order to evaluate the method variability according to sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value,

analytical accuracy and Kappa index, this electrophoretic procedure was repeated 14 times using different samples, i. e., various seed lot vials dilution in the vaccine intermediates at distinct days, and the test running by distinct analysts. In none of these analyses, false-results were observed, as exemplified in **Figure 4**.

Of 140 assayed samples, 112 showed true-positive profile and 28 exhibited true negative status, i.e. all of the analyzed samples evidenced true status. Therefore, the parameters of sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and analytical accuracy demonstrated 100 % performance and Kappa index=1.



**Figure 4.** Electrophoretic analysis of PCR products in one of 14 replicates for assessing the sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value, analytical accuracy and Kappa index. Whole volume was applied on 1 % agarose gel. Lane 1. “Low Mass” molecular weight marker. 2. Bulk negative control. 3-6. Bulk spiked with 30 CFU of *M. gallisepticum*, *M. orale*, *M. synoviae* and *M. pneumoniae*, respectively. 7. Virus suspension- negative control. 8-11. Viral suspension spiked with 30 CFU of *M. gallisepticum*, *M. orale*, *M. synoviae* and *M. pneumoniae*, respectively

### Quality Control (QC) and Assurance

The standardized operational procedure (SOP) of the whole mycoplasma detection methodology was developed. This protocol has been registered at the Quality Assurance Department of Bio-Manguinhos/Fiocruz, Rio de Janeiro-RJ, and it has being followed throughout the validation experiments. A validation report for documenting the assays has been prepared, registered and then this methodology has being

incorporated into the QC assays performed in the YF vaccine produced in Bio-Manguinhos/Fiocruz, since its validation in May 2008. And from then, the PCR approach has been used together with the mycoplasma culture classical method, and both show compatible results.

## DISCUSSION

Biological and medical products differ from chemical drugs which usually cannot be characterized molecularly; starting methods such as bacteria, viruses, or genetically modified microorganisms are of enormous complexity, besides they are capable to vary according to the preparation methodologies used for. The certain kind of these products, such as the vaccines against transmissible disease, are also administered to healthy individuals, often in children at the beginning of their lives. Thus, a strong emphasis must be placed on their quality to ensure, to the greatest extent possible, that they are efficacious in preventing or treating life-threatening disease, without themselves causing harm. The WHO has a whole set of requirements for QC of the vaccines produced throughout the world, including the YF vaccine<sup>5</sup>. Among the QC assays required for YF vaccine, the detection of mycoplasma is mandatory. According to the WHO requirements the current widely applied mycoplasma detecting method is the microbiologic culture, which takes about 35 days to provide results<sup>4</sup>. The WHO Technical Report Series number 872 was under evaluation to investigate what needs to be changed<sup>16</sup>.

The PCR method has been routinely employed for detecting microorganism in disease diagnosis, food and environment assessment, being considered as reliable technique for these purposes. The use of PCR amplification has revolutionized the ability to trace contaminants. However, considering that these techniques detect not only the viable organisms, great care has to be exercised when analyzing the results and their impact on the products safety. Mycoplasma detection in cell cultures has long been the subject of research<sup>7,8,12-15,17-21</sup>. This report is the first one

to describe a molecular approach for detecting mycoplasma in YF vaccine. Concerning the bacterial culture procedure for mycoplasma detection, the WHO requirements for the medium approval establishes the ranges from 20 to 40 CFU for liquid culture medium and from 200 to 400 CFU for solid culture medium<sup>5</sup>. In the present study we have taken into account these approval ranges for PCR validation.

The purpose of this study was to improve the methodology for detecting mycoplasma, thus streamlining the QC assays used during the YF vaccine production. And for accomplishing this end, we selected four different techniques of PCR assays previously described<sup>12-15</sup>. We evaluated the ability of each protocol to detect mycoplasma DNA in spiked YF vaccine intermediates, aiming at developing a standardised protocol as part of the routine QC. None of these methods, even performed precisely as described by the authors, it will be unable to meet the objectives at the first evaluation. It is plausible to assume that the first negative results should occur due to the presence of inhibitors in DNA samples.

PCR inhibition is a common drawback for implementing the PCR-based techniques<sup>22,23</sup>. As the YF vaccine is produced in chicken embryos, the previously reported PCR inhibitors present in blood, flesh and skin<sup>24,25</sup> could interfere with DNA amplification. Inhibitor compounds as heme composites, alkaline haematin, degraded serum proteins, haemoglobin, urea, fats and calcium have been previously found to remain in DNA samples regardless of the method used for nucleic acid purification<sup>26,27</sup>. Iron-containing inhibitors (e.g. iron chloride, lactoferrin, haemoglobin and haemin) compete with the magnesium in the PCR reaction, thus an increase in magnesium chloride concentration is required to make the reaction to proceed<sup>28</sup>. Additionally, polysaccharide complex and immunoglobulin contaminants can bind to the DNA, impairing the effectiveness of the PCR annealing step, and hence demanding changes in the cycling temperatures<sup>27</sup>. In addition to the activity of inhibitors, the PCR assay itself is highly sensitive to minor changes in the protocol, meaning that

subtle variations may produce higher amounts of amplicon or even no amplicon at all<sup>23</sup>.

Based on these negative results, the protocols were modified, attempting to get a positive amplification. The modification was successful only for DSMZ primers set, which were optimized by testing the different magnesium and primer concentrations and the cycling temperatures. In order to avoid the variability, all of the modifications were carried out using the same extracted DNA as template. The parameters validation and their acceptance criteria were based on the United States Pharmacopoeia<sup>10</sup> and scientific literature<sup>29,30</sup>. In the present study we validated an alternative method providing a faster outcome and highly sensitive test for detecting mycoplasma in YF vaccine QC, according to the selectivity, LOD, sensitivity, specificity, positive and negative predictive values, analytical accuracy and Kappa Index. Robustness of the PCR assay was not assessed in a formal validation, but it was retrospectively evaluated after the method has been developed.

The selectivity measures the answer degree of the assay regarding the target and non-target analytes. This parameter met the expected profile of this study, exhibiting DNA amplification when the genomic DNAs from the four mycoplasma species were used, parallel to the no-amplicon resulting from the negative YF vaccine intermediate controls amplification. The mycoplasma DNA concentration was derived from 25 CFU of each mycoplasma previously to the DNA isolation; and this is similar to that required by WHO for demonstrating the nutrient properties of the liquid culture media for mycoplasma detection<sup>5</sup>. Additionally, unrelated bacteria and fungi species spiked into YF vaccine intermediates yielded no DNA amplification. This test assured the ability of our standardized PCR protocol in producing amplicons generated from template DNA of YF vaccine spiked with *Mycoplasma spp.*. Besides, the unspecific amplification was not observed by using either YF vaccine without mycoplasma contamination or with contaminating agents as bacteria and fungi, e.g., *C. sporogenes*, *M. luteus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *C. albicans*, *E. coli* and *P. aeruginosa*. These microorganisms were chosen

for evaluating the selectivity test, based on the controls of the growth promotion assay for approving the culture media to perform the sterility tests<sup>31</sup>.

Our study also allowed an appropriate LOD for further supporting this new alternative method. LOD was determined in spiked vaccine intermediates, including four mycoplasma species, i.e., *M. gallisepticum*, *M. orale*, *M. synoviae* and *M. pneumoniae*. The *M. gallisepticum* and *M. pneumoniae* spiked samples provided the amplification of 16S ribosome gene in a bacterial concentration as low as 3.1 CFU in both vaccine intermediates. From the both species the detected concentration was even below 3.1 CFU, with a worth noting high intensity of bands acquired from the amplification in the spiked YF vaccine bulk, when compared to those finding from the spiked YF-vaccine viral suspension amplification. Such difference might be occurred due to the existence of PCR inhibitors in the YF vaccine suspension extract, implying that the detection in viral suspension could be further optimized. Regarding the YF-vaccine intermediates matrices, the bulk is approximately one decimal dilution of viral suspension with stabilizing solutions. Thus, it is reasonable to assume that the distinct efficiencies in mycoplasma amplification might be related to the amount of inhibitors in each of these two analytes, as discussed above. In contrast, *M. orale* and *M. synoviae* showed amplicons with equally lower threshold of detection, i.e., 3.1 and 12.5 CFU for spiked YF vaccine bulk and viral suspension, respectively. These data suggest the strong avidity of the primer set described by Uphoff and Drexler<sup>13</sup> for *M. gallisepticum* and *M. pneumoniae* as compared to *M. orale* and *M. synoviae*.

Our results regarding validation parameters were analysed by means of 2x2 matrix based on Chi-Square method, i.e., the contingency table, defining the sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value, analytical accuracy and Kappa index<sup>29,30</sup>. These contingency statistics confer reliability to the validation study of qualitative methods such as end-point PCR, providing a quantitative measurement for the magnitude of agreement

among the evaluated samples. The number of repetitions of this procedure directly influences in its representativeness. All of the aspects regarding the contingency table yielded values of 100 %, and no false negative or false positive results were found. Contingency tables with a wide range of agreement rates were described in previous studies on PCR validation<sup>29,32</sup>.

In the present study, the stocks of live bacteria (seed lots) were used for quantifying mycoplasma by means of plating and serial dilutions counting before and after samples freezing. The quantification of the seed lots took into account only the plates ranging from 50 to 300 colonies per plate, and it was performed for analyzing the reproducibility<sup>33</sup>. These seed lots were used as a contamination source for method validation, in both the positive controls and the spiked samples. Thus, the tests were performed using the intermediary products spiked with previously determined quantities of live bacteria. Therefore, the reproducibility of the performed tests was also improved by seed lots approach, i.e. for the each test setting one vial was thawed and diluted into the respective intermediary product before the DNA isolation. All of the tests were carried out employing pure samples (without mycoplasma) as negative controls.

Additionally, the mycoplasma culture media employed at QC Department of Bio-Manguinhos was suitable to promote the growth of their four species. According to the ATCC<sup>34</sup>, three different media should be applied to this end. The European Pharmacopoeia also describes more than one media to performing the mycoplasma control<sup>35</sup>. However, the previous study showed that no difference was found in the mycoplasma growth in different culture media<sup>36</sup>. Therefore, in addition to the PCR protocol, we suggest to use a simple and straightforward method for quantifying mycoplasma using a single culture media that provides the growth of four tested mycoplasma species *M. gallisepticum*, *M. orale*, *M. synoviae* and *M. pneumoniae*.

The mycoplasma quantification by culture methods remains as a complex matter of debate; and among the PCR approaches employed for alternative QC, the genome copies has been chosen

as a means for bacterial counting<sup>37,38</sup>. Even so, there is a ratio between the genome copies versus the CFU, which is at most minimized only. Degraded genomic DNA is critical for a reliable correlation of the genome copy numbers, and the statistical approaches should be applied to accept these results. Many biases have to be evaluated when genome copies are employed, as biological features of mycoplasma strain, phase of mycoplasma growth, growth conditions and mycoplasma sample handling after the cultivation<sup>8</sup>. Besides, the copy number of the 16S rRNA gene differs among the different species of mycoplasma, introducing as such a further bias to the genome copy number evaluation<sup>39,40</sup>. Additionally, the yield provided by the different DNA isolation methods may vary widely, generating outputs that do not correlate to the real bacterial amounts in the samples, if the DNA isolation method is changed. As such, our study aimed at performing an evaluation based on WHO requirements referring to the CFU counting in order to minimize biases.

The use of both methods together for performing the bacteriological and molecular analyses and aiming at the same purpose, this investigation should be an advantageous alternative. Thus, the present study provided an even more accurate ranking of certainty and safety characteristics regarding the absence of mycoplasma in YF vaccine. Moreover, the viability is not considered in PCR assays, whilst the culture methods provide mycoplasma detection solely from the viable bacterial cells. There are perspectives to assess the real time PCR methodologies in comparison to the validated assay.

Since 2008, when this molecular method based on DSMZ primers has been validated, over than 2,000 YF vaccine intermediate samples were analyzed at the Bio-Manguinhos/ Fiocruz - QC Department, by means of the parallel with both PCR and mycoplasma culture methods.

## CONCLUSION

This paper is the first successful demonstration of the use of PCR-based QC assay for evaluating the YF vaccine produced

in embryonated eggs. This validation process is clearly not a final step on the mycoplasma QC, as we aim at constantly improving the techniques to contribute for increasing the confidence assurance of the YF vaccine produced in Bio-Manguinhos, as well as to establish the best QC standards of vaccines and health products in general.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Bio-Manguinhos-Fundação Oswaldo Cruz/ Ministério da Saúde/ Brasil. We thank Dr. Ricardo Galler who provided insight and expertise that greatly assisted the research and for his comments that improved the manuscript.

## REFERENCES

1. Heinz FX, Stiasny K. Flaviviruses and flavivirus vaccines. *Vaccine*. 2012;30:4301-6. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.114>].
2. Querec TD, Pulendran B. Understanding the role of innate immunity in the mechanism of action of the live attenuated Yellow Fever Vaccine 17D. *Adv Exp Med Biol*. 2007;590:43-53.[DOI: [https://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-34814-8\\_3](https://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-34814-8_3)].
3. Frierson JG. The Yellow Fever Vaccine: A History. *Yale J Biol Med*. 2010;83:77-85.
4. World Health Organization – WHO. Requirements for yellow fever vaccine. Technical Report Series 872, WHO, Geneva; 1998.p.30-68.
5. World Health Organization – WHO. General requirements for the sterility of biological substances. Technical Report Series 872, WHO, Geneva; 1998. p.69-74.
6. Razin S, Hayflick L. Highlights of mycoplasma research - An historical perspective. *Biologicals* 2010;38:183-190. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2009.11.008>].
7. Armstrong SE, Mariano JA, Lundin DJ. The scope of mycoplasma contamination within the biopharmaceutical industry. *Biologicals*. 2010;38:211-3. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2010.03.002>].
8. Volokhov DV, Graham LJ, Brorson KA, Chizhikov. Mycoplasma testing of cell substrates and biologics: Review of alternative non-microbiological techniques. *Mol Cell Probes*. 2011;25:69-77. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2011.01.002>].
9. International Organization for Standardization - ISO. ISO/IEC 17025: General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. London; 2005.p.28.
10. United States Pharmacopeia – USP. Volume 1, <1223> Validation of Alternative Microbiological Methods, 30th ed., The United States Pharmacopeial Convention, Rockville; 2007. p.677-0.
11. Frey ML, Hanson RP, Anderson DP. A medium for the isolation of avian mycoplasmas. *Am J Vet Res*. 1968;29(11):2163-2171.
12. van Kuppeveld FJM, van der Logt JTM, Angulo AF, van Zoest MJ, Quint WGV, Niesters HGM, et al. Genus- and species specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *Appl Environ Microbiol*. 1992;58(8):2606-2615.
13. Uphoff CC, Drexler HG. Detection of mycoplasma in leukemia-lymphoma cell lines using polymerase chain reaction. *Leukemia*. 2002;16(2):289-293. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1038/sj.leu.2402365>].
14. Bruchmuller I, Pirkl E, Herrman R, Stoermer M, Eichler H, Kluter H, et al. Introduction of a validation concept for a PCR-based Mycoplasma detection assay. *Cytother*. 2006;8(1):62-9. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1080/14653240500518413>].
15. Japanese Pharmacopoeia. Mycoplasma Testing for Cell Substrates used for the Production of Biotechnological/Biological Products, 15th ed. Society of Japanese Pharmacopoeia, Tokyo; 2006. p.1717-1724.
16. Conference report. WHO Working Group on Technical Specifications for Manufacture and Evaluation of Yellow Fever Vaccines, Geneva, Switzerland, 13–14 May 2009. *Vaccine*. 2010;28:8236–8245. [DOI:<https://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.10.070>].
17. Bernet C, Garret M, de Barbeyrac B, Bebear C, Bonnet J. Detection of Mycoplasma pneumoniae by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1989;27(11):2492-6.

18. Teysou R, Poutiers F, Saillard C, Grau O, Laigret F, Bove JM, et al. Detection of Mollicute Contamination in Cell Cultures by 16S rDNA Amplification. *Mol Cell Probes*. 1993;7(3):209-216. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1006/mcpr.1993.1030>].
19. Eldering JA, Felten C, Veilleux CA, Potts BJ. Development of a PCR method for mycoplasma testing of Chinese hamster ovary cell culture used in the manufacture of recombinant therapeutic proteins. *Biologicals*. 2004;32:183-193. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2004.08.005>].
20. Sung H, Kang SH, Bae YJ, Hong JT, Chung YB, Lee CK, et al. PCR-Based Detection of Mycoplasma Species. *J Microbiol*. 2006;4(1):42-9.
21. Deutschmann SM, Kavermann H, Knack Y. Validation of a NAT-based Mycoplasma assay according European Pharmacopoeia. *Biologicals*. 2010;38:238-248. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2009.11.004>].
22. Jurstrand M, Jensen JS, Fredlund H, Falk L, Molling P. Detection of Mycoplasma genitalium in urogenital specimens by real-time PCR and by conventional PCR assay. *J Med Microbiol*. 2005;54:23-9. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.45732-0>].
23. Berezki L, Kis G, Bagdi E, Krenacs L. Optimization of PCR amplification for B- and T-cell clonality analysis on formalin-fixed and paraffin-embedded samples. *Pathol Oncol Res*. 2007;13(3):209-214. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1007/BF02893501>].
24. Markoulatos P, Mangana-Vougiouka O, Koptopoulos G, Nomikou K, Papadopoulos O. Detection of sheep poxvirus in skin biopsy samples by a multiplex polymerase chain reaction. *J Virol Methods*. 2000;84:161-7. [DOI: [https://dx.doi.org/10.1016/S0166-0934\(99\)00141-X](https://dx.doi.org/10.1016/S0166-0934(99)00141-X)].
25. Radstrom P, Knutsson R, Wolffs P, Lovenklev M, Lofstrom C. Pre-PCR Processing: Strategies to Generate PCR-Compatible Samples. *Mol Biotechnol*. 2004;26:133-146. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1385/MB:26:2:133>].
26. Wilson IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol*. 1997;63(10):3741-3751.
27. Al-Soud WA, Radstrom P. Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat. *J Clin Microbiol*. 2000;38(12):4463-4470.
28. Al-Soud WA, Radstrom P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J Clin Microbiol*. 2001;39(2):485-493. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1128/JCM.39.2.485-493.2001>].
29. Malorny B, Hoorfar J, Bunge C, Helmuth R. Multicenter Validation of the Analytical Accuracy of Salmonella PCR: towards an International Standard. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69(1):290-6. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1128/AEM.69.1.290-296.2003>].
30. Conraths FJ, Schares G. Validation of molecular-diagnostic techniques in the parasitological laboratory. *Vet Parasitol*. 2006;136:91-8. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.12.004>].
31. United States Pharmacopeia – USP. Volume 1, <71> Sterility Tests, 30th ed., The United States Pharmacopeial Convention, Rockville; 2007. p.97-102.
32. Jimenez-Coello M, Poot-Cob M, Ortega-Pacheco A, Guzman-Marin E, Ramos-Ligonio A, Sauri-Arceo CH, et al. American trypanosomiasis in dogs from an urban and rural area of Yucatan, Mexico. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2008;8(6):755-61. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1089/vbz.2007.0224>].
33. Sutton S. Accuracy of Plate Counts. *J Val Technol*. 2011; (Summer):42-6.
34. American Type Culture Collection - ATCC. Culture method. [accessed 2015 Oct 26]. Available at:
  - a. [<http://www.atcc.org/Products/All/15302.aspx#culturemethod>]
  - b. [<http://www.atcc.org/Products/All/15492.aspx#culturemethod>]
  - c. [<http://www.atcc.org/Products/All/23714.aspx#culturemethod>]
  - d. [<http://www.atcc.org/Products/All/25204.aspx#culturemethod>]
35. European Pharmacopoeia - Ph Eur. Supplement 6.1, 2.6.7 Mycoplasmas, 6th ed., Council of Europe, Strasbourg; 2008. p.3317-3321.
36. Milne C, Daas A. Establishment of European Pharmacopoeia Mycoplasma Reference Strains. *Pharmeurop Bio*. 2006;(1):57-72.

37. Asarnow D, Warford A, Fernandez L, Hom J, Sandhu G, Candichoy Z, et al. Validation and international regulatory experience for a mycoplasma touchdown PCR assay. *Biologicals*. 2010;38:224-231. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2009.11.006>].
38. Dabrazhynetskaya A, Volokhov DV, David SW, Ikononi P, Brewer A, Chang A, et al Preparation of reference strains for validation and comparison of mycoplasma testing methods. *J Appl Microbiol*. 2011;111:904-914. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05108.x>].
39. Chen X, Finch LR. Novel Arrangement of rRNA Genes in *Mycoplasma gallisepticum*: Separation of the 16S Gene of One Set from the 23S and 5S Genes. *J Bacteriol*. 1989;171(5):2876-8.
40. Skamrov A, Goldman M, Klasova J, Beabealashvilli R. *Mycoplasma gallisepticum* 16S rRNA genes. *FEMS Microbiol Lett*. 1995;128:321-325. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07543.x>].





## Óleos vegetais extraídos a frio comercializados na cidade de São Paulo: avaliação das características de identidade e qualidade e da ocorrência de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

Cold-pressed vegetable oils sold in São Paulo city: characteristics of identity and quality evaluation and polycyclic aromatic hydrocarbons occurrence

RIALA6/1707

Silva SA. **Óleos vegetais extraídos a frio comercializados na cidade de São Paulo: avaliação das características de identidade e qualidade e da ocorrência de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.** São Paulo 2015. [Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação Nutrição em Saúde Pública, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, USP]. Orientador: Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres.

O crescente mercado dos produtos naturais, fomentado pelo interesse dos consumidores por alimentos que auxiliem a promoção da saúde, tem pressionado a indústria alimentícia na oferta por novos alimentos. Dentre estes alimentos, encontram-se os óleos vegetais extraídos a frio, reconhecidos por preservarem compostos bioativos característicos e, alguns deles, serem fontes de ácidos graxos (AG) essenciais. A categoria dos óleos e gorduras apresenta, dentre outros alimentos, uma importante fonte de exposição aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), um grupo de contaminantes químicos orgânicos, alguns com ação carcinogênica. Este trabalho teve como objetivo avaliar os óleos vegetais extraídos a frio quanto aos parâmetros de identidade, de qualidade e à ocorrência de HPAs. Foram avaliadas 40 amostras, dez de cada tipo (coco, cártamo, prímula e linhaça), de diferentes marcas, adquiridas no comércio da cidade de São Paulo. Foram realizados os ensaios de perfil de AG, índice de acidez, índice de peróxido, p-anisidina, valor total de oxidação (totox) e HPAs [benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno]. Quanto aos AG, catorze óleos (35,0 %) não apresentaram perfis de ácidos graxos característicos que os declarados em seus rótulos, incluindo um de coco, quatro de cártamo e nove de prímula. Os valores para acidez estavam inadequados em relação à legislação para três óleos de linhaça (7,5 %). Para o peróxido, quatro óleos (10,0 %) estavam acima do limite da legislação, sendo dois de linhaça e dois de prímula. Os valores de p-anisidina variaram de <LQ a 12,98, sendo o menor valor encontrado nas amostras de coco e o maior em uma de prímula, que apresentava um odor alterado. No ensaio de totox, 37,5 % das amostras apresentaram valores acima da recomendação da literatura, especialmente os óleos de cártamo e prímula. Já para os HPAs, pelo menos um dos hidrocarbonetos analisados foi detectado em 97,5 % das amostras avaliadas; três amostras de prímula (7,5 %) apresentaram níveis acima do permitido pela Comunidade Europeia para BaP e, para a soma dos 4 HPAs, oito óleos (20,0 %) estavam em desacordo: dois de cártamo, quatro de prímula e dois de linhaça. Este trabalho expõe os problemas relacionados aos parâmetros de identidade, qualidade e contaminação dos óleos vegetais comercializados como extraídos a frio e reforçam a importância de um contínuo monitoramento destes produtos.

**Palavras-chave.** óleos vegetais, ácidos graxos, oxidação de lipídeos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs).

### AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo 2014/12604-0), pelo auxílio financeiro, e ao Instituto Adolfo Lutz, pela parceria no projeto.

Dissertação disponível em: <http://www.teses.usp.br>  
E-mail: [simone.alves.silva@usp.br](mailto:simone.alves.silva@usp.br)



# Caracterização físico-química de pães do tipo francês, bolacha e de cachorro quente

## Physicochemical characterization of French-type, biscuit and hot-dog breads

RIALA6/1708

Niana Ozorio MARTINI, Thomas Duzac ESCOBAR, Tiago André KAMINSKI\*

\*Endereço para correspondência: Universidade Federal do Pampa – Campus Itaqui, Itaqui, RS, Brasil, CEP: 97650-000. Tel: 55 3432 1850. E-mail: tiagokaminski@unipampa.edu.br

Recebido: 26.09.2016 - Aceito para publicação: 26.10.2016

### RESUMO

Dos pães habitualmente consumidos em porções unitárias na Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul, francês, bolacha e de cachorro quente, os dois últimos carecem de informações científicas sobre características físico-químicas, dificultando-se a elaboração de planos alimentares. A proposta deste trabalho foi de avaliar as características físico-químicas, como o peso e o volume por unidade, bem como a composição química dos pães comercializados em cinco padarias da cidade de Itaqui, RS. A unidade do pão bolacha apresentou peso e volume significativamente superiores aos demais tipos, embora sem diferir na densidade e no volume específico do pão de cachorro-quente. Na composição química, os pães de uma das padarias e o pão bolacha dos demais estabelecimentos demonstraram menores teores de umidade e maiores teores de carboidratos digeríveis e de valor calórico. Os diferentes tipos de pães e a panificação por diferentes estabelecimentos resultam em diferenças nas características físico-químicas, o que reforça a necessidade desses fatores serem considerados na elaboração de planos alimentares quando o pão francês for substituído.

**Palavras-chave.** pão, peso, volume, densidade, lipídeos, valor calórico.

### ABSTRACT

The mostly consumed bread types in unitary portions in the West Frontier region of Rio Grande do Sul are French-type bread, biscuit bread and hot-dog bread. Owing to the lack of scientific data on the biscuit bread and hot-dog bread physicochemical characteristics, it has to perform the dietary plans. This study proposed to evaluate the physicochemical characteristics of the breads commercialized in five bakeries in the city of Itaqui, RS. The evaluated parameters were: unit weight, unit volume and chemical composition. Biscuit breads showed significantly higher weight and volume than other bread types, although not differing on the density and the specific volume of hot-dog breads. Bread samples from one of the bakeries and the biscuit bread in general showed lower moisture contents, and higher rates of digestible carbohydrates and of calorific value. Varied types of bread and diversified bakery processes result in the different physicochemical characteristics, which reinforce the necessity in considering these factors during the performance of the dietary plans when the French-bread is replaced.

**Keywords.** bread, weight, volume, density, lipids, caloric value.

## INTRODUÇÃO

Visto como alimento essencial na mesa de café, o pão é o produto mais produzido nas padarias e um dos alimentos mais consumidos pela população brasileira. A Organização Mundial de Saúde (OMS) considera saudável o consumo de 60 kg de pães ao ano por pessoa, mas dados da Associação Brasileira da Indústria de Panificação e Confeitaria (ABIP)<sup>1</sup> denotam que o consumo de pães no Brasil é de 33,5 kg ao ano por pessoa, inferior ao consumo do Chile e Argentina, com respectivos valores de 98 e 82,5 kg ao ano por pessoa. A produção de pães no Brasil é artesanal ou industrial, que representam 86 e 14 %, respectivamente; sendo que dos pães artesanais, 75 % são oriundos de padarias e 7 % de supermercados<sup>1</sup>.

O pão francês é o tipo de pão mais consumido no Brasil, aproximadamente 52 % do total, mas outros tipos são panificados e consumidos em quantidades consideráveis, como o pão doce, hambúrguer, pão de queijo, pão de leite, pão de cachorro quente, pão de forma ou sanduíche, sovado, baguete, integral, pão de centeio, bengala, pão de milho, rosca, bisnaga, croissant, dentre outros<sup>2</sup>. Preparado, obrigatoriamente, com farinha de trigo, sal (cloreto de sódio) e água, o pão francês se caracteriza pela casca crocante de cor uniforme castanho-dourada e miolo de cor branco creme de textura e granulação fina não uniforme<sup>3</sup>.

O Brasil também apresenta um elevado consumo de lanches com pães, dentre eles o cachorro-quente, que se trata de um produto de fácil acesso, baixo preço e rápido preparo<sup>4</sup>. Esse tipo de lanche consiste em um pão, que recebe o nome do lanche, salsicha e molho preparado com salsinha, além de diversos condimentos opcionais. O pão de cachorro-quente ou “hot dog” tem formato alongado, diferentes tamanhos (pequeno, médio e grande) e, em alguns casos, é confundido com o pão de leite na sua composição, pois compartilham dos ingredientes essenciais farinha de trigo, ovos, fermento, açúcar e leite<sup>4</sup>. Com exceção do pão francês, o pão de cachorro quente é um dos principais panificados no Brasil e ocupa o 5º lugar em menção dos consumidores, ficando atrás apenas do pão doce, hambúrguer, pão de queijo e de leite<sup>2</sup>.

Nas regiões da Campanha e Fronteira Oeste

do Rio Grande do Sul a denominação “bolacha” não representa apenas um tipo de biscoito, mas também é utilizada para um tipo de pão em forma de “V”, de cor semelhante ao pão francês, com textura mais macia e crosta menos crocante. Embora sem dados da literatura, esse tipo de pão é reconhecido e consumido em diversas cidades gaúchas das referidas regiões em quantidades equivalentes ao pão francês, inclusive como primeira escolha de muitos consumidores.

O pão de cachorro quente e, especialmente, o pão bolacha carecem de informações científicas sobre suas características físico-químicas, o que dificulta a elaboração de planos alimentares por nutricionistas, que têm dúvidas principalmente quanto à equivalência em peso e quanto aos nutrientes presentes nas porções unitárias de diferentes tipos de pães. Além disso, a possibilidade dos mesmos tipos de pães panificados por diferentes estabelecimentos também diferirem quanto às suas características físico-químicas representa mais uma dificuldade na elaboração de planos alimentares.

Nesse contexto, o trabalho se propôs a avaliar características físico-químicas de três tipos de pães habitualmente consumidos na região da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul e comercializados em padarias da cidade de Itaqui/RS.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras

Foram coletadas cinco unidades dos tipos de pães francês, bolacha e de cachorro-quente (**Figura**) comercializados em cinco padarias da cidade de Itaqui/RS. Os estabelecimentos foram escolhidos por conveniência, a partir da aceitação dos responsáveis pelo estabelecimento através de um termo de autorização. Previamente à assinatura do termo de autorização, os responsáveis pelos estabelecimentos foram esclarecidos dos objetivos do trabalho e receberam um termo de confidencialidade, como garantia de anonimato do estabelecimento e do retorno dos resultados. As amostras, acondicionadas em sacos plásticos fornecidos pelos próprios estabelecimentos, foram imediatamente encaminhadas ao Laboratório de Processamento de Alimentos da Unipampa.



**Figura.** Aspecto visual de alguns dos pães avaliados (Itaqui/RS, 2016)  
Legenda: A (pão francês da padaria 1), B (pão bolacha da padaria 5) e C (pão de cachorro quente da padaria 2)

### Análises físicas

Os pesos unitários dos pães foram verificados em balança semianalítica (Shimadzu, UX4200H) e os volumes determinados pelo método de deslocamento de sementes de painço<sup>5</sup>. A partir dos dados de peso e volume, a densidade (peso/volume) e o volume específico (volume/peso) dos pães foram calculados.

### Análises químicas

As análises foram precedidas da pré-secagem dos pães em estufa com circulação de ar forçado a 55 °C/24 horas (SL 102/480, Solab) e moagem em micromoinho (A11, IKA). Foram determinados os teores de umidade, cinzas, proteína bruta e fibra alimentar total conforme os métodos analíticos propostos pela Association of Official Analytical Chemists<sup>6</sup>. O teor de lipídeos foi quantificado a partir do método de Bligh e Dyer<sup>7</sup>. A quantidade de carboidratos foi estimada pela diferença de 100 menos os componentes citados anteriormente e o valor calórico foi calculado de acordo com a Resolução RDC n° 360 do Ministério da Saúde<sup>8</sup> considerando os fatores de conversão de 4 kcal.g<sup>-1</sup> para carboidratos e proteínas, e de 9 kcal.g<sup>-1</sup> para lipídeos.

### Análise dos resultados

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado. Através do programa Statistica, versão 8.0, os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5 % de significância entre diferentes tipos de pães e estabelecimentos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a **Tabela 1**, variáveis relacionadas às características físicas dos pães, tais como peso, volume, densidade e volume específico, diferiram significativamente.

A média de peso das amostras de pão francês ficou em 61,09 g, com valores variando de 45,84 a 74,49 g; já a média do pão bolacha foi de 116,11 g, variando de 95,41 a 137,38 g; enquanto que o pão de cachorro-quente teve média 63,38 g e uma variação de peso menor que os demais tipos de pães, com valor significativamente mais baixo na amostra da padaria 2, média de 51,75 g. As diferenças de peso não são economicamente relevantes para os pães francês e bolacha, pois são comercializados apenas por peso conforme determina a Portaria n° 146 do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial<sup>9</sup>. No entanto, preocupa a variação de peso no pão de cachorro quente que é, na maioria dos casos, comercializado em pacotes fechados e por unidade.

As amostras dos pães de diferentes padarias variaram significativamente, mas não se constatou a ocorrência de volumes maiores ou menores para os produtos de um mesmo estabelecimento. O volume dos pães também não teve uma relação direta com o peso, mas a média do pão bolacha foi significativamente superior, seguido do francês e, por último, do cachorro quente, com valores médios de 558,0; 467,2 e 343,6 mL, respectivamente. As diferenças de volume dos pães podem ser atribuídas a diversos fatores, que incluem o tipo

**Tabela 1.** Características físicas de diferentes tipos de pães comercializados em padarias do município de Itaqui (Itaqui/RS, 2016)

	Padaria	Pão		
		Francês	Bolacha	Cachorro quente
Peso (g)	1	74,47 ± 6,02 <sup>a</sup>	137,38 ± 18,35 <sup>a</sup>	64,04 ± 6,84 <sup>a</sup>
	2	50,82 ± 3,91 <sup>c</sup>	106,94 ± 11,09 <sup>bc</sup>	51,75 ± 6,38 <sup>b</sup>
	3	70,95 ± 2,52 <sup>a</sup>	95,41 ± 6,01 <sup>c</sup>	63,55 ± 3,81 <sup>a</sup>
	4	63,86 ± 1,64 <sup>b</sup>	128,04 ± 11,93 <sup>ab</sup>	72,98 ± 3,84 <sup>a</sup>
	5	45,34 ± 1,35 <sup>c</sup>	112,77 ± 4,91 <sup>bc</sup>	67,57 ± 4,41 <sup>a</sup>
	Médias	61,09 ± 11,97 <sup>B</sup>	116,11 ± 18,53 <sup>A</sup>	63,98 ± 8,57 <sup>B</sup>
Volume (mL)	1	450,00 ± 15,81 <sup>bc</sup>	600,00 ± 27,39 <sup>b</sup>	396,00 ± 30,50 <sup>b</sup>
	2	412,00 ± 42,07 <sup>c</sup>	632,00 ± 39,62 <sup>ab</sup>	270,00 ± 15,81 <sup>d</sup>
	3	588,00 ± 16,43 <sup>a</sup>	500,00 ± 20,00 <sup>c</sup>	316,00 ± 8,94 <sup>c</sup>
	4	464,00 ± 11,40 <sup>b</sup>	684,00 ± 27,02 <sup>a</sup>	444,00 ± 11,40 <sup>a</sup>
	5	422,00 ± 16,43 <sup>bc</sup>	524,00 ± 27,02 <sup>c</sup>	292,00 ± 22,80 <sup>cd</sup>
	Médias	467,20 ± 67,92 <sup>B</sup>	558,00 ± 74,27 <sup>A</sup>	343,60 ± 69,51 <sup>C</sup>
Densidade (g.mL <sup>-1</sup> )	1	0,16 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,23 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,16 ± 0,01 <sup>b</sup>
	2	0,12 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,17 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,19 ± 0,03 <sup>ab</sup>
	3	0,12 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,19 ± 0,01 <sup>bc</sup>	0,20 ± 0,02 <sup>ab</sup>
	4	0,14 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,19 ± 0,02 <sup>bc</sup>	0,16 ± 0,01 <sup>b</sup>
	5	0,11 ± 0,01 <sup>d</sup>	0,22 ± 0,02 <sup>ab</sup>	0,23 ± 0,03 <sup>a</sup>
	Médias	0,13 ± 0,02 <sup>B</sup>	0,20 ± 0,03 <sup>A</sup>	0,19 ± 0,03 <sup>A</sup>
Volume específico (mL.g <sup>-1</sup> )	1	6,07 ± 0,41 <sup>d</sup>	4,41 ± 0,41 <sup>c</sup>	6,21 ± 0,37 <sup>a</sup>
	2	8,10 ± 0,40 <sup>b</sup>	5,97 ± 0,82 <sup>a</sup>	5,32 ± 1,04 <sup>abc</sup>
	3	8,30 ± 0,49 <sup>b</sup>	5,25 ± 0,29 <sup>abc</sup>	4,99 ± 0,43 <sup>bc</sup>
	4	7,27 ± 0,33 <sup>c</sup>	5,37 ± 0,48 <sup>ab</sup>	6,10 ± 0,42 <sup>ab</sup>
	5	9,31 ± 0,21 <sup>a</sup>	4,66 ± 0,35 <sup>bc</sup>	4,34 ± 0,50 <sup>c</sup>
	Médias	7,81 ± 1,16 <sup>A</sup>	5,13 ± 0,73 <sup>B</sup>	5,39 ± 0,90 <sup>B</sup>

Valores expressos como média ± desvio padrão seguidos por letras que indicam diferença estatística significativa em nível de 5% pelo teste de Tukey; letras minúsculas representam diferenças estatísticas entre as médias das colunas e maiúsculas das linhas

e a proporção dos seus ingredientes/componentes, bem como variações nos métodos de processamento.

Nos valores de densidade e volume específico, obtidos a partir dos valores de peso e volume, observou-se um comportamento oposto, como por exemplo o pão francês, que teve menor densidade e maior volume específico do que os demais pães. As médias dos pães bolacha e de cachorro-quente não diferiram entre si nessas variáveis. O volume específico é a variável mais utilizada na avaliação física de pães, inclusive há um intervalo, de 5 a 8 mL.g<sup>-1</sup>, considerado adequado para o pão francês<sup>10</sup>. Nota-se que as amostras de pão francês das padarias 2, 3 e 5 superaram o valor

máximo descrito. Outra abordagem foi descrita por Feitosa et al. (2013)<sup>11</sup>, que compararam diferentes trabalhos e constataram que um volume específico superior a 5 mL.g<sup>-1</sup> é indicativo do uso de melhorador em pão francês. Com base nessa constatação, pressupõe-se que todas as padarias do estudo fizeram o uso de melhoradores de massa.

A composição química dos pães é demonstrada na **Tabela 2**, com resultados dos teores de umidade, cinzas, lipídeos, proteínas, fibra alimentar, carboidratos digeríveis e valor calórico.

A umidade variou entre as amostras de diferentes estabelecimentos e entre os tipos de pães. Os pães da padaria 2 apresentaram valores de umidade significativamente inferiores aos demais

**Tabela 2.** Composição química de diferentes tipos de pães comercializados em padarias do município de Itaqui (Itaqui/RS, 2016)

Componente	Padaria	Pão		
		Francês	Bolacha	Cachorro quente
Umidade (%)	1	31,65 ± 0,02 <sup>a</sup>	30,11 ± 0,24 <sup>a</sup>	32,91 ± 0,12 <sup>bc</sup>
	2	25,54 ± 0,15 <sup>e</sup>	22,80 ± 0,05 <sup>e</sup>	26,28 ± 0,05 <sup>d</sup>
	3	29,45 ± 0,08 <sup>c</sup>	23,87 ± 0,33 <sup>d</sup>	32,48 ± 0,05 <sup>c</sup>
	4	29,97 ± 0,13 <sup>b</sup>	26,67 ± 0,04 <sup>c</sup>	33,87 ± 0,04 <sup>a</sup>
	5	27,34 ± 0,13 <sup>d</sup>	27,78 ± 0,72 <sup>b</sup>	33,40 ± 0,40 <sup>ab</sup>
	Médias	28,79 ± 2,21 <sup>B</sup>	26,25 ± 2,75 <sup>C</sup>	31,79 ± 2,90 <sup>A</sup>
Cinzas (%)	1	1,91 ± 0,06 <sup>a</sup>	1,92 ± 0,15 <sup>a</sup>	1,59 ± 0,06 <sup>b</sup>
	2	1,62 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,26 ± 0,04 <sup>b</sup>	1,16 ± 0,03 <sup>c</sup>
	3	1,98 ± 0,11 <sup>a</sup>	2,04 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,76 ± 0,14 <sup>ab</sup>
	4	1,40 ± 0,01 <sup>c</sup>	1,97 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,28 ± 0,06 <sup>c</sup>
	5	1,78 ± 0,12 <sup>ab</sup>	1,88 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,86 ± 0,06 <sup>a</sup>
	Médias	1,74 ± 0,22 <sup>AB</sup>	1,81 ± 0,30 <sup>A</sup>	1,53 ± 0,29 <sup>B</sup>
Lipídeos (%)	1	1,40 ± 0,09 <sup>b</sup>	2,10 ± 0,17 <sup>bc</sup>	1,26 ± 0,02 <sup>b</sup>
	2	1,50 ± 0,09 <sup>b</sup>	5,29 ± 0,54 <sup>a</sup>	5,04 ± 0,42 <sup>a</sup>
	3	1,11 ± 0,02 <sup>c</sup>	2,48 ± 0,17 <sup>b</sup>	1,17 ± 0,08 <sup>b</sup>
	4	1,93 ± 0,10 <sup>a</sup>	1,83 ± 0,15 <sup>bc</sup>	1,43 ± 0,03 <sup>b</sup>
	5	1,45 ± 0,02 <sup>b</sup>	1,64 ± 0,05 <sup>c</sup>	1,38 ± 0,19 <sup>b</sup>
	Médias	1,48 ± 0,28 <sup>B</sup>	2,67 ± 1,41 <sup>A</sup>	2,06 ± 1,56 <sup>AB</sup>
Proteínas (%)	1	9,04 ± 0,09 <sup>a</sup>	9,46 ± 0,69 <sup>a</sup>	8,32 ± 0,17 <sup>a</sup>
	2	9,90 ± 0,52 <sup>a</sup>	9,29 ± 0,22 <sup>a</sup>	8,56 ± 0,21 <sup>a</sup>
	3	9,46 ± 0,23 <sup>a</sup>	9,31 ± 0,58 <sup>a</sup>	8,36 ± 0,23 <sup>a</sup>
	4	9,31 ± 0,26 <sup>a</sup>	9,45 ± 0,45 <sup>a</sup>	8,42 ± 0,32 <sup>a</sup>
	5	9,76 ± 0,67 <sup>a</sup>	8,77 ± 0,29 <sup>a</sup>	8,13 ± 0,48 <sup>a</sup>
	Médias	9,50 ± 0,47 <sup>A</sup>	9,25 ± 0,48 <sup>A</sup>	8,36 ± 0,29 <sup>B</sup>
Fibra alimentar (%)	1	2,91 ± 0,31 <sup>b</sup>	1,47 ± 0,25 <sup>b</sup>	2,67 ± 0,19 <sup>b</sup>
	2	3,10 ± 0,19 <sup>b</sup>	2,98 ± 0,38 <sup>a</sup>	1,35 ± 0,06 <sup>c</sup>
	3	1,20 ± 0,02 <sup>c</sup>	2,61 ± 0,15 <sup>a</sup>	2,63 ± 0,19 <sup>b</sup>
	4	2,76 ± 0,17 <sup>b</sup>	2,77 ± 0,21 <sup>a</sup>	3,92 ± 0,21 <sup>a</sup>
	5	5,02 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,20 ± 0,05 <sup>a</sup>	2,63 ± 0,21 <sup>b</sup>
	Médias	3,00 ± 1,27 <sup>A</sup>	2,61 ± 0,65 <sup>A</sup>	2,64 ± 0,86 <sup>A</sup>
Carboidratos* (%)	1	53,08 ± 0,51 <sup>d</sup>	54,92 ± 0,36 <sup>c</sup>	53,24 ± 0,31 <sup>b</sup>
	2	58,34 ± 0,69 <sup>a</sup>	58,37 ± 0,49 <sup>ab</sup>	57,61 ± 0,34 <sup>a</sup>
	3	56,80 ± 0,36 <sup>b</sup>	59,69 ± 0,91 <sup>a</sup>	53,58 ± 0,25 <sup>b</sup>
	4	54,62 ± 0,21 <sup>c</sup>	57,32 ± 0,37 <sup>b</sup>	51,08 ± 0,41 <sup>c</sup>
	5	54,64 ± 0,77 <sup>c</sup>	56,73 ± 0,98 <sup>bc</sup>	52,59 ± 0,91 <sup>b</sup>
	Médias	55,50 ± 1,97 <sup>B</sup>	57,40 ± 1,75 <sup>A</sup>	53,62 ± 2,29 <sup>C</sup>
Valor calórico (kcal.100 g <sup>-1</sup> )	1	261,08 ± 1,24 <sup>d</sup>	276,45 ± 2,08 <sup>d</sup>	257,60 ± 0,60 <sup>b</sup>
	2	286,46 ± 1,66 <sup>a</sup>	318,27 ± 3,90 <sup>a</sup>	310,05 ± 1,74 <sup>a</sup>
	3	275,07 ± 0,44 <sup>b</sup>	298,29 ± 2,69 <sup>b</sup>	258,29 ± 1,11 <sup>b</sup>
	4	273,11 ± 0,91 <sup>bc</sup>	283,56 ± 0,35 <sup>c</sup>	250,86 ± 0,98 <sup>c</sup>
	5	270,71 ± 0,29 <sup>c</sup>	276,76 ± 2,83 <sup>cd</sup>	255,34 ± 2,84 <sup>b</sup>
	Médias	273,28 ± 8,49 <sup>B</sup>	290,67 ± 16,62 <sup>A</sup>	266,43 ± 22,78 <sup>B</sup>

Valores expressos como média ± desvio padrão seguidos por letras que indicam diferença estatística significativa em nível de 5 % pelo teste de Tukey; letras minúsculas representam diferenças estatísticas entre as médias das colunas e maiúsculas das linhas

\*Carboidratos estimados por diferença

estabelecimentos, enquanto a média dos pães de cachorro quente apresentou umidade superior aos demais tipos de pães, seguido do pão francês e do pão bolacha, o que sugere a presença de ingredientes com maior capacidade de retenção de água na massa do pão de cachorro quente, tais como açúcares higroscópicos. Segundo a resolução RDC nº 90, de 18 de outubro de 2000, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)<sup>3</sup>, a umidade máxima para pães preparados exclusivamente com farinha de trigo comum e ou farinha de trigo especial (sêmola/semolina de trigo) é de 38 %. Portanto, com valores de umidade variando de 26,25 a 31,79 %, todas as amostras avaliadas estavam adequadas à legislação.

Os teores de cinzas variaram de 1,16 a 2,04 %, com diferenças significativas entre as amostras de diferentes padarias e tipos de pães. Destaca-se o maior teor de cinzas no pão bolacha e menor no pão de cachorro quente, sendo que ambos não diferiram do pão francês. A Tabela Brasileira de Composição dos Alimentos (TACO)<sup>12</sup> descreve apenas o teor de cinzas 1,8 % para o pão francês, equivalente aos valores encontrados nesse estudo. O ingrediente majoritário do pão, a farinha, tem valores máximos de cinzas estabelecimentos na Resolução – CNNPA nº 12, de 24 de julho de 1978, que determina o limite de 0,85 % para a farinha comum<sup>13</sup>. Como os valores encontrados nos pães foram superiores, pressupõe-se que o incremento no conteúdo de minerais é decorrente da utilização do cloreto de sódio como ingrediente, fato reforçado pelo sódio, presente na concentração de apenas 1 mg % na farinha de trigo, ser o mineral de maior ocorrência no pão francês, cerca de 650 mg %<sup>12</sup>.

Quanto ao teor lipídico, constataram-se diferenças entre os pães de diferentes padarias e tipos de pães. Entre as amostras, os pães bolacha e de cachorro-quente da padaria 2 apresentaram teores de lipídeos significativamente superiores às amostras das demais padarias, com médias de 5,29 e 5,04 %, respectivamente. Tais valores provavelmente influenciaram na média dos tipos de pães, que acarretou na média superior para teor de lipídeos nos pães bolacha e cachorro quente. Em valores absolutos, as médias de lipídeos das amostras de pão francês diferiram menos que os demais, com média em 1,48 %, inferior a 3,1 %

descrito na TACO<sup>12</sup>.

Os teores proteicos não diferiram significativamente para as amostras de diferentes padarias, apenas se verificou menor teor de proteínas na média do pão de cachorro quente em relação aos demais tipos de pães. Esse resultado pode ser decorrente do maior teor de umidade no pão de cachorro quente. No entanto, as médias dos teores proteicos de todas as amostras avaliadas foram superiores ao valor de 8,0 % descrito para o pão francês na TACO<sup>12</sup>.

Os resultados da avaliação de fibra alimentar demonstram que as variações nesse componente estão mais relacionadas aos ingredientes e processamento dos pães, já que foram observadas diferenças significativas apenas nas médias dos pães de diferentes padarias, enquanto que os teores de fibra alimentar dos tipos de pães não diferiram. Dos valores encontrados, destaca-se positivamente o teor de 5,02 % no pão francês da padaria 5; enquanto que baixos teores de fibra alimentar foram encontrados no pão francês da padaria 3 (1,2 %), no pão bolacha da padaria 1 (1,47 %) e no pão de cachorro quente da padaria 2 (1,35 %). A presença de fibra alimentar nos alimentos em geral é de grande interesse para a saúde, com diversos estudos que comprovam o papel desse nutriente na prevenção de enfermidades, tais como diverticulite, câncer de cólon, obesidade, problemas cardiovasculares e diabetes<sup>10</sup>.

Quanto aos valores de teor de carboidratos digeríveis, entre as amostras, destacam-se os pães da padaria 2, que apresentaram valores significativamente superiores, mas tal constatação provavelmente se deve aos menores teores de umidade dos pães desse estabelecimento. Os pães da padaria 2 também se destacaram pelos maiores valores calóricos que, além dos menores teores de umidade, provavelmente está relacionado aos maiores teores de lipídeos, principalmente nos pães bolacha e de cachorro quente. Pelas médias de cada tipo de pão, verifica-se maior teor de carboidratos digeríveis e maior valor calórico no pão bolacha, enquanto que o pães francês e de cachorro-quente tiveram valor calórico equivalente. Em relação aos valores descritos na literatura<sup>12</sup> para o pão francês, 56,3 % de carboidratos digeríveis e 300 kcal.100 g<sup>-1</sup>, os valores encontrados

foram equivalentes.

Retomando os resultados dos pesos médios das unidades de pães descritos na **Tabela 1** e com base nas composições químicas apresentadas na **Tabela 2**, estima-se que a unidade do pão francês apresenta 1,06 g de cinzas, 5,80 g de proteínas, 33,90 g de carboidratos digeríveis e 166,95 kcal; a unidade do pão de cachorro quente tem 0,98 g de cinzas, 5,35 g de proteínas, 34,31 g de carboidratos digeríveis e 170,46 kcal; enquanto que a unidade do pão bolacha compreende 2,10 g de cinzas, 10,74 g de proteínas, 66,65 g de carboidratos digeríveis e 337,50 kcal. Ou seja, de maneira geral, a unidade do pão bolacha equivale ao dobro das unidades de pão francês e de cachorro quente quanto ao valor calórico e aos componentes supracitados.

Os planos alimentares para pessoas com diabetes mellitus baseiam-se nas diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD)<sup>14</sup>, que descreve a contagem de carboidratos como uma importante ferramenta no tratamento do diabetes quando inserida no contexto de uma alimentação saudável. Esses pacientes têm prescrição de maior fracionamento das refeições, ingestão diária de carboidratos em até 60 % do requerimento energético total e utilização de porções de alimentos com 15 g de carboidratos, que corresponde à quantidade de carboidrato metabolizada por uma unidade de insulina rápida ou ultra-rápida em adultos<sup>12</sup>. Com base nos valores descritos nas **Tabelas 1 e 2**, as porções de pães com 15 g de carboidratos equivalem à cerca da metade do pão francês e de cachorro quente, e um quarto do pão bolacha.

Para os demais pacientes, as recomendações podem ser baseadas no Guia Alimentar para a População Brasileira<sup>15</sup>, que descreve o valor energético de 150 kcal para porções de cereais, tubérculos, raízes e derivados. O número de porções diárias depende das necessidades nutricionais de cada indivíduo e do valor energético total estabelecido no plano alimentar, o que oferece maior flexibilidade na escolha de alimentos e facilita a contabilização das calorias pelo próprio paciente<sup>13</sup>. Nesse caso, conforme dados das **Tabelas 1 e 2**, a porção de 150 kcal é suprida com aproximadamente 90 % da unidade do pão francês e de cachorro-quente, e 45 % do pão bolacha.

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem concluir que diferentes tipos de pães e os mesmos tipos de pães panificados por diferentes estabelecimentos diferem nas suas características físico-químicas. Tal constatação reforça a necessidade desses fatores serem considerados na elaboração de planos alimentares quando o pão francês for substituído por outros tipos de pães.

## REFERÊNCIAS

1. Associação Brasileira das Indústrias de Panificação e Confeitaria - ABIP. A importância do Pão do Dia (Tipo Francês) para o segmento da Panificação no Brasil. Encarte Técnico, 2009. [acesso 2016 Jun 04]. Disponível em: [[http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS\\_CHRONUS/bds/bds.nsf/4AC5C034FC7F782E832576330053107A/%24File/NT0004207E.pdf](http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/4AC5C034FC7F782E832576330053107A/%24File/NT0004207E.pdf)].
2. Associação Brasileira das Indústrias de Panificação e Confeitaria - ABIP. Estudo de Tendências. Perspectivas para a Panificação e Confeitaria. Encarte Técnico, 2009. [acesso 2016 Jun 04]. Disponível em: [[http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS\\_CHRONUS/bds/bds.nsf/4C9FE331FB9D9A73832576AC00662E6A/%24File/NT0004307E.pdf](http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/4C9FE331FB9D9A73832576AC00662E6A/%24File/NT0004307E.pdf)].
3. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 90, de 18 de outubro de 2000. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de pão. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 20 out. 2000. Seção 1, nº203-E. p.29.
4. Silva AJP, Silva VA, Garcia VS, Motta MEV, Pacheco MTM, Camargo ME, et al. Análise do custo de produção e comercialização de cachorro-quente e bebidas: Uma visão para o retorno ao mercado. *Qualitas*. 2011;12(2):1-14.
5. Capriles VD, Arêas JAG. Effects of prebiotic inulin-type fructans on structure, quality, sensory acceptance and glycemic response of gluten-free breads. *Food Funct*. 2013;4(1):104-10. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/c2fo10283h>].
6. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). *Official Methods of Analysis*. 17th ed. Gaithersburg: AOAC; 2000.



7. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid. Extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. 1959;37(8):911-7. DOI: [<http://dx.doi.org/10.1139/o59-099>].
8. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). 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] Republica Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 26 dez. 2003. Seção 1, nº251. p.33-34.
9. Brasil. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). Portaria Inmetro nº 146, de 20 de junho de 2006. Dispõe sobre comercialização do pão francês por peso. *Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 22 jun. 2006. Seção 1, nº118. p.88.
10. Ferreira SMR, Oliveira PV, Pretto D. Parâmetros de qualidade do pão francês. *B CEPPA*. 2001;19(2):301-18. [DOI: <http://dx.doi.org/10.5380/cep.v19i2.1240>].
11. Feitosa LRDF, Maciel JF, Barreto TA, Moreira RT. Avaliação de qualidade do pão francês por métodos instrumentais e sensoriais. *Semin Cienc Agrar*. 2013;34(2):693-704. [DOI: <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2013v34n2p693>].
12. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - TACO. 4ª ed. Campinas (SP): NEPA-Unicamp; 2011.
13. Brasil. Secretaria de Vigilância Sanitária – Ministério da Saúde. Resolução – CNNPA nº12 de 1978. Aprova as seguintes normas técnicas especiais, do Estado de São Paulo, revista pela CNNPA relativo a alimentos (e bebidas) para efeito de todo o território brasileiro. *Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 24 jul. 1978. Seção 1 – parte I. Disponível em: [[http://www.anvisa.gov.br/anvisa legis/resol/12\\_78.pdf](http://www.anvisa.gov.br/anvisa legis/resol/12_78.pdf)].
14. Sociedade Brasileira de Diabetes - SBD. Manual Oficial de Contagem de Carboidratos para as Pessoas com Diabetes. 3ª ed. Rio de Janeiro (RJ): Departamento de Nutrição da Sociedade Brasileira de Diabetes; 2009.
15. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia alimentar para a população brasileira: promovendo a alimentação saudável. Brasília (DF): Editora MS; 2008.



# Avaliação higiênico-sanitária de estabelecimentos comerciais e análise de micro-organismos indicadores em amostras de carne bovina (coxão mole) *in natura* comercializadas em mercados públicos

## Sanitary inspection of commercial establishments and analysis of the microorganism indicators in the bovine pad topside meat samples sold in public markets

RIALA6/1709

Josyane Brasil da SILVA<sup>1</sup>, Alan Reis dos PRAZERES<sup>2</sup>, Andrey Carlos do Sacramento de OLIVEIRA<sup>1</sup>, Vanderson Vasconcelos DANTAS<sup>3</sup>, Marçal Cavalcanti de Souza BARROS<sup>1</sup>, Flávio da SILVA<sup>1</sup>, Isis ABEL<sup>4</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, Instituto de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Pará (UFPA), Campus Castanhal. BR 316, Km 62, Bairro Saudade, Castanhal, PA, Brasil, CEP: 68740-970. Tel: 91 3711 4723. E-mail: carinamoraes@ufpa.br

<sup>2</sup>Curso de Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Naturais e Tecnologia, Universidade do Estado do Pará (UEPA)

<sup>3</sup>Laboratório de Produtos de Origem Animal (LAPOA), Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA), Universidade Federal do Pará (UFPA), Campus Belém

<sup>4</sup>Laboratório de Epidemiologia e Georeferenciamento (EpiGeo), Instituto de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Pará (UFPA), Campus Castanhal

Recebido: 28.03.2016 - Aceito para publicação: 12.10.2016

### RESUMO

O objetivo deste estudo foi analisar as condições higiênicas-sanitárias dos mercados públicos dos municípios da microrregião de Cametá, estado do Pará, e avaliar as características microbiológicas das carnes comercializadas nestes locais por meio da pesquisa de micro-organismos indicadores. Sessenta e quatro amostras de carne bovina *in natura* foram coletadas e analisadas por meio da determinação do Número Mais Provável de coliformes a 35 °C e 45 °C e contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, de acordo com a Instrução Normativa nº 62 de 2003 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Paralelamente, as condições higiênico-sanitárias foram avaliadas aplicando-se *checklist*. Os resultados obtidos evidenciaram que todos os locais avaliados apresentaram condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, sendo classificados como deficientes. As amostras apresentaram Número Mais Provável de coliformes a 35 °C e 45 °C que variaram de 64 NMP/g a >1100NMP/g, e contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva entre  $1,8 \times 10^2$  UFC/g e  $2,3 \times 10^5$  UFC/g. Os estabelecimentos avaliados não atenderam às exigências mínimas de higiene e sanidade, e a carne comercializada apresentou elevada contagem de micro-organismos indicadores.

**Palavras-chave.** coliformes, *Staphylococcus* coagulase positiva, condições higiênicas-sanitárias, carne bovina.

### ABSTRACT

The aim of this study was to analyze the sanitary conditions of public markets located in the Cametá micro-region, state of Pará, and to assess the microbiological condition of the meat sold in these locations through the determination of microorganism indicators. For this purpose, 64 fresh beef samples were collected and the determination of the Most Probable Number of coliforms at 35 °C and 45 °C and coagulase positive *Staphylococcus* counts were performed, according to the Instruction nº 62, 2003 of the Ministry of Agriculture Livestock and Supply. In addition, the hygienic and sanitary conditions of the public markets were evaluated by applying a checklist. The found results showed that all of the evaluated public markets indicated poor hygienic sanitary condition, and they were ranked as deficient. The samples showed the Most Probable Number of coliforms at 35 °C and 45 °C ranging from 64 MPN/g to >1100NMP/g, and coagulase positive *Staphylococcus* counts between  $1.8 \times 10^2$  CFU/g and  $2.3 \times 10^5$  CFU/g. The evaluated food markets did not meet the minimum requirements of hygiene and sanitation and the sold meat samples showed high count of microorganisms indicators.

**Keywords.** coliforms, coagulase positive *Staphylococcus*, Sanitary condition, beef.

## INTRODUÇÃO

Na região norte do Brasil, as feiras e mercados municipais são frequentemente os centros comerciais mais utilizados pela população para a compra de produtos alimentícios e estes locais destacam-se por suas características peculiares na comercialização de carne bovina. Almeida et al<sup>1</sup> definem as feiras livres como os locais responsáveis pelo desenvolvimento da atividade de subsistência de muitas famílias das pequenas cidades interioranas, além de serem responsáveis pelo desenvolvimento local e principal fonte de alimento para a população. No entanto, as condições higiênicas e sanitárias destes locais são precárias e caracterizam um risco à saúde pública, contrariando a legislação sanitária vigente no país.

Para a verificação das condições de higiene e sanidade de um local ou estabelecimento, roteiros de inspeção podem ser empregados como instrumento de fiscalização, sendo a lista de verificação (*checklist*) o método mais utilizado. A grande utilização dessa técnica se dá por sua rapidez, praticidade, por apresentar um baixo custo e alto benefício. Porém, para complementar a avaliação dos estabelecimentos, faz-se necessário o uso de testes microbiológicos no produto analisado.

Na atualidade, no Brasil, somente a ausência de bactérias do gênero *Salmonella* spp. para carne bovina *in natura* é exigida. No entanto, Lundgren et al<sup>2</sup> ressaltaram a falta de um padrão mais completo, que designe a qualidade microbiológica deste alimento. Embora não existam padrões para as contagens de micro-organismos indicadores como os coliformes e *Staphylococcus* coagulase positiva, a detecção destes agentes reforça os estudos sobre a avaliação das condições higiênicas, pois números elevados indicam insalubridade do alimento. Com base no exposto, o objetivo do presente estudo foi analisar as condições higiênico-sanitárias dos mercados públicos dos municípios da microrregião de Cametá, estado do Pará, e avaliar a microbiota da carne comercializada nestes locais, através da determinação de micro-organismos indicadores do grupo coliformes e da contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização do presente trabalho, amostras de 500 g de carne bovina *in natura* (coxão mole) foram coletadas em diferentes estabelecimentos comerciais dos mercados públicos dos municípios da microrregião Cametá, Pará. Para tal, foram considerados 6 (seis) mercados públicos da região e o tamanho da amostra foi calculado utilizando-se a ferramenta Statcalc do Software EpiInfo 7.1.4, considerando frequência esperada de 50 %, erro  $\beta$  de 20 % e erro  $\alpha = 0,01$ , o que levou a um total de 64 amostras a serem coletadas (12 no município de Abaetetuba, 20 em Cametá, 6 em Igarapé-Miri, 6 em Limoeiro do Ajuru, 8 em Oeiras do Pará e 12 em Mocajuba), sendo realizada amostragem estratificada proporcional, considerando cada município como um estrato.

Após coleta, as amostras foram transportadas e mantidas em caixas isotérmicas até a realização da determinação do Número Mais Provável de Coliformes a 35 °C e 45 °C e a contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, que foram realizadas segundo a Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento<sup>3</sup>.

Para a análise estatística dos dados, os resultados microbiológicos foram submetidos à análise descritiva e ao Teste de Kruskal-Wallis, onde foi realizado o teste de comparação múltipla, executados através do software SPSS v.20, de acordo com a metodologia previamente descrita por Guimarães<sup>4</sup>.

Paralelamente a coleta de amostras, foi aplicada uma lista de verificação (*checklist*) nos boxes dos mercados municipais onde as carnes foram coletadas, visando à avaliação das condições higiênico-sanitárias. O *checklist* foi confeccionado com base na Resolução de Diretoria Colegiada nº 275, de 21 de outubro de 2002, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária<sup>5</sup> e no Roteiro de inspeção de açougues e peixarias, anexo da Portaria nº 2619, de 06 de dezembro de 2011, da Prefeitura Municipal de São Paulo, sendo os estabelecimentos classificados, como: bom (estabelecimentos que atenderam de 75 a 100 % dos itens), regular (51 a 75 % de conformidade), e

deficiente (0 a 50 % de conformidade)<sup>6</sup>. A referida lista de verificação abordou aspectos relacionados à higienização das instalações, edificações e instalações, instalações sanitárias, áreas de produção, controle integrado de pragas, abastecimento de água, manejo de resíduos, recebimento/compra de matéria prima, armazenamento em câmara fria, uso de geladeira/freezer/balcão frigorífico, manipulação e manipuladores.

## RESULTADOS

Os resultados microbiológicos da determinação do Número Mais Provável de coliformes a 35 °C e 45 °C e *Staphylococcus* coagulase positiva estão apresentados na **Tabela 1**.

De acordo com a análise estatística descritiva para contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, o maior valor do  $P_{25}$  foi observado nas amostras do município de Cametá, onde 25 % dos resultados apresentaram valores inferiores a  $1,1 \times 10^3$  UFC/g. Os percentis  $P_{75}$  apresentaram diferença entre os grupos mediante análise comparativa, sendo o maior valor encontrado nas amostras do município de Oeiras do Pará, onde 75 % dos resultados apresentaram valores inferiores a  $1,9 \times 10^5$  UFC/g, e o menor valor observado nas amostras do município de Cametá, onde 75 % dos resultados apresentaram valores inferiores  $1,1 \times 10^4$  UFC/g. Esses resultados demonstram que os valores da contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva foram, em geral, menores nas amostras no município de Cametá e os maiores nas amostras do município de Oeiras do Pará.

O teste de Kruskal-Wallis demonstrou que não houve diferença significativa entre os municípios quanto à contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, resultando num  $p$ -valor = 0,098. No entanto, na Comparação Múltipla de grupos realizada pelo mesmo teste, o município de Oeiras do Pará apresentou um  $p$ -valor < 0,05, quando relacionados com Abaetetuba, Cametá e Igarapé-Miri, demonstrando que *Staphylococcus* coagulase positiva se manifesta em quantidades estatisticamente diferentes nesses locais.

As amostras de carne apresentaram Número Mais Provável de coliformes a 35 °C e 45 °C que variaram de 64 NMP/g a > 1100 NMP/g, sendo que 81,25 % e 62,5 % das amostras apresentaram contagens superiores a 1100 NMP/g, respectivamente.

Mediante aplicação do Teste de Kruskal-Wallis, não foi observada diferença estatística quanto à presença de coliformes a 35 °C entre os municípios estudados ( $p = 0,0850$ ). No entanto, na Comparação Múltipla de grupos, o município de Cametá quando relacionado aos municípios de Abaetetuba, Oeiras e Limoeiro, apresentou  $p$ -valor < 0,05, considerando assim que coliformes a 35 °C se manifestam em quantidades estatisticamente diferentes nesses locais. Já quanto à presença de coliformes a 45 °C, foi observado que há diferença estatística ( $p=0,006$ ) entre os municípios estudados. Na Comparação Múltipla de grupos os municípios, Oeiras do Pará relacionado a Igarapé-Miri, Limoeiro e Abaetetuba; Mocajuba relacionado à Limoeiro e Igarapé-Miri; e Abaetetuba com Oeiras do Pará, apresentaram  $p$ -valor < 0,05,

**Tabela 1.** População de coliformes a 35 °C e 45 °C e de *Staphylococcus* coagulase positiva, obtida em amostras de carne coletadas nos mercados públicos da microrregião de Cametá, PA

Município	n° de amostras	Coliformes a 35 °C (NMP/g)		Coliformes a 45 °C (NMP/g)		<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (UFC/g)	
		Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
Abaetetuba	12	>1100	>1100	240	>1100	$2,8 \times 10^2$	$7,8 \times 10^4$
Cametá	20	64	>1100	64	>1100	$1,8 \times 10^2$	$2,6 \times 10^4$
Igarapé-Miri	6	240	>1100	240	>1100	$2,5 \times 10^2$	$1,1 \times 10^4$
Limoeiro do Ajuru	6	>1100	>1100	1100	>1100	$2,3 \times 10^3$	$6,7 \times 10^4$
Mocajuba	12	150	>1100	93	>1100	$2,3 \times 10^2$	$7,8 \times 10^4$
Oeiras do Pará	8	>1100	>1100	>1100	>1100	$1,0 \times 10^3$	$2,3 \times 10^5$

considerando assim que o coliformes à 45 °C se manifestam em quantidades estatisticamente diferentes nesses locais.

A **Tabela 2** demonstra os resultados obtidos pela aplicação do *checklist*, de acordo com os itens avaliados por bloco, no qual se observa a percentagem individual por bloco dos itens atendidos, bem como a classificação do mercado público de acordo com o percentual de itens atendidos em cada mercado público.

No bloco que avaliou as edificações e instalações, os resultados obtidos demonstraram que o mercado do município Cametá atendeu 100 % dos itens avaliados, já o mercado de Abaetetuba atendeu somente 16,67 % dos itens. Destaca-se também o mercado público do município de Igarapé-Miri, com 83,33 % de atendimentos dos itens.

Na avaliação do bloco das condições de armazenamento em câmara fria, observou-se a ausência de local específico para armazenamento na maioria dos mercados avaliados. Apenas o mercado público do município de Mocajuba

atendeu 75 % dos itens avaliados para este bloco. Ainda, avaliando os métodos de conservação, no bloco que avaliou a refrigeração durante o armazenamento, por meio da utilização de geladeira e freezer, observou-se que somente os municípios de Cametá e Mocajuba apresentaram percentual satisfatório, de 50 % e 100 % de atendimento dos itens, respectivamente.

Os resultados da lista de verificação, referente ao bloco que avaliou as práticas de manipulação e avaliação do manipulador, demonstraram valores insatisfatórios em todos os municípios avaliados. Somente o município de Mocajuba obteve avaliação de 14,29 % de atendimento dos itens.

## DISCUSSÃO

Para Lundgren et al<sup>2</sup>, apesar da legislação brasileira para alimentos exigir somente a ausência de *Salmonella* spp. em 25g de amostra para carne *in natura*, não se pode descartar a importância de outros micro-organismos. Estes autores afirmam que a contagem de *Staphylococcus coagulase* positiva

**Tabela 2.** Percentual de itens atendidos (conformes) na avaliação por blocos, percentual de atendimento dos itens e classificação geral obtidos com a aplicação do *Checklist* referente às condições higiênico-sanitárias dos mercados públicos dos municípios que compõe a microrregião de Cametá, PA

Aspectos avaliados	Percentagem (%) de itens conformes observados nos Mercados Públicos analisados					
	Abaetetuba	Cametá	Igarapé-Miri	Limoeiro do Ajuru	Mocajuba	Oeiras do Pará
Edificações e Instalações	16,67	100,00	83,33	33,33	50,00	33,33
Instalações Sanitárias	20,00	40,00	20,00	20,00	20,00	20,00
Áreas de Produção	0,00	16,67	50,00	0,00	16,67	0,00
Higiene das Instalações	50,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Controle de Pragas	0,00	25,00	0,00	0,00	25,00	0,00
Abastecimento de Água	40,00	40,00	60,00	20,00	40,00	40,00
Manejo de resíduos	25,00	50,00	50,00	25,00	25,00	25,00
Recebimento e compra	0,00	0,00	0,00	0,00	60,00	0,00
Armazenamento	0,00	25,00	0,00	0,00	75,00	0,00
Geladeira e Freezer	0,00	50,00	0,00	0,00	100,00	0,00
Manipulador	0,00	0,00	0,00	0,00	14,29	0,00
<b>Percentual total de atendimento dos itens</b>	<b>10,53</b>	<b>28,07</b>	<b>24,56</b>	<b>8,77</b>	<b>33,33</b>	<b>10,53</b>
<b>Classificação Geral dos mercados públicos</b>	<b>Deficiente</b>	<b>Deficiente</b>	<b>Deficiente</b>	<b>Deficiente</b>	<b>Deficiente</b>	<b>Deficiente</b>

em alimentos é de suma importância e tem como finalidade relacionar este agente microbiano à saúde pública, para confirmar o seu envolvimento em surtos de intoxicação alimentar e para controlar a qualidade higiênico-sanitária nos processos de produção e manipulação de alimentos, servindo como indicador de contaminação.

Os resultados obtidos para *Staphylococcus* coagulase positiva nas amostras de carne *in natura* demonstraram valores que variaram entre  $1,8 \times 10^2$  UFC/g e  $2,3 \times 10^5$  UFC/g e que podem ser associados à ausência de práticas higiênicas durante a obtenção e manipulação da carne, fato que pode ser comprovado quando se observa os resultados da aplicação do *checklist*. As altas quantidades desse patógeno no alimento são reconhecidas com um risco potencial para a saúde pública dos consumidores da região em estudo. Para Costa e Silva<sup>7</sup>, contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva acima de  $10^5$  UFC/g são consideradas impróprias para o consumo humano.

Alcântara et al<sup>8</sup>, ao analisarem 90 amostras de carne *in natura* expostas ao consumo em supermercados e açougues, constataram em 93,34 % das amostras a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva, com contagens que variaram entre  $3,2 \times 10^5$  e  $1,8 \times 10^6$  UFC/g. Valores próximos foram encontrados nas amostras do mercado público de Oeiras do Pará, PA, onde o valor máximo encontrado foi de  $2,3 \times 10^5$  UFC/g.

A contaminação por *Staphylococcus* coagulase positiva evidenciada neste estudo associa-se com os elevados índices encontrados para coliformes nas amostras pesquisadas. Altos valores de coliformes estão diretamente relacionados às inadequadas práticas higiênico-sanitárias na obtenção da carne, fato que pode ser comprovado neste estudo quando se observa os resultados da avaliação higiênicossanitária e altas contagens bacterianas encontradas nas amostras.

Apesar da legislação brasileira não estabelecer limite para a contagem de micro-organismos do grupo coliformes para amostras de carne bovina *in natura*, Chairman<sup>9</sup> determina um padrão máximo de  $10^4$  UFC/g para carne moída bovina. Roberts et al<sup>10</sup> consideram que a qualidade microbiológica da carne triturada é reflexo de seu preparo e que as contagens de micro-organismos

neste produto é de 10 a 100 vezes maior do que o encontrado em cortes e carcaça e, por esta razão, no presente trabalho consideramos as amostras que apresentaram contagens acima de  $10^3$  NMP/g para coliformes inapropriadas do ponto de vista microbiológico.

Estas informações corroboram com os resultados expressos por outros autores, que relatam que a presença deste grupo microbiano influencia negativamente na qualidade da carne bovina. O estudo de Alcântara et al<sup>8</sup> demonstrou que, dentre as 90 amostras de carne *in natura* analisadas, 73,33 % continham micro-organismos indicadores do grupo dos coliformes a 35 °C e 45 °C. Já Lundgren et al<sup>2</sup>, quando avaliaram os aspectos sanitários da carne bovina comercializada em feiras livres e mercados públicos de João Pessoa, PB, verificaram presença de coliformes em 100 % das amostras.

Na pesquisa realizada Xavier e Joele<sup>11</sup>, os referidos autores obtiveram resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho, visto que detectaram coliformes fecais em todas as amostras de carne bovina *in natura* comercializadas em Belém, PA. Desta forma, mediante vários estudos que comprovam a presença de micro-organismos indicadores em carne *in natura* e seu risco à saúde pública, sugerimos que padrões para a avaliação da qualidade da carne necessitam atualização e que este grupo bacteriano deveria ser incluso como mais um aspecto a ser analisado.

Os dados alcançados por meio da lista de verificações demonstraram a dimensão das condições inadequadas de comercialização da carne nos municípios da microrregião de Cametá, visto que todos os municípios foram classificados como “deficientes”, pois atenderam menos de 50 % dos itens avaliados. Esta classificação é condizente com os resultados das análises microbiológicas realizadas nas amostras coletadas nesses estabelecimentos, que demonstraram elevado índice de contaminação por micro-organismos indicadores.

O fornecimento da matéria prima pode ter sido um dos pontos determinantes para os resultados aqui apresentados, já que os abatedouros municipais, que fornecem carne para grande parte

das feiras livre e mercados públicos são geridos pelo poder público local, não havendo fiscalização eficiente. Além disso, logo após o abate, os proprietários dos animais são responsáveis pela distribuição da carne obtida, que aumenta o risco de contaminação por meio da manipulação constante.

Nos resultados obtidos no estudo realizado na microrregião de Cametá, PA, a procedência da carne não foi confirmada em cinco dos seis municípios estudados. Apenas no município de Mocajuba, os quartos bovinos, apresentaram-se embalados, com etiquetas de procedência de abatedouro e selo de inspeção estadual. Lange<sup>12</sup>, destaca que no momento do recebimento pelos comerciantes, as carnes devem estar protegidas mediante uso de embalagens apropriadas e identificadas através de rótulos previamente aprovados pelos serviços de inspeção.

Diniz et al<sup>13</sup> enfatizam que, embora não haja legislação específica para a comercialização dos produtos cárneos em feiras livres, a venda vem sendo realizada inadequadamente. Destacam-se neste contexto a ausência de fiscalização sanitária durante a comercialização, o abate e comércio clandestino de carnes, as condições insalubres de transporte, conservação, exposição e comercialização das carnes. Dos seis mercados públicos avaliados, apenas o município de Cametá, PA, apresentava balcão frigorífico para exposição da carne no momento da venda, assim como apenas o município de Mocajuba, PA, apresentou câmara frigorífica em pleno funcionamento utilizada para armazenamento das meias carcaças.

Lundgren et al<sup>2</sup> ressaltam que durante a comercialização de produtos cárneos é imprescindível a manutenção da temperatura adequada, pois do contrário estes se alteram rapidamente, principalmente em regiões tropicais. Desta forma, é necessário um controle rigoroso da temperatura de refrigeração para garantir a qualidade desses alimentos. Além da fiscalização ineficiente, a falta de conhecimento dos comerciantes, que na sua grande maioria possuem baixo nível de escolaridade, e a questão cultural empírica, contribuem para este quadro. Isso pode ser confirmado por Minnaert e Freitas<sup>14</sup> que, ao avaliarem as práticas higiene nas feiras

livres de Salvador, BA, concluíram que a falta de higienização dos alimentos nestes locais é uma aquisição histórica e cultural, em que limpo e sujo são símbolos culturais nem sempre associados aos conceitos técnico-científicos. No que concerne às práticas de comercialização, foi evidenciado nos mercados pesquisados neste estudo, situações semelhantes ao descritas pelos autores.

Alcântara et al<sup>8</sup> também verificaram desorganização e falta de higiene em 53,33 % dos locais amostrados, onde foi evidenciada a falta de pias para higienização das mãos dos manipuladores, sendo que nesses locais a manipulação da carne e dinheiro ao mesmo tempo eram frequentes. No estudo aqui apresentado, foi evidenciada a ausência de práticas de higiene e sanitização tanto dos manipuladores quanto dos equipamentos, utensílios e locais de manipulação.

Oliveira et al<sup>15</sup>, avaliando as condições higiênicossanitárias das mãos de manipuladores, observaram a interferência direta da falta de higiene pessoal na qualidade microbiológica da carne comercializada, em que as contagens de aeróbios mesófilos, estafilococos coagulase positiva, fungos filamentosos e leveduras, coliformes totais e termotolerantes apresentaram-se elevadas. Os autores comparam os resultados das análises microbiológicas das carnes antes e após a manipulação e constataram aumento da contagem microbiana na maioria das amostras analisadas, indicando que higienização inadequada das mãos dos manipuladores é um dos principais dos fatores de contaminação.

## CONCLUSÃO

Concluiu-se que as amostras de carne *in natura* analisadas demonstraram elevados índices de contaminação por micro-organismos indicadores, o que demonstra que os estabelecimentos analisados apresentaram condições higiênicas insatisfatórias. Esta afirmação foi comprovada pelos resultados obtidos a partir da lista de verificação de conformidades, que determinou que os mercados públicos da Microrregião de Cametá, estado do Pará, são deficientes quanto a condições sanitárias.

## REFERENCIAS

1. Almeida RB, Diniz WJS, Silva PTV, Andrade LP, Diniz WPS, Leal JBG et al. Condições higiênico-sanitárias da comercialização de carnes em feiras livres de Paranaíba, PE. *Alim Nutr*. 2011;22(4):585-92.
2. Lundgren PU, Silva JA, Maciel JF, Fernandes TM. Perfil da qualidade higiênico-sanitária da carne bovina comercializada em feiras livres e mercados públicos de João Pessoa/PB-Brasil. *Alim Nutr*. 2009;20(1):113-9.
3. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Regulamento técnico de Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 18 set. 2003, Seção 1, p. 14-51.
4. Guimarães PRB. Métodos quantitativos estatísticos. São Paulo: IESDE Brasil S.A; 2008.
5. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução nº 275, de 21 de outubro de 2002. Regulamento técnico de procedimentos operacionais padronizados aplicados aos estabelecimentos produtores/Industrializadores de alimentos e a lista de verificação das boas práticas de fabricação em estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 06 nov. 2002, Seção 1, p. 55-58.
6. São Paulo. Secretaria Municipal da Saúde. Portaria nº 2619-SMS.G, de 06 de dezembro de 2011. Regulamento de Boas Práticas e de Controle de condições sanitárias e técnicas das atividades relacionadas à importação, exportação, extração, produção, manipulação, beneficiamento, acondicionamento, transporte, armazenamento, distribuição, embalagem, reembalagem, fracionamento, comercialização e uso de alimentos, águas minerais e de fontes, bebidas, aditivos e embalagens para alimentos. Diário Oficial [da] Cidade de São Paulo, São Paulo, SP, 06 dez. 2011, Seção 1, p. 23-28.
7. Costa EL, Silva JA. Avaliação microbiológica da carne de sol elaborada com baixos teores de cloreto de sódio. *CiêncTecnolAliment*. 2001;21(2):135-49. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612001000200005>].
8. Alcântara MA, Gatto IRH, Kozusny-Andreani DI. Ocorrência e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de micro-organismos isolados de cortes de carne bovina. *Vet Foco*. 2012;10(1):80-92.
9. Chairman CS. Development and use of microbiological criteria for foods. [Parte de livro na internet]. London: Intitute of Food Science & Technology; 1997. [acesso em 12Out2016]. Disponível em: [<http://pdfs.findtheneedle.co.uk/16898.pdf>].
10. Roberts TA, Pitt JI, Cordier JL, Gorris LGM, Gram L, Swanson KMJ, et al. Microorganisms in food 6. 2ª ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York; 2005.
11. Xavier VG, Joele MRSP. Avaliação das condições higiênico-sanitárias de carne bovina comercializada na cidade de Belém-PA. *Hig Aliment*. 2004;18(125):64-73.
12. Lange TN. Avaliação do laudo de inspeção como instrumento de verificação das condições higiênico-sanitárias de estabelecimentos varejistas de carnes do município de Ribeirão Pires – SP [dissertação de mestrado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2010.
13. Diniz WJS, Almeida RB, Lima CN, Oliveira RR, Quirino WA, Brandespim DF. Aspectos higiênicos da comercialização de carnes em feiras livres: a percepção do comerciante. *Acta Vet Bra*. 2013; 7(4): 294-9, 2013. [DOI: <http://dx.doi.org/10.21708/avb.2013.7.4.3431>].
14. Minnaert ACST, Freitas MCS. Práticas de higiene em uma feira livre da cidade de Salvador (BA). *Ciênc Saúde Coletiva*. 2010;15(Supl 1):1607-14. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-81232010000700072>].
15. Oliveira MMM, Brugnera DF, Mendonça AT, Piccoli RH. Condições higiênico-sanitárias de máquinas de moer carne, mãos de manipuladores e qualidade microbiológica da carne moída. *Ciênc Agrotec*. 2008;32(6):1893-8. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542008000600031>].





# Diagnóstico do câncer anal na coinfeção pelo papiloma vírus humano (HPV) e pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV)

## Anal cancer diagnosis in patients with human papillomavirus (HPV) and human immunodeficiency virus (HIV) coinfection

RIALA6/1710

Bruna Fischer DUARTE\*, Michelli Aparecida Bertolazzo da SILVA, Sandro GERMANO, Maria Suely Soares LEONART

\*Endereço para correspondência: Laboratório de Citologia Clínica, Setor de Ciências da Saúde, Campus Jardim Botânico, Universidade Federal do Paraná. Av. Prefeito Lothário Meissner, 632, Curitiba, PR, Brasil, CEP: 80210-170. Tel: 41 3360 4490. Email: bruninha1210@yahoo.com.br

Recebido: 22.05.2016 - Aceito para publicação: 25.11.2016

### RESUMO

O câncer anal é raro, porém certas populações apresentam risco aumentado para o seu desenvolvimento, sendo o terceiro tumor maligno mais comum entre os portadores do HIV. Diferentemente da maioria das malignidades que acometem estes indivíduos, o câncer anal pode ser prevenido. O sucesso da triagem de câncer do colo do útero para a diminuição de sua incidência tem conduzido à sua utilização como critério para efetuar o seguimento do câncer anal. Entretanto, este protocolo tem sido mais empregado na pesquisa, e em apenas algumas exceções. Neste estudo é realizada a revisão sobre o câncer anal, seus fatores de risco e diagnóstico, com o objetivo de alertar a comunidade científica e os profissionais de saúde quanto à importância de efetuar seu rastreamento e acompanhamento, bem como das suas lesões precursoras em indivíduos portadores de HIV/AIDS.

**Palavras-chave.** neoplasia do ânus, papiloma vírus humano, HIV.

### ABSTRACT

Anal cancer is rare, but certain populations are at increased risk for this type of tumor, being the third most commonly reported malignancy among HIV positive individuals. Unlike the majority of malignancies occurring in this population, the anal cancer can be prevented. The success of cervical cancer screening in reducing its incidence has led to point this strategy as a criterion for performing the anal cancer screening. However, this protocol has been used mostly and widely for conducting the scientific researches, with a few exceptions only. This study reviews the topics on anal cancer, its risk factors and its diagnosis, in order to alert the scientific community and the health professionals about the importance of anal cancer screening and its monitoring in HIV infected patients.

**Keywords.** anal neoplasms, human papillomavirus, HIV.

## INTRODUÇÃO

O câncer anal é raro, porém certas populações apresentam risco aumentado para este tipo de tumor, principalmente entre indivíduos com Síndrome da Imunodeficiência Humana (AIDS) e homens que praticam sexo com homens<sup>1</sup>. É o terceiro tumor maligno mais comum entre os portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), e o mais comum dentre os tumores não definidores de AIDS<sup>2,3</sup>. Entretanto, diferentemente da maioria dos outros tumores malignos que se desenvolvem em indivíduos HIV positivos, o câncer anal pode ser prevenido<sup>4</sup>.

O câncer anal apresenta semelhanças com o câncer cervical, tanto no aspecto histológico, como pelo fato de ambas as lesões aparecerem frequentemente na junção entre os tecidos escamoso e glandular e, ainda, por estarem fortemente associadas ao papiloma vírus humano (HPV). Tais fatos vêm incentivando tentativas de rastreamento precoce das neoplasias anais utilizando-se a citologia<sup>5</sup>.

O diagnóstico precoce de doenças como o câncer oferece possibilidades de resultados concretos, tanto no aumento das chances de cura, quanto na qualidade de vida dos pacientes. O câncer anal ainda é bastante negligenciado no mundo inteiro, e como consequência, seu diagnóstico normalmente é tardio. Ao se considerar ainda o aumento desse câncer em grupos populacionais de risco, verifica-se a necessidade de elaborar diretrizes para o diagnóstico, acompanhamento e tratamento destes pacientes. Estes fatos motivaram a realização desta revisão de literatura sobre o câncer anal, alertando a comunidade científica e os profissionais de saúde para a importância do rastreamento e acompanhamento das lesões pré-neoplásicas e neoplásicas do ânus, em indivíduos portadores de HIV/AIDS.

## METODOLOGIA

O presente estudo consiste em uma revisão da literatura. A busca dos periódicos foi realizada nas bases de dados MEDLINE/PubMed, BIREME, SciELO e Lilacs, cruzando-se os descritores

Rastreamento, Citologia anal, Neoplasias do ânus, HPV e HIV. Foram selecionados os artigos publicados até janeiro de 2016.

## Anatomia e histologia da região anal

O canal anal apresenta cerca de 4 cm de comprimento em adultos, e se estende do ápice das colunas anais até a junção mucocutânea. A base das colunas anais é a linha pectínea ou denteada, localizada na porção média do canal anal. A zona de transformação (ZTA) está 6 a 10 mm proximal à linha pectínea e possui 4 a 5 mm de comprimento. Na ZTA, o epitélio colunar do reto é substituído pelo epitélio escamoso estratificado do canal anal, e ainda pode ser observado um epitélio especializado com aparência variável, o epitélio escamoso metaplásico<sup>6,7</sup>.

## Tumores do canal anal

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), estes tumores se localizam predominantemente no canal anal, podendo apresentar-se como adenocarcinoma ou carcinoma escamoso<sup>8</sup>.

Cerca de 80 % dos tumores malignos anais são carcinomas de células escamosas. Os tumores que surgem na porção distal à linha pectínea são frequentemente mais queratinizados, ao passo que aqueles que aparecem acima da linha pectínea, são menos queratinizados. O adenocarcinoma do ânus constitui apenas 5 a 10 % dos casos, porém se comporta e é tratado como o câncer retal<sup>9,10</sup>.

As manifestações clínicas do câncer anal são frequentemente tardias e estão relacionadas ao tamanho e extensão do tumor. Os sintomas não são específicos, sendo comum sangramento retal, prurido e desconforto anal. Outros sintomas incluem fezes de calibre fino, alterações nos movimentos intestinais, tenesmo não aliviado pela evacuação e sensação de uma massa no canal anal. Dor durante a defecação, corrimento anal ou mudança de hábitos intestinais são geralmente encontrados em casos mais avançados. De 70 a 80 % dos casos de câncer anal são inicialmente diagnosticados como condições benignas, como doença de Paget, leucoplasia,

hemorroidas, fissuras e fístulas; e 20 % dos pacientes não apresentam sintomas ao diagnóstico. Por estas razões, a maioria dos pacientes apresenta doença avançada ao diagnóstico<sup>9-11</sup>.

### **Epidemiologia**

Nos EUA, a incidência do câncer anal é de aproximadamente 2/100.000 homens e mulheres<sup>12</sup>. No Brasil, a estimativa para o ano de 2016, válida também para o ano de 2017, aponta para a ocorrência de aproximadamente 34 mil casos de câncer de cólon, reto e/ou canal anal<sup>13</sup>. Apesar dessa alta incidência, as neoplasias do canal anal correspondem a apenas de 1 a 6 % das neoplasias anorretais<sup>14</sup>.

Mesmo antes da epidemia de infecção pelo HIV, a incidência de câncer anal entre homens que praticam sexo com homens foi estimada em até 37 casos por 100.000 pessoas-ano, que é comparável à incidência de câncer cervical nos EUA antes do advento da triagem de rotina<sup>1</sup>. Para homens que fazem sexo com homens HIV positivos, foi encontrada incidência de 131 casos por 100.000 homens, e o número de casos continua a aumentar mesmo após a introdução da terapia antirretroviral (TARV)<sup>15,16</sup>.

### **Fatores de risco**

Anteriormente, acreditava-se que o câncer anal era resultado de uma irritação crônica ocasionada por condições benignas, como hemorroidas e fissuras<sup>9</sup>. No entanto, em vários estudos foram identificados fatores de risco para o carcinoma anal, como infecção por HPV e HIV, contagem baixa de linfócitos CD4, histórico de doenças sexualmente transmissíveis e de câncer cervical, tabagismo, alcoolismo, uso de drogas injetáveis, sexo anal receptivo e imunossupressão<sup>17-19</sup>.

A infecção pelo HPV é o fator de risco mais significativo. Este vírus é capaz de induzir lesões de pele ou mucosa que, caso não sejam tratadas, têm alto potencial de progressão para carcinoma invasivo. O HPV foi detectado em 80 a 90 % dos pacientes com carcinoma anal de células escamosas, sendo o tipo HPV 16 o mais comumente associado ao câncer anal, presente

em 65 a 80 % dos casos, seguido pelo HPV18. Esses dois tipos, sozinhos ou em associação, são encontrados em 78 % de todos os cânceres anais<sup>15,20</sup>.

A transmissão do HPV ocorre na maioria das vezes por via sexual. Tanto o colo do útero como o canal anal apresentam zonas de transformação, regiões onde existe maior facilidade para o HPV acessar as camadas de células basais, podendo causar infecção. Após a entrada do HPV na célula, o genoma viral se estabiliza na forma de elementos extracromossômicos no núcleo. Nesta fase, há replicação do material genético celular e viral e, ao se dividirem, essas células infectadas distribuem equitativamente o DNA viral entre as células filhas. Algumas das células suprabasais infectadas pelo HPV iniciam o programa de diferenciação celular, porém outras continuam proliferando na camada basal. Este processo é seguido pela síntese das proteínas do capsídeo, montagem do vírion e liberação da partícula viral<sup>15</sup>.

Nas lesões pré-cancerosas, o DNA do HPV persiste em um estado episomal, enquanto na maioria das lesões de alto grau, o genoma se encontra integrado ao genoma do hospedeiro. A integração do DNA viral ocorre em razão da clivagem em região específica dos genes E1/E2 na maior parte dos casos. O gene E2 atua no controle da transcrição e replicação, e entre várias funções, inibe a transcrição dos oncogenes E6 e E7. Como consequência da clivagem e perda do controle transcricional exercido pela proteína E2, há superexpressão das oncoproteínas de E6 e E7 do HPV, responsáveis pelo início e manutenção do processo carcinogênico<sup>21</sup>.

A proteína 53 (p53), envolvida nas vias de reparo ao dano do DNA, por levar à interrupção do ciclo celular na fase G1 ou induzir a apoptose, forma complexo com a proteína E6, resultando na sua degradação e inativação. Já a proteína E7 do HPV forma complexos com a proteína do retinoblastoma (pRB). Em condições normais, a pRB está complexada ao fator de transcrição celular E2F na fase G1 do ciclo celular. Para entrar na fase S, a pRB é fosforilada, o que leva à liberação

do fator de transcrição E2F e progressão do ciclo celular. A inativação da pRB pela proteína viral E7 causa a liberação do fator de transcrição E2F, que passa a ser ativo em todas as fases do ciclo celular, levando ao crescimento celular desordenado das células tumorais HPV-positivas. A ação combinada das proteínas E6 e E7 resulta na anulação de muitos pontos de checagem do ciclo celular, o que, em células persistentemente infectadas com HPV, leva ao acúmulo de mutações celulares ao longo do tempo e consequente progressão para câncer<sup>15</sup>.

É difícil estabelecer a associação entre câncer anal e infecção pelo HIV, pois pacientes HIV positivos frequentemente apresentam infecção por um ou mais tipos de HPV. Acredita-se que o aumento da sobrevida dos pacientes HIV positivos proporcionado pelo tratamento medicamentoso, aumentou o tempo de exposição ao HPV, com maior probabilidade de transformação celular e desenvolvimento do carcinoma. Além disso, à medida que progride a infecção pelo HIV, perde-se a imunidade específica contra o HPV e, níveis mais baixos de linfócitos CD4 associam-se ao maior risco para a infecção pelo HPV e o desenvolvimento das neoplasias intraepiteliais anais (NIA), o que sugere que a supressão imune relacionada ao HIV tem papel importante na patogênese da doença<sup>15,17</sup>.

O desenvolvimento da NIA e a progressão para o câncer invasivo são claramente processos multifatoriais. Atualmente, não há evidências de que o HPV se comporte de forma diferente no hospedeiro HIV positivo<sup>15,22</sup>.

### **Rastreamento do carcinoma anal e seus precursores**

O termo NIA foi introduzido em 1986 por Fenger e Nielsen, quando observaram que o carcinoma invasivo anal também é precedido por um estágio pré-canceroso associado ao HPV<sup>23</sup>. A NIA é definida como a presença de alterações nucleares no epitélio sem o comprometimento da membrana basal e, embora não comprovado, o seu tratamento poderia prevenir a progressão para câncer<sup>24,25</sup>.

A prevenção e a detecção precoce do câncer anal ou de NIA têm importante papel na sobrevida dos pacientes. Um estudo revelou

que pacientes com diagnóstico de doença local apresentaram taxa de sobrevida de 78 % em 5 anos; aqueles com diagnóstico de doença regional, taxa de 56 %; e os que apresentavam metástase distante, de 18 %<sup>12</sup>.

O sucesso do rastreamento do câncer do colo do útero na diminuição de sua incidência tem conduzido à sua utilização como modelo para o rastreamento do câncer anal em grupos de alto risco, compreendendo: citologia anal para detecção de lesões precoces; encaminhamento dos pacientes para realização da anuscopia de alta resolução; e confirmação histológica<sup>20</sup>.

Embora não existam estudos randomizados que comprovem a eficácia dessa estratégia, o rastreamento do câncer anal vem sendo discutido e incentivado nos grupos considerados de risco<sup>20</sup>. As Diretrizes do Serviço de Saúde Pública dos EUA recomendam que a citologia anal deva ser considerada para homens e mulheres HIV positivos<sup>26</sup>; enquanto o Instituto de AIDS do Estado de Nova York recomenda a realização anual do exame de toque retal para todos os pacientes HIV positivos, e do exame citológico anal para homens que praticam sexo com homens, pacientes com história de condilomas anais e mulheres com histologia vulvar ou de colo uterino anormal<sup>27</sup>.

### **Citologia anal**

A citologia foi proposta como potencial ferramenta de rastreamento de lesões anais devido à semelhança citomorfológica entre canal anal e colo do útero. É uma técnica simples, necessitando apenas de um breve treinamento para obtenção de amostras adequadas, e permite a amostragem de uma grande área, com o mínimo de desconforto do paciente e sem anestesia. Entretanto, como um teste de rastreamento, não fornece diagnóstico definitivo, sendo usado principalmente para determinar a necessidade de se acompanhar o paciente<sup>25</sup>.

Em 2001, o Sistema Bethesda para citopatologia cérvicovaginal incluiu um apêndice para classificação de amostras de citologia anorretal<sup>28</sup>. Apesar das semelhanças citológicas, a análise da citologia anal é mais trabalhosa do que a citologia cervical. Isso ocorre devido ao grande

número de escamas anucleadas, quantidade de bactérias no fundo da lâmina e presença de matéria fecal, o que dificulta a avaliação do esfregaço<sup>29</sup>.

Em estudos sobre o uso da citologia anal encontrou-se valores de sensibilidade e especificidade entre 42 a 98 % e entre 16 a 96 %, respectivamente<sup>30-33</sup>. Porém, apesar de ser um método sensível, resultados citológicos podem não correlacionar bem com a histologia<sup>1,32,34</sup>. Mathews et al<sup>34</sup> relataram concordância de 74,7 % entre os dois métodos, com um índice *Kappa* de 0,36. Estes resultados são concordantes com estudos nos quais se comparou citologia cervical com histologia<sup>35,36</sup>. Ao se interpretar tais resultados, deve-se levar em conta a subjetividade da histologia, também sujeita a erros de amostragem e medição<sup>34</sup>.

Além disso, o sucesso do rastreio do câncer anal deve ser baseado na repetição dos testes ao longo do tempo. Palefsky et al<sup>37</sup> mostraram aumento na sensibilidade para a detecção de lesões anais, de 69 % para 81 %, após 2 anos de triagens subsequentes.

Nos Estados Unidos, avaliou-se o custo-benefício da citologia anal no rastreamento de homens que fazem sexo com homens, portadores ou não do HIV, e verificou-se que a triagem a cada 2 ou 3 anos pode ser vantajosa e trazer benefícios à expectativa de vida dos pacientes<sup>38</sup>. Outros grupos que poderiam ser rastreados incluem todos os indivíduos HIV positivos, mulheres com histórico de displasia ou câncer cervical e pacientes transplantados<sup>17</sup>.

### **Anuscopia de alta resolução e biópsia dirigida**

A anuscopia de alta resolução (HRA) é usada para determinar a presença, extensão ou ausência de lesões subclínicas, guiar biópsias, além de permitir o tratamento direto das lesões, com remoção de lesões intraepiteliais de alto grau<sup>39</sup>.

Na HRA utiliza-se os mesmos princípios e procedimentos básicos da colposcopia cervical, com aplicação de ácido acético e lugol sobre a superfície do canal anal, para detectar lesões acetobranças suspeitas; porém a HRA é mais desafiadora, especialmente devido à topografia acidentada da região anal e ao obscurecimento

de lesões por hemorroidas, dobras, fezes ou muco. Sua disponibilidade ainda é limitada devido ao reduzido número de clínicos habilitados, o que representa um obstáculo significativo para se iniciar o rastreamento do câncer anal<sup>20,40</sup>.

A anuscopia ainda é um método muito subjetivo. Resultados de sensibilidade e especificidade variam de 59 a 100 % e de 19 a 66 %, respectivamente. Entretanto, resultados de anuscopia geralmente correlacionam bem com os histopatológicos<sup>34,41</sup>.

Apesar de suas limitações, o exame histopatológico ainda é considerado o padrão-ouro para o diagnóstico de lesões anais<sup>25,39</sup>. As NIA são geralmente diagnosticadas utilizando-se uma adaptação da classificação das Neoplasias Intraepiteliais Cervicais (NIC), sendo categorizadas histologicamente nos graus 1, 2 e 3, dependendo da avaliação qualitativa e quantitativa de: atipias citológicas, grau de maturação e diferenciação do epitélio escamoso e atividade mitótica<sup>1</sup>.

Em meados da década de 1990, o termo lesão intraepitelial escamosa anal foi introduzido como alternativa a NIA e foi classificado em 2 graus: lesão intraepitelial anal de baixo grau, que corresponde a alterações compatíveis com o efeito citopático pelo HPV e NIA I; e lesão intraepitelial anal de alto grau, que corresponde às NIA II e III<sup>23</sup>.

Devido à alta prevalência da NIA em certas populações, e também ao fato de que um único resultado citológico negativo tem um valor preditivo negativo pobre em populações com alta prevalência de doença, alguns pesquisadores têm defendido o uso da HRA como um teste de rastreio primário. Em um estudo, o uso direto de HRA teve o menor custo total e foi a estratégia mais efetiva. No entanto, dada a disponibilidade insuficiente de HRA, a utilização da citologia para fazer a triagem de indivíduos para HRA seguida de biópsia, pode ser a melhor abordagem atual para identificar a doença na população em situação de risco<sup>42,43</sup>.

### **Testes moleculares**

Diferentes técnicas moleculares estão disponíveis para detecção e tipagem do HPV, entre eles: captura híbrida (CH), hibridização

*in situ* (ISH), *southern blot*, hibridização em fase sólida (*microarrays*) e reação em cadeia da polimerase (PCR). Os testes podem ser realizados tanto em amostras de citologia em meio líquido, como em amostras de biópsia. Os métodos mais utilizados são PCR e CH, por serem mais baratos e simples. A CH detecta a presença dos tipos de HPV oncogênicos mais frequentes, sem individualizá-los, e é um dos métodos mais utilizados na prática clínica para o diagnóstico de infecção cervical. A PCR é uma técnica baseada na amplificação de DNA e possui uma alta sensibilidade e possibilita a tipagem do vírus. A PCR em tempo real (qPCR) é uma variação do método convencional, cuja metodologia permite quantificar a carga viral pela emissão de fluorescência à medida que o DNA viral é amplificado. Os métodos PCR e qPCR são mais complexos que a CH e sua utilização é mais restrita à pesquisa<sup>16,44</sup>.

Entretanto, nenhum dos ensaios atualmente disponíveis foi aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para utilização em amostras citológicas anais. Além disso, o papel do teste de detecção do HPV no rastreio para o câncer anal continua a ser um assunto controverso, pois em populações com elevada prevalência de HPV, como a de homens que fazem sexo com homens e HIV positivos, os testes apresentaram baixa especificidade e pobre valor preditivo positivo, invalidando seu uso como teste de triagem de lesões anais em populações de alto risco<sup>16</sup>.

## CONCLUSÃO

Existem vários obstáculos à implementação de programas de rastreamento por citologia anal em populações de risco. Em primeiro lugar, há carência de dados para indicar que o tratamento de NIA possa reduzir a incidência de câncer anal. Outros obstáculos incluem a escassez de profissionais treinados na coleta de amostras de citologia anal, relutância de alguns clínicos para abordar a questão da NIA, bem como os sentimentos dos pacientes de vergonha e medo de um possível desconforto associado com a coleta de espécimes anais<sup>5,45</sup>.

Embora não existam fortes evidências

na literatura para incentivar a realização da citologia anal no rastreamento de lesões anais em populações de risco, seu valor baseia-se no sucesso da citologia cervical na redução da incidência do câncer cervical. Ainda há que se considerar que a incidência relativamente baixa do câncer anal na população em geral pode não justificar uma possível implantação do exame citológico anal em rastreamentos populacionais, mas que poderia justificar o seu rastreamento em populações com risco aumentado, como aquelas de portadores do HIV. Por esta razão, é importante ressaltar a necessidade de estímulo para o treinamento de médicos, citologistas e técnicos, fazendo com que o protocolo para rastreamento das lesões precursoras do câncer anal deixe de ser apenas empregado em pesquisas e se torne rotina difundida entre os diversos centros de referência do país.

## REFERÊNCIAS

1. Bean SM, Chhieng DC. Anal-rectal cytology: a review. *Diagn Cytopathol*. 2010;38(7):538-46. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/dc.21242>].
2. Deeken JF, Tjen-A-Looi A, Rudek MA, Okuliar C, Young M, Little RF, et al. The rising challenge of non-AIDS-defining cancers in HIV-infected patients. *Clin Infect Dis*. 2012;55(9):1228-35. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cis613>].
3. Grulich AE. Epidemiology of Non-AIDS-Defining Malignancies. In: Hope TJ, Stevenson M, Richman D, editors. *Encyclopedia of AIDS*. New York: Springer; 2013. p. 1-8.
4. Sahasrabudhe VV, Castle PE, Follansbee S, Borgonovo S, Tokugawa D, Schwartz LM, et al. Human papillomavirus genotype attribution and estimation of preventable fraction of anal intraepithelial neoplasia cases among HIV-infected men who have sex with men. *J Infect Dis*. 2013;207(3):392-401. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jis694>].
5. Smyczek P, Singh AE, Romanowski B. Anal intraepithelial neoplasia: review and recommendations for screening and management. *Int J STD AIDS*. 2013;24(11):843-51. [ DOI: <http://dx.doi.org/10.1177/0956462413481527>].

6. Pandey P. Anal anatomy and normal histology. *Sex Health*. 2012;9(6):513-6. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1071/SH12034>].
7. Glynne-Jones R, Nilsson PJ, Aschele C, Goh V, Peiffert D, Cervantes A, et al. Anal cancer: ESMO-ESSO-ESTRO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Radiother Oncol*. 2014;111(3):330-9. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejso.2014.07.030>].
8. Fenger C, Frisch M, Marti MC, Parc R. Tumours of the anal canal. In: Hamilton SR, Aaltonen LA, editors. *World Health Organization Classification of Tumours Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System*. Lyon: IARC Press; 2000.
9. Ryan DP, Compton CC, Mayer RJ. Carcinoma of the anal canal. *N Engl J Med*. 2000;342(11):792-800. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM200003163421107>].
10. Licitra L, Spinazzé S, Doci R, Evans TJ, Tanum G, Ducreux M. Cancer of the anal region. *Crit Rev Oncol Hemat*. 2002;43(1):77-92. [DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1040-8428\(01\)00193-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1040-8428(01)00193-7)].
11. Shridhar R, Shibata D, Chan E, Thomas CR. Anal cancer: Current standards in care and recent changes in practice. *CA Cancer J Clin*. 2015;65(2):139-62. [DOI: <http://dx.doi.org/10.3322/caac.21259>].
12. Johnson LG, Madeleine MM, Newcomer LM, Schwartz SM, Daling JR. Anal cancer incidence and survival: the surveillance, epidemiology, and end results experience, 1973-2000. *Cancer*. 2004;101(2):281-8. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.20364>].
13. Instituto Nacional de Câncer, Ministério da Saúde. Estimativa 2016: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2015. [acesso 2016 Jan 16]. Disponível em: [<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>].
14. Larangeira LLS, Andrade SKV. Incidência do carcinoma de canal anal na regional de saúde de Londrina (PR). *Rev bras Coloproct*. 2004;24(3):240-6.
15. Brickman C, Palefsky JM. Human papillomavirus in the HIV-infected host: epidemiology and pathogenesis in the antiretroviral era. *Curr HIV/AIDS Rep*. 2015;12(1):6-15. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11904-014-0254-4>].
16. Benevolo M, Dona' MG, Ravenda PS, Chiocca S. Anal human papillomavirus infection: prevalence, diagnosis and treatment of related lesions. *Expert Rev Anti-infect Ther*. 2016;14(5):465-77. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1586/14787210.2016.1174065>].
17. Uronis HE, Bendell JC. Anal cancer: an overview. *Oncologist*. 2007;12(5):524-34. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1634/theoncologist.12-5-524>].
18. Daling JR, Madeleine MM, Johnson LG, Schwartz SM, Shera KA, Wurscher MA, et al. Human papillomavirus, smoking, and sexual practices in the etiology of anal cancer. *Cancer*. 2004;101(2):270-80. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.20365>].
19. Melo VH, Guimaraes MDC, Rocha GM, Araujo ACL, Carmo RA, Grinsztejn B, et al. Prevalence and risk factors associated with anal intraepithelial neoplasia among HIV-positive men in Brazil. *J Low Genit Tract Dis*. 2014;18(2):128-35. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/LGT.0b013e31829ee855>].
20. Darragh TM, Winkler B. Anal cancer and cervical cancer screening: key differences. *Cancer Cytopathol*. 2011;119(1):5-19. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cncy.20126>].
21. Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(8):550-60. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2886>].
22. Palefsky J. Biology of HPV in HIV infection. *Adv Dent Res*. 2006;19(1):99-105. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1177/154407370601900120>].

23. Darragh TM, Colgan TJ, Cox JT, Heller DS, Henry MR, Luff RD, et al. The lower anogenital squamous terminology standardization project for HPV-associated lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *J Low Genit Tract Dis*. 2012;16(3):205-42. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/LGT.0b013e31825c31dd>].
24. Gingelmaier A, Weissenbacher T, Kost B, Kaestner R, Sovric M, Mylonas I, et al. Anal cytology as a screening tool for early detection of anal dysplasia in HIV-infected women. *Anticancer Res*. 2010;30(5):1719-23.
25. Jay N. Elements of an anal dysplasia screening program. *J Assoc Nurses AIDS Care*. 2011;22(6):465-77. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jana.2011.08.006>].
26. US Public Health Service, Infectious Diseases Society of America, Prevention of Opportunistic Infections Working Group. 2001 USPHS/IDSA guidelines for the prevention of opportunistic infections in persons infected with human immunodeficiency virus. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2002;10:3-64. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/S1064744902000029>].
27. New York State Department of Public Health AIDS Institute. Clinical Guidelines: Neoplastic Complications of HIV Infection. Section V – Anal Dysplasia and Cancer. 2007. [acesso 2015 Set 23]. Disponível em: [<http://www.hivguidelines.org/clinical-guidelines/adults/neoplasticcomplications-of-hiv-infection/#V>].
28. Solomon D, Nayar R, editors. The Bethesda System for reporting cervical cytology: definitions, criteria, and explanatory notes. 2 ed. New York: Springer; 2004.
29. Cardinal LH, Carballo P, Lorenzo MC, Garcia A, Suzuki V, Tatti S, et al. A six-year experience with anal cytology in women with HPV in the lower genital tract: utility, limitations, and clinical correlation. *Diagn Cytopathol*. 2014;42(5):396-400. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/dc.23050>].
30. Chiao EY, Giordano TP, Palefsky JM, Tyring S, El Serag H. Screening HIV-infected individuals for anal cancer precursor lesions: a systematic review. *Clin Infect Dis*. 2006;43(2):223-33. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1086/505219>].
31. Friedlander MA, Stier E, Lin O. Anorectal cytology as a screening tool for anal squamous lesions: cytologic, anoscopic, and histologic correlation. *Cancer*. 2004;102(1):19-26. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.11888>].
32. Arain S, Walts AE, Thomas P, Bose S. The anal Pap smear: cytomorphology of squamous intraepithelial lesions. *Cytojournal*. 2005;2(4). [DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1742-6413-2-4>].
33. De Ruiter A, Carter P, Katz D, Kocjan G, Whatrup C, Northover J, et al. A comparison between cytology and histology to detect anal intraepithelial neoplasia. *Genitourin Med*. 1994;70(1):22-5.
34. Mathews WC, Sitapati A, Caperna JC, Barber RE, Tugend A, Go U. Measurement characteristics of anal cytology, histopathology, and high-resolution anoscopic visual impression in an anal dysplasia screening program. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2004;37(5):1610-5.
35. DiBonito L, Falconieri G, Tomasic G, Colautti I, Bonifacio D, Dudine S. Cervical cytopathology: an evaluation of its accuracy based on cytohistologic comparison. *Cancer*. 1993;72(10):3002-6. [DOI: [10.1002/1097-0142\(19931115\)72:10<3002::AID-CNCR2820721023>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19931115)72:10<3002::AID-CNCR2820721023>3.0.CO;2-4)].
36. Katz LMC, Souza ASR, Fittipaldi SO, Santos GM, Amorim MMR. Concordância entre citologia, colposcopia e histopatologia cervical. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2010;32(8):368-73. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-72032010000800002>].
37. Palefsky JM, Holly EA, Ralston ML, Arthur SP, Hogeboom CJ, Darragh TM. Anal cytological abnormalities and anal HPV infection in men with Centers for Disease Control group IV HIV disease. *Genitourin Med*. 1997;73(3):174-80.



38. Goldie SJ, Kuntz KM, Weinstein MC, Freedberg KA, Palefsky JM. Cost-effectiveness of screening for anal squamous intraepithelial lesions and anal cancer in human immunodeficiency virus-negative homosexual and bisexual men. *Am J Med*. 2000;108(8):634-41. [DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9343\(00\)00349-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9343(00)00349-1)].
39. Maia LB, Marinho LC, Wanderley Paes Barbosa T, Batalha Filho ES, Ribeiro Velasco LF, Costa G, et al. A comparative study between conventional and liquid-based cytology in screening for anal intraepithelial lesions in HIV-positive patients. *Diagn Cytopathol*. 2014;42(10):840-5. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/dc.23130>].
40. Palefsky JM. Practising high-resolution anoscopy. *Sex Health*. 2012;9(6):580-6. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1071/SH12045>].
41. Gimenez F, Costa-e-Silva ITd, Daumas A, Araújo Jd, Medeiros SG, Ferreira L. The value of high-resolution anoscopy in the diagnosis of anal cancer precursor lesions in HIV-positive patients. *Arq Gastroenterol*. 2011;48(2):136-45. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-28032011000200010>].
42. Park IU, Palefsky JM. Evaluation and management of anal intraepithelial neoplasia in HIV-negative and HIV-positive men who have sex with men. *Curr Infect Dis Rep*. 2010;12(2):126-33. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11908-010-0090-7>].
43. Lam JM, Hoch JS, Tinmouth J, Sano M, Raboud J, Salit IE. Cost-effectiveness of screening for anal precancers in HIV-positive men. *AIDS*. 2011;25(5):635-42. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/QAD.0b013e3283434594>].
44. Silva ER, Macêdo FLdS, Soares LRC, Rosal VMdS, Carvalho NAL, Rocha MGdL. Diagnóstico molecular do papilomavírus humano por captura híbrida e reação em cadeia da polimerase. *Femina*. 2015;43(4):181-4.
45. Cranston RD, Darragh TM, Holly EA, Jay N, Berry JM, Da Costa M, et al. Self-collected versus clinician-collected anal cytology specimens to diagnose anal intraepithelial neoplasia in HIV-positive men. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2004;36(4):915-20.



# Conhecimentos de escolares e funcionários da Rede Pública de Ensino sobre as parasitoses intestinais

## Knowledge of students and employees of Public School System on the intestinal parasites

RIALA6/1711

Mayara Perlingeiro de SIQUEIRA\*, Eduarda Peixoto AZEVEDO, Élide Mateus de ALMEIDA, Juliana da Silva MATOS, Andreza Ramos RODRIGUES, Stephanie Colino SCARABELLI, Thiago Pimentel PILOTTO, Juliana Torres de FREITAS, Alynne da Silva BARBOSA, Danuza Pinheiro Bastos Garcia de MATTOS, Otilio Machado Pereira BASTOS, Claudia Maria Antunes UCHÔA

\*Endereço para correspondência: Laboratório de Bioagentes Ambientais, Parasitologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto Biomédico, Universidade Federal Fluminense. Rua Professor Hernani Melo, 101, sala 212C, São Domingos, Niterói, RJ, CEP: 24210-130. Tel: 21 2629 2426. E-mail: mayaraperlingeiro@yahoo.com.br

Recebido: 12.01.2016 - Aceito para publicação: 05.07.2016

### RESUMO

O desconhecimento ou nível insatisfatório de informações sobre as enteroparasitoses e sua prevenção, aliados ao baixo nível socioeconômico, educacional e insuficiência de saneamento básico, têm sido apontados como fatores de risco para a aquisição dessas infecções. Neste estudo foram averiguados os conhecimentos de estudantes do 3º ao 7º ano do Ensino Fundamental e dos funcionários de sete escolas Municipais de Niterói, RJ, Brasil. Foram aplicados questionários, e as respostas foram avaliadas como adequadas, inadequadas, incompletas, não soube responder ou não respondeu. Entre os 335 estudantes, observou-se conhecimento mediano sobre *habitat* (47,5 %), prevenção (48,4 %) e sintomatologia (45,1 %). Desses, 43,3 % demonstraram conhecimento inadequado sobre transmissão. E 51,6 % dos estudantes fizeram associação de verminoses com vermes, e somente 2,7 % apresentaram conhecimento sobre protozoários. Em 62 funcionários, observou-se conhecimento adequado sobre definição, exemplos, *habitat*, transmissão, sintomatologia e prevenção. Tais resultados evidenciaram a ocorrência de informações fragmentadas sobre a infecção por enteroparasitos entre os escolares e mais corretas entre os funcionários. Torna-se importante efetuar melhor abordagem do tema, referente aos conteúdos de ciências, e ampliar este arcabouço teórico para interferir na difusão da informação e na formação de cidadãos críticos.

**Palavras-chave.** enteropatias parasitárias, conhecimentos, saúde pública, educação em saúde, ensino fundamental.

### ABSTRACT

Lack of knowledge or unsatisfactory information about the enteroparasites and preventive measures, combined with low socioeconomic, educational and poor sanitation status, have been appointed as a risk factor for acquiring these parasites. This study aimed at identifying the knowledge of students of 3rd to 7th grade of elementary school and of employees of seven municipal schools of Niterói, RJ, Brazil. Questionnaires were applied, and the answers were rated as adequate, inadequate, incomplete, could not answer or did not answer. Among 335 students, the median knowledge on habitat (47.5 %), prevention (48.4 %) and symptoms (45.1 %) were detected. Of these, 43.3 % showed an inadequate knowledge on transmission; 51.6 % associated the verminosis with worms, and 2.7 % only had knowledge about protozoa. The adequate knowledge on definition, examples, habitat, transmission, symptoms and prevention were observed among 62 employees. Occurrence of fragmented information on the enteroparasites among students and the correct knowledge among employees. Thus, it is crucial to perform the better approach, referring to science content, aiming to promote the expansion of this theoretical framework for interfering with the information dissemination and in the development of critical citizens.

**Keywords.** intestinal diseases parasitic, knowledge, public health, health education, primary education.

## INTRODUÇÃO

O parasitismo intestinal constitui-se, ainda, um problema de Saúde Coletiva no Brasil. Os principais agravos que parasitos intestinais podem causar a seus portadores incluem, entre outros, dependendo da espécie parasitária, quadros de diarreia e má absorção de nutrientes, obstrução intestinal, desnutrição e anemia por deficiência de ferro, sendo as manifestações clínicas usualmente proporcionais à carga parasitária albergada pelo indivíduo<sup>1</sup>. Além dessas alterações, os parasitos intestinais têm sido associados à interferência no desenvolvimento integral e cognitivo dos hospedeiros<sup>2</sup>.

As condições inadequadas de higiene e socioeconômicas baixas contribuem de forma significativa para que as populações menos favorecidas e, em especial, as crianças, tornem-se alvo para a ocorrência dessas parasitoses<sup>3,4</sup>, sendo consideradas como indicador de *status* socioeconômico e de desenvolvimento de um povo<sup>5</sup>.

Aliados a esses determinantes, o desconhecimento ou nível insatisfatório de informações sobre enteroparasitoses e suas medidas de prevenção têm sido apontados por diversos estudos<sup>6-9</sup> como uma das principais causas de incidência de parasitoses e como fator de risco para sua aquisição<sup>10</sup>.

A falta de informações adequadas sobre saúde tem sido associada nos discursos educacionais à “democratização do ensino”, ocorrida a partir dos anos de 1970, quando o Estado ampliou o número de escolas e tornou o ensino de 1º grau gratuito e obrigatório para toda a população brasileira, mas não garantiu sua adequação à nova clientela e, conseqüentemente, não possibilitou a democratização do saber<sup>11</sup>.

O sistema educacional reflete a organização política do país e atende às mudanças que ocorrem na sociedade. Transformações ocorridas mundialmente no âmbito da política e da economia, sobretudo a partir da década de 1950, expuseram a importância da ciência para a sociedade a qual foi, aos poucos, ganhando mais espaço nos currículos escolares<sup>12</sup>.

Em processos educativos mais esclarecedores a respeito de prevenção de parasitoses intestinais,

como estudos voltados para uma abordagem mais contextualizada, o conhecimento de medidas preventivas pode abrir um leque de possibilidades para a elaboração de estratégias que se aproximem de tal realidade, interagindo o saber popular dos estudantes com práticas para a saúde na escola<sup>10</sup>. Dessa forma as crianças poderão contribuir como disseminadores e multiplicadores dessa informação na escola e arredores, levando-a também aos seus familiares, grupos de amigos e outros membros da comunidade<sup>13</sup>. A informação possibilita que o cidadão conheça, identifique, eduque e previna-se das doenças que causam danos ao ser humano<sup>14</sup>, bem como são fundamentais para a elaboração de eventuais ações e programas de intervenção preventiva a serem organizados pelos serviços públicos de saúde<sup>15</sup>.

Poucos estudos identificam os conhecimentos de grupos da sociedade sobre parasitoses intestinais, sendo em alguns deles esse processo associado a implementação de ações educativas em saúde<sup>6-9,16-19</sup>.

Baseado nesse contexto torna-se de grande importância a realização de estudos sobre conhecimentos, uma vez que esses representam subsídios essenciais para construção de programas educativos em saúde e redução de exposição ao risco. Dessa forma o presente estudo objetivou identificar os saberes de estudantes e funcionários de sete escolas Municipais de Niterói, RJ, Brasil sobre parasitoses intestinais ampliando o arcabouço teórico sobre o tema.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foi desenvolvido um estudo transversal descritivo quantitativo e qualitativo, realizado em sete escolas da Rede Pública de Ensino Fundamental de Niterói, localizada na região metropolitana do Rio de Janeiro, Brasil. As escolas foram selecionadas previamente, junto à Secretaria Municipal de Educação de Niterói e todos os estudantes e funcionários de cada estabelecimento de ensino foram convidados a participar do estudo.

O aceite de participação no projeto foi voluntário, mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), sendo os

escolares representados por seus pais/responsáveis legais. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Federal Fluminense parecer nº 621-193 em 04/04/2014.

No período de agosto de 2014 a outubro de 2015, o estudo foi realizado nas escolas localizadas nos seguintes bairros: escola A em São Domingos; B no Bairro de Fátima; C no Fonseca; D em Itaipu; E no Sapê; F em Santa Bárbara e G no Barreto.

O questionário de saberes, adaptado dos modelos propostos por Nunes<sup>9</sup> e Siqueira e Fiorini<sup>6</sup>, foi aplicado aos estudantes do 3º ano do Ensino Fundamental I ao 7º ano do Ensino Fundamental II, sendo os alunos do 1º e 2º ano excluídos devido ao seu baixo grau de letramento.

O questionário foi constituído por sete perguntas abertas e os alunos puderam responder por escrito ou em forma de desenho. As perguntas e respostas esperadas encontram-se na **Tabela 1**.

O questionário, adaptado do modelo proposto por Nunes<sup>9</sup>, para os funcionários foi composto por 11 perguntas abertas. As perguntas e respostas esperadas encontram-se na **Tabela 2**.

Para a análise das respostas dos estudantes e funcionários, as mesmas foram lidas e classificadas para análise quantitativa como adequadas, incompletas, inadequadas, não soube responder

ou não respondeu. Foram consideradas adequadas respostas sem erros, mesmo quando apresentaram apenas uma opção, no caso de existirem diversas possibilidades, como em sintomatologia e profilaxia. Os casos em que houve presença de informações corretas e incorretas na mesma resposta, essa foi considerada inadequada. As respostas foram classificadas como incompletas quando continham informações pouco específicas que poderiam dar margem a outras interpretações como coceira. A análise estatística foi realizada pelo Teste Exato de Fisher com intervalo de confiança de 5%. Para análise qualitativa foram identificadas em diversas perguntas categorias de respostas mais frequentes e exemplos. No questionário para os funcionários perguntou-se separadamente o que é parasitose intestinal e o que é verminose, além de parasito intestinal e verme são sinônimos e quem causa a parasitose intestinal para verificar se haveria consistência nas respostas. Da mesma forma utilizou-se no questionário de estudantes o que é verminose e o que é protozoose.

A aplicação dos questionários para os estudantes foi realizada dentro da sala de aula, com supervisão da equipe de pesquisa, sendo esclarecido que não haveria pontuação e nem problema de erros de grafia. Para os funcionários o questionário foi entregue individualmente, podendo ser respondido e devolvido posteriormente.

**Tabela 1.** Quadro representativo de respostas esperadas para cada pergunta presente no questionário de saberes aplicado aos estudantes da Rede Pública de Ensino Fundamental de Niterói, RJ, Brasil

Perguntas	Respostas Esperadas
O que é verminose?	Doenças causadas por vermes.
O que é protozoose?	Doenças causadas por protozoários.
Como a pessoa “pega”/adquire vermes/protozoários?	Por água e alimentos contaminados, mãos contaminadas, através da pele, andando descalço.
Ondem vivem esses “bichinhos” nas pessoas?	Na barriga/intestino.
O que a pessoa sente quando tem esses “bichinhos”?	Dor na barriga, vômitos, enjoo, diarreia, perda de peso, desânimo, coceira anal.
Para onde vão esses “bichinhos” quando saem da pessoa?	Para o cocô/para o esgoto/para outra pessoa/para o ambiente.
O que deve ser feito para não ter esses “bichinhos”?	Lavando as mãos/lavando os alimentos/ bebendo água filtrada/não andar descalço/higiene pessoal/limpeza da casa/tratamento.

**Tabela 2.** Quadro representativo de respostas esperadas para cada pergunta presente no questionário de saberes aplicado aos funcionários da Rede Pública de Ensino Fundamental de Niterói, RJ, Brasil

Perguntas	Respostas Esperadas
O que são parasitoses intestinais?	Doenças causadas por vermes e protozoários.
Parasito intestinal e verme são sinônimos?	Não. O verme é um tipo de parasito intestinal, porém nem todo parasito intestinal é um verme.
Qual verme/parasito intestinal você conhece?	Lombriga, tênia, giardia, ameba, oxiúro, dentre outros.
O que são verminoses?	Verminoses são infecções/doenças causadas por vermes.
Quem causa as parasitoses intestinais?	Vermes/Parasitos.
Onde vivem os parasitos intestinais nas pessoas?	Vivem na barriga, mais especificamente no intestino delgado ou grosso.
Como as pessoas adquirem os parasitos intestinais?	Por meio de mãos, água e alimentos contaminados com cistos de protozoários ou ovos de helmintos/vermes.
O que a pessoa sente quando tem parasitos intestinais?	Dor de barriga, diarreia, vômitos, perda de peso.
Os parasitos intestinais são perigosos para a nossa saúde? Por quê?	Sim, pois quando não tratados podem gerar casos graves e, algumas vezes, levar o indivíduo a óbito.
O que devemos fazer quando temos parasitos intestinais?	Ir ao médico, fazer o diagnóstico e tomar o medicamento que o médico passar.
O que podemos fazer para evitar e/ou controlar as parasitoses intestinais?	Lavar as mãos antes das refeições, lavar as mãos após o uso de banheiros, beber água filtrada ou fervida, lavar bem as verduras e legumes.

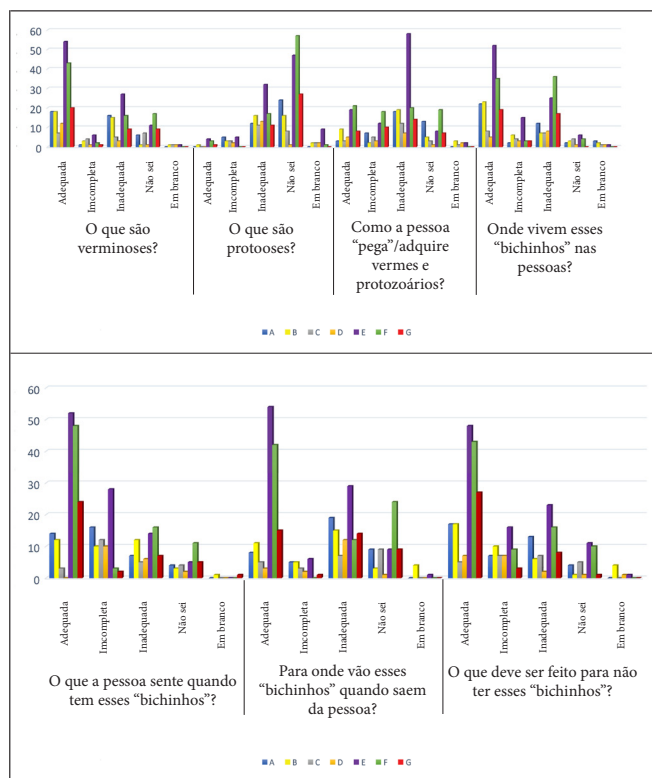
## RESULTADOS

Foram preenchidos 335 questionários de saberes por estudantes. A **Tabela 3** apresenta o percentual de adequação às respostas, por ano de escolaridade, referente a cada pergunta presente no questionário. Das sete escolas participantes, somente duas apresentavam sexto e sétimo anos de escolaridade (B e E).

Foi observado, entre os escolares, variação da resposta para as perguntas entre os anos de escolaridade (**Tabela 3**), sendo as respostas caracterizadas por palavras únicas ou poucas palavras. Observou-se variação de adesão e de respostas entre os estudantes das diversas escolas.

As escolas E e F foram as que apresentaram maior percentual de respostas adequadas e a escola C a com maior percentual de respostas inadequadas (**Figura 1**).

A associação entre vermes e verminose ocorreu na resposta de 51,6 % dos estudantes e 2,7 % associaram protozooses a protozoários. Observou-se diferença estatisticamente significativa entre as respostas dos escolares do terceiro ano de ensino e dos demais anos de escolaridade ( $p < 0,0001$ ) na pergunta sobre o que é verminose. Dos 335 questionários analisados, 43,3 % detinham conhecimento inadequado



**Figura 1.** Gráfico representativo da quantidade de respostas para cada pergunta presente no questionário de saberes preenchido por 335 estudantes de sete Escolas da Rede Pública de Ensino Fundamental de Niterói, RJ, Brasil, no período de agosto de 2014 e outubro de 2015

**Tabela 3.** Resultado das respostas para cada pergunta do questionário de saberes preenchido por 335 estudantes de sete escolas da Rede Pública de Ensino Fundamental de Niterói, RJ, Brasil, por ano de escolaridade no período de agosto de 2014 e outubro de 2015

ANO	Resposta	3º ano	4º ano	5º ano	6º ano	7º ano	Total
Nº de questionários		n=90	n=89	n=117	n=24	n=15	335
O que são verminoses?	Adequada	28 (31,1 %)	48 (53,9 %)	69 (59 %)	18 (75 %)	10 (66,7 %)	173 (51,6 %)
	Incompleta	7 (7,8 %)	4 (4,5 %)	3 (2,6 %)	1 (4,2 %)	3 (20 %)	18 (5,4 %)
	Inadequada	34 (37,8 %)	23 (25,8 %)	26 (22,2 %)	3 (12,5 %)	2 (13,3 %)	88 (26,3 %)
	Não sei	20 (22,2 %)	13 (14,6 %)	18 (15,4 %)	1 (4,2 %)	0	52 (15,5 %)
	Em branco	1 (1,1 %)	1 (1,1 %)	1 (0,9 %)	1 (4,2 %)	0	4 (1,2 %)
O que são protozooses?	Adequada	2 (2,2 %)	0	4 (3,4 %)	0	3 (20 %)	9 (2,7 %)
	Incompleta	7 (7,8 %)	7 (7,9 %)	1 (0,9 %)	1 (4,2 %)	4 (26,7 %)	20 (6 %)
	Inadequada	26 (28,9 %)	30 (33,7 %)	39 (33,3 %)	13 (54,2 %)	3 (20 %)	111 (33,1 %)
	Não sei	50 (55,6 %)	49 (55,1 %)	70 (59,8 %)	8 (33,3 %)	2 (13,3 %)	179 (53,4 %)
	Em branco	5 (5,6 %)	3 (3,4 %)	3 (2,6 %)	2 (8,3 %)	3 (20 %)	16 (4,8 %)
Como a pessoa “pega”/adquire vermes e protozoários?	Adequada	15 (16,7 %)	22 (24,7 %)	24 (20,5 %)	3 (12,5 %)	4 (26,7 %)	68 (20,3 %)
	Incompleta	11 (12,2 %)	25 (28,1 %)	19 (16,2 %)	1 (4,2 %)	2 (13,3 %)	58 (17,3 %)
	Inadequada	49 (54,4 %)	25 (28,1 %)	48 (41 %)	17 (70,8 %)	6 (40 %)	145 (43,3 %)
	Não sei	15 (16,7 %)	16 (18 %)	21 (17,9 %)	2 (8,3 %)	2 (13,3 %)	56 (16,7 %)
	Em branco	0	1 (1,1 %)	5 (4,3 %)	1 (4,2 %)	1 (6,7 %)	8 (2,4 %)
Onde vivem esses “bichinhos” nas pessoas?	Adequada	42 (46,7 %)	43 (48,3 %)	55 (47 %)	12 (50 %)	7 (46,7 %)	159 (47,5 %)
	Incompleta	12 (13,3 %)	8 (9 %)	10 (8,5 %)	4 (16,7 %)	2 (13,3 %)	36 (10,8 %)
	Inadequada	28 (31,1 %)	33 (37,1 %)	41 (35 %)	5 (20,8 %)	5 (33,3 %)	112 (33,4 %)
	Não sei	5 (5,6 %)	4 (4,5 %)	8 (6,8 %)	2 (8,3 %)	1 (6,7 %)	20 (6 %)
	Em branco	3 (3,3 %)	1 (1,1 %)	3 (2,6 %)	1 (4,2 %)	0	8 (2,4 %)
O que a pessoa sente quando tem esses “bichinhos”?	Adequada	34 (37,8 %)	41 (46,1 %)	58 (49,6 %)	9 (37,5 %)	9 (60 %)	151 (45,1 %)
	Incompleta	28 (31,1 %)	21 (23,6 %)	22 (18,8 %)	6 (25 %)	4 (26,7 %)	81 (24,2 %)
	Inadequada	21 (23,3 %)	20 (22,5 %)	17 (14,5 %)	8 (33,3 %)	1 (6,7 %)	67 (20 %)
	Não sei	7 (7,8 %)	7 (7,9 %)	18 (15,4 %)	1 (4,2 %)	1 (6,7 %)	34 (10,1 %)
	Em branco	0	0	2 (1,7 %)	0	0	2 (0,6 %)
Para onde vão esses “bichinhos” quando saem da pessoa?	Adequada	25 (27,8 %)	38 (42,7 %)	52 (44,4 %)	15 (62,5 %)	8 (53,3 %)	138 (41,2 %)
	Incompleta	8 (8,9 %)	5 (5,6 %)	8 (6,8 %)	1 (4,2 %)	0	22 (6,6 %)
	Inadequada	40 (44,4 %)	26 (29,2 %)	29 (24,8 %)	6 (25 %)	7 (46,7 %)	108 (32,2 %)
	Não sei	17 (18,9 %)	19 (21,3 %)	26 (22,2 %)	2 (8,3 %)	0	64 (19,1 %)
	Em branco	0	1 (1,1 %)	2 (1,7 %)	0	0	3 (0,9 %)
O que deve ser feito para não ter esses “bichinhos”?	Adequada	39 (43,3 %)	39 (43,8 %)	65 (55,6 %)	13 (54,2 %)	6 (40 %)	162 (48,4 %)
	Incompleta	25 (27,8 %)	16 (18 %)	11 (9,4 %)	5 (20,8 %)	2 (13,3 %)	59 (17,6 %)
	Inadequada	13 (14,4 %)	22 (24,7 %)	29 (24,8 %)	5 (20,8 %)	6 (40 %)	75 (22,4 %)
	Não sei	11 (12,2 %)	12 (13,5 %)	10 (8,5 %)	0	0	33 (9,9 %)
	Em branco	2 (2,2 %)	0	2 (1,7 %)	1 (4,2 %)	1 (6,7 %)	6 (1,8 %)
<i>P</i>		<0,001	0,7711	0,0153	0,0005	0,0969	

Teste Exato de Fisher  $p < 0,05$

**Tabela 4.** Resultado das respostas para cada pergunta presente no questionário de saberes preenchido por 62 funcionários de sete Escolas da Rede Pública de Ensino Fundamental de Niterói, RJ, Brasil entre agosto de 2014 e outubro de 2015

Pergunta	Adequação	A	B	C	D	E	F	G	Total
Número de funcionários		n=12	n=17	n=8	n=8	n=8	n=6	n=3	n=62
<b>O que são parasitoses intestinais?</b>	Adequada	7 (58,3 %)	8 (47,1 %)	3 (37,5 %)	6 (75,%)	6 (75 %)	4 (66,7 %)	2 (66,7 %)	36 (58,1 %)
	Incompleta	2 (16,7 %)	3 (17,6 %)	3 (37,5 %)	1 (12,5 %)	2 (25 %)	2 (33,3 %)	1 (33,3 %)	14 (22,6 %)
	Inadequada	2 (16,7 %)	5 (29,4 %)	2 (25 %)	0	0	0	0	9 (14,5 %)
	Não sei	1 (8,3 %)	0	0	1 (12,5 %)	0	0	0	2 (3,2 %)
	Em branco	0	1 (5,9 %)	0	0	0	0	0	1 (1,6 %)
<b>Parasito intestinal e vermes são sinônimos?</b>	Adequada	1 (8,3 %)	0	0	0	3 (37,5 %)	0	0	4 (6,5 %)
	Incompleta	1 (8,3 %)	1 (5,9 %)	1 (12,5 %)	1 (12,5 %)	0	0	0	4 (6,5 %)
	Inadequada	10 (83,3 %)	16 (94,1 %)	6 (75 %)	7 (87,5 %)	5 (62,5 %)	6 (100 %)	3 (100 %)	53 (85,5 %)
	Não sei	0	0	0	0	0	0	0	0
	Em branco	0	0	1 (12,5 %)	0	0	0	0	1 (1,6 %)
<b>Qual verme/parasito intestinal você conhece?</b>	Adequada	9 (75 %)	13 (76,5 %)	7 (87,5 %)	5 (62,5 %)	7 (87,5 %)	6 (100 %)	3 (100 %)	50 (80,6 %)
	Incompleta	0	1 (5,9 %)	0	0	0	0	0	1 (1,6 %)
	Inadequada	2 (16,7 %)	1 (5,9 %)	0	1 (12,5 %)	0	0	0	4 (6,5 %)
	Não sei	1 (8,3 %)	0	0	1 (12,5 %)	1 (12,5 %)	0	0	3 (4,8 %)
	Em branco	0	2 (11,8 %)	1 (12,5 %)	1 (12,5 %)	0	0	0	4 (6,5 %)
<b>O que são verminoses?</b>	Adequada	5 (41,7 %)	8 (47,1 %)	5 (62,5 %)	4 (50 %)	5 (62,5 %)	4 (66,7 %)	2 (66,7 %)	33 (53,2 %)
	Incompleta	0	2 (11,8 %)	2 (25 %)	0	0	0	0	4 (6,5 %)
	Inadequada	5 (41,7 %)	5 (29,4 %)	1 (12,5 %)	2 (25 %)	2 (25 %)	2 (33,3 %)	1 (33,3 %)	18 (29,9 %)
	Não sei	2 (16,7 %)	0	0	1 (12,5 %)	0	0	0	3 (4,8 %)
	Em branco	0	2 (11,8 %)	0	1 (12,5 %)	1 (12,5 %)	0	0	4 (6,5 %)
<b>Quem causa as parasitoses intestinais?</b>	Adequada	10 (83,3 %)	13 (76,5 %)	8 (100 %)	6 (75 %)	8 (100 %)	5 (83,3 %)	2 (66,7 %)	52 (83,9 %)
	Incompleta	0	0	0	0	0	0	0	0
	Inadequada	2 (16,7 %)	4 (23,5 %)	0	2 (25 %)	0	1 (16,7 %)	1 (33,3 %)	10 (16,1 %)
	Não sei	0	0	0	0	0	0	0	0
	Em branco	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Onde vivem os parasitos intestinais nas pessoas?</b>	Adequada	10 (83,3 %)	15 (88,2 %)	8 (100 %)	7 (87,5 %)	8 (100 %)	6 (100 %)	3 (100 %)	57 (91,9 %)
	Incompleta	1 (8,3 %)	1 (5,9 %)	0	0	0	0	0	2 (3,2 %)
	Inadequada	1 (8,3 %)	0	0	0	0	0	0	1 (1,6 %)
	Não sei	0	0	0	0	0	0	0	0
	Em branco	0	1 (5,9 %)	0	1 (12,5 %)	0	0	0	2 (3,2 %)
<b>Como as pessoas adquirem os parasitos intestinais?</b>	Adequada	9 (75 %)	15 (88,2 %)	7 (87,5 %)	4 (50 %)	7 (87,5 %)	4 (66,7 %)	2 (66,7 %)	48 (77,4 %)
	Incompleta	1 (8,3 %)	0	1 (12,5 %)	2 (25 %)	1 (12,5 %)	1 (16,7 %)	1 (33,3 %)	7 (11,3 %)
	Inadequada	2 (16,7 %)	2 (11,8 %)	0	2 (25 %)	0	1 (16,7 %)	0	7 (11,3 %)
	Não sei	0	0	0	0	0	0	0	0
	Em branco	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>O que a pessoa sente quando tem parasitos intestinais?</b>	Adequada	11 (91,7 %)	16 (94,1 %)	7 (87,5 %)	5 (62,5 %)	8 (100 %)	6 (100 %)	3 (100 %)	56 (90,3 %)
	Incompleta	0	0	1 (12,5 %)	2 (25 %)	0	0	0	3 (4,8 %)
	Inadequada	1 (8,3 %)	1 (5,9 %)	0	0	0	0	0	2 (3,2 %)
	Não sei	0	0	0	1 (12,5 %)	0	0	0	1 (1,6 %)
	Em branco	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Os parasitos intestinais são perigosos para nossa saúde? Por quê?</b>	Adequada	5 (41,7 %)	16 (94,1 %)	2 (25 %)	4 (50 %)	6 (75 %)	6 (100 %)	2 (66,7 %)	41 (66,1 %)
	Incompleta	6 (50 %)	1 (5,9 %)	5 (62,5 %)	3 (37,5 %)	2 (25 %)	0	1 (33,3 %)	18 (29 %)
	Inadequada	1 (8,3 %)	0	1 (12,5 %)	0	0	0	0	2 (3,2 %)
	Não sei	0	0	0	1 (12,5 %)	0	0	0	1 (1,6 %)
	Em branco	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>O que devemos fazer quando temos parasitos intestinais?</b>	Adequada	11 (91,7 %)	16 (94,1 %)	7 (87,5 %)	7 (87,5 %)	8 (100 %)	6 (100 %)	3 (100 %)	58 (93,5 %)
	Incompleta	0	0	1 (12,5 %)	0	0	0	0	1 (1,6 %)
	Inadequada	1 (8,3 %)	1 (5,9 %)	0	0	0	0	0	2 (3,2 %)
	Não sei	0	0	0	1 (12,5 %)	0	0	0	1 (1,6 %)
	Em branco	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>O que devemos fazer para evitar e/ou controlar as parasitoses intestinais?</b>	Adequada	10 (83,3 %)	17 (100 %)	7 (87,5 %)	6 (75 %)	7 (87,5 %)	5 (83,3 %)	2 (66,7 %)	54 (87,1 %)
	Incompleta	0	0	1 (12,5 %)	0	1 (12,5 %)	1 (16,7 %)	1 (33,3 %)	4 (6,5 %)
	Inadequada	2 (16,7 %)	0	0	2 (25 %)	0	0	0	4 (6,5 %)
	Não sei	0	0	0	0	0	0	0	0
	Em branco	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>P</b>		0.1625	0.4962	0.3661	0.0304	0.0112	0.1979	1.0000	

Teste Exato de Fisher  $p < 0,05$

sobre transmissão dos parasitos intestinais sem diferença estatística significativa entre as respostas dos escolares dos diferentes anos de escolaridade. Os estudantes associaram a transmissão com a sujeira ou comer doces.

Quando perguntados sobre o habitat, 47,5 % dos estudantes responderam adequadamente, afirmando que vivem na barriga/intestino. Dentre as respostas inadequadas foi indicado que os “bichinhos” vivem no estômago e, também, nas unhas.

Já em relação à sintomatologia, 45,1 % dos alunos do presente estudo responderam adequadamente, afirmando que a pessoa sente dor/dor na barriga, enjoos, coceira no bumbum e “passa mal”. Outra manifestação clínica apontada foi “coceira”, o que foi considerado como resposta inadequada.

Considerando o local para onde vão os parasitos intestinais quando saem das pessoas, 41,2 % responderam adequadamente. Observou-se diferença estatística significativa entre as respostas do terceiro ( $p= 0,0038$ ) e o sexto ( $p= 0,0323$ ) ano de escolaridade com relação aos demais anos de ensino. As respostas inadequadas indicaram outras partes do corpo como unha e cabeça.

Quanto às formas de prevenção das parasitoses, 48,4 % dos estudantes responderam de forma adequada, citando “tomar remédio”, “se cuidar/ter higiene”, “lavar as mãos” e “não andar descalço”. Dentre as respostas inadequadas, a mais observada foi “não comer doce para evitar parasitoses”.

Entre os 62 funcionários, houve pouca variação de respostas de uma escola para outra, sendo observadas respostas adequadas quanto a definição, exemplos, habitat, transmissão, sintomatologia e formas de prevenção/controle. Neste grupo ocorreram poucas respostas em branco ou “não sei”. Os resultados do questionário aplicado aos funcionários são apresentados na **Tabela 4**. Observou-se diferença estatística significativa entre as respostas dos funcionários das escolas D ( $p=0,0304$ ) e E ( $p=0,0112$ ) com o total de funcionários participantes. No grupo de funcionários participaram 50 professores e 12 profissionais com outras atribuições como corpo

administrativo, cozinha, limpeza e supervisão. Não houve divisão dos funcionários por atribuição devido a pequena adesão em cada categoria profissional.

Na definição de parasitoses intestinais houve relação a parasitos que vivem no intestino, sem explicitar se seriam vermes ou protozoários. Na definição de verminoses houve associação direta com vermes.

Conhecimentos inadequados foram obtidos quando questionados se parasito intestinal e vermes são sinônimos, visto que 85,5 % dos participantes responderam inadequadamente, afirmando que seriam sinônimos. As justificativas mais observadas foram: “verme é o nome popular do parasito” e “verme e parasitos são da mesma espécie”. Quando questionados quais parasitos intestinais/vermes conheciam, foram citados como exemplo “lombriga”, “ameba”, “giardia” e “solitária”.

## DISCUSSÃO

A análise dos questionários de saberes permitiu identificar desconhecimento de questões referentes a parasitoses intestinais, pois muitos estudantes responderam inadequadamente.

A maioria dos alunos (51,6 %) associaram verminoses a vermes. Mello et al<sup>7</sup> avaliaram o conhecimento de 88 indivíduos de uma Escola Estadual do município de São Carlos, SP, e verificaram que 82 pessoas conheciam helmintos, codificando as espécies por lombriga, solitária, verme, oxiúros, amarelão, entre outros. No entanto, todos desconheciam a palavra verminose. Silva e Leda<sup>18</sup> em estudo com 38 escolares do Rio de Janeiro verificaram que 50 % afirmaram já ter tido verminose e 97 % conheciam algum tipo de verminose, sendo lombriga a espécie mais assinalada (59 %). No presente estudo, apesar de ter ocorrido a associação entre verminoses e vermes, nenhum exemplo foi citado pelos estudantes, demonstrando a fragmentação do saber.

Por outro lado, em relação aos protozoários apenas 2,7 % dos estudantes apresentaram algum conhecimento sobre tais parasitos. Resultado semelhante foi observado por Nunes<sup>9</sup> em estudantes da Ilha de Marambaia. A autora



sugere que a dificuldade de visibilização desse grupo de agentes, por serem microscópicos, interfere no aprendizado do conteúdo, uma vez que os estudantes não conseguem materializar o agente parasitário. Outro fato que pode estar associado a essa falta de conhecimento pode ser devido a uma abordagem superficial do tema no ensino dos conteúdos de ciências<sup>9</sup>. O tema é pouco contemplado nos livros do sexto ano e abordado de forma superficial com poucos exemplos nos livros de sétimo ano, quando são apresentadas aos estudantes as questões relativas à classificação dos seres vivos. No currículo escolar a ampla diversidade de conteúdos e muitas vezes a dificuldade dos estudantes no aprendizado leva a equipe pedagógica a reduzir o conteúdo, e provavelmente esses temas podem ser excluídos, determinando ausência desse saber.

Dos 335 questionários analisados, 43,3 % detinham conhecimento inadequado sobre transmissão dos parasitos intestinais, porém sem diferença estatística entre os diversos anos de escolaridade. Resultados diferentes foram apontados por Siqueira e Fiorini<sup>6</sup> em estudo realizado com escolares do município de Alfenas, MG, onde as crianças em idade escolar e seus pais relataram corretamente a transmissão de verminoses associando a falta de hábitos higiênicos. O nível de escolaridade, no presente estudo, não interferiu no ganho desse tipo de informação, demonstrando ausência do mesmo no ensino ou desinteresse das crianças sobre o tema.

Na pergunta para onde iam os parasitos quando saem das pessoas, mais da metade dos estudantes relacionaram para o ambiente, embora tal informação não tenha sido associada à transmissão, o que pode favorecer exposição ao risco. Observou-se diferença estatística significativa considerando o terceiro e sexto ano de escolaridade em relação aos demais nessa questão. Esse fato, principalmente com relação ao sexto ano surpreendeu, uma vez que o conteúdo de ciências desse ano de ensino contempla o ambiente e geralmente são apresentadas algumas parasitoses.

Quanto ao habitat, forma de prevenção e sintomatologia evidenciou-se conhecimento adequado em cerca de 50 % dos estudantes, embora tenham ocorrido informações incompletas em

um pequeno grupo. O principal habitat apontado foi à barriga/intestino, embora erroneamente tenha sido também citado o estômago e as unhas. Siqueira e Fiorini<sup>6</sup> observaram respostas indicando corretamente a localização dos parasitos no intestino e também a indicação incorreta de estômago, como no presente estudo. A presença de informações mais corretas com relação a esses conteúdos talvez esteja associada ao enfoque de saúde que permeia o ensino de ciências.

Com relação à sintomatologia muitos estudantes apontaram “coceira” como um dos sintomas, o que pode ser relacionado à coceira perianal característica da parasitose causada pelo helminto *Enterobius vermicularis*. O correto conhecimento sobre sintomatologia foi apresentado nos estudos de Moraes Neto et al<sup>8</sup> que citaram respostas como dor de barriga, náuseas e vômitos e de Siqueira e Fiorini<sup>6</sup> que relataram também sintomas bastante específicos, como coceira no ânus, o que está de acordo com os resultados obtidos no presente estudo. Neste estudo supõe-se que esta sintomatologia pode ter sido informada de maneira incompleta devido à vergonha dos estudantes em informar que tal sintoma ocorre na região perianal ou a confusão com a coceira determinada pela pediculose.

Dentre as respostas inadequadas relacionadas à prevenção, a mais citada foi não comer doce para as evitar parasitoses, sendo essa informação também contemplada na transmissão. Moraes Neto et al<sup>8</sup>, estudando duas comunidades de Campos dos Goytacazes, observaram a associação entre doces e parasitoses intestinais, o que também foi citado por Siqueira e Fiorini<sup>6</sup>. Da mesma forma, Acka et al<sup>17</sup> por meio de entrevista com 207 moradores de duas aldeias da Costa do Marfim relataram que o consumo de carne e alimentos doces eram relacionados a aquisição de verminoses, sendo as parasitoses intestinais percebidas por 51 participantes como doença inata. A associação de ingestão de doces e parasitoses é apresentada por diversos autores, embora não haja em nenhum desses uma explicação para tal fato. Pensa-se que essa crença ocorre no espaço não formal devido ao quadro diarreico que é observado em algumas crianças após ingestão de grande quantidade de doces e que tenha

sido associado pelos pais ao quadro diarreico, que também pode ocorrer nas infecções por parasitos intestinais. Dessa forma, os pais passaram a utilizar esse discurso, que foi incorporado culturalmente sendo transmitido pela oralidade a gerações sucessivas.

De forma geral, as crianças das escolas E e F apresentaram conhecimentos com maior percentual de acerto e C e D com respostas mais inadequadas. Além disso, as escolas E e F foram as que obtiveram maior adesão, o que levou ao questionamento se o maior nível de conhecimento individual estaria associado a maior retorno de questionários respondidos.

O percentual médio de respostas corretas pode estar relacionado à aquisição de informações difundidas no espaço escolar, embora Mello et al<sup>7</sup> discutam que apesar da escola ser um espaço onde as informações são mediadas, outros meios de comunicação podem influenciar o aprendizado relacionado à saúde, como televisão, internet, jornal, dentre outros. Considerando que o sujeito se apropria de informações oriundas de diversas fontes, torna-se difícil estabelecer a origem do conhecimento expresso pelos participantes desse estudo.

Siqueira e Fiorini<sup>6</sup> apontaram que, embora as crianças sejam capazes de expressar conceitos corretos sobre parasitoses intestinais, como no presente estudo, as mesmas não mostram relação desse conhecimento com atitudes cotidianas. Além disso, foi observada dificuldade em estabelecer diferenças entre sintomatologia, diagnóstico e comportamentos preventivos com cuidados básicos de higiene pessoal e da alimentação. A transformação do saber em ação representa um dos principais problemas relacionados à promoção da saúde e as atividades educativas em saúde.

O fato de algumas crianças terem deixado perguntas em branco pode sugerir uma resistência dos mesmos para responder ao questionário. Resultado semelhante foi encontrado por Nunes<sup>9</sup>, ao trabalhar com escolares da Ilha de Marambaia, no qual a ausência de respostas foi entendida como indisposição de responder às perguntas. Essa resistência pode ser associada, nas escolas participantes desse estudo, aos

diferentes graus de letramento dos estudantes e de interpretação das perguntas. Esse fato também pode ter interferido no percentual de respostas adequadas. Pode-se verificar que em várias escolas do município de Niterói as turmas apresentavam-se heterogêneas e com turmas de aceleração, caracterizadas essas últimas pela presença de estudantes inseridos no ano de ensino adequado a sua faixa etária, porém com dificuldade para ler e escrever. A vergonha de não saber pode ter contribuído para as respostas em branco e “não sei”.

Entre os funcionários, houve pouca variação de respostas de uma escola para outra, embora tenha sido obtida diferença estatística significativa entre os funcionários das escolas D e E com relação ao total. Essas diferenças foram associadas a desconhecimento individual dos participantes, uma vez que houve maior adesão de professores que informaram ter formação superior do que de funcionários. Além disso, a análise dos 62 questionários permitiu evidenciar que os profissionais participantes do estudo detinham conhecimento mais corretos referente às parasitoses intestinais, tais como definição, exemplos, habitat, transmissão, sintomatologia e formas de prevenção/controle, visto que quando questionados, respondiam de forma mais completa do que as crianças. Ocorreu menor número de respostas “não sei” ou em branco. Esse fato pode ser associado a escolha voluntária em participar do estudo, já que dentre as crianças, mesmo com anuência individual, a escolha parte mais dos pais do que do escolar.

Busato et al<sup>15</sup> apontaram que as pessoas detêm informações sobre parasitoses intestinais como, por exemplo, lugares que podem ser contaminados com parasitos, como a água, a terra e os alimentos. Porém, para os autores, a população não é capaz de relacionar a eliminação dos parasitos à contaminação ambiental ou ainda à contaminação fecal-solo-doença, o que concorda com os resultados do presente estudo. Acka et al<sup>17</sup> relataram que pela técnica de grupo focal com moradores da Costa do Marfim não houve associação entre a infecção por vermes intestinais e contato com o solo.

Apesar de terem definido corretamente parasitose intestinal, o que pode ter sido induzido pela própria pergunta, verificou-se que os funcionários participantes apresentaram conhecimentos inadequados quando questionados se parasito intestinal e vermes são sinônimos. As justificativas mais observadas foram “verme é o nome popular do parasito” e “verme e parasitos são da mesma espécie”. Este fato pode refletir que os mesmos desconheciam o que são protozoários, embora tenham citado nos exemplos, alguns protozoários como amebas e giárdia. Outra suposição para essa questão é a dificuldade em definir termos utilizados na rotina. No relatado acima os funcionários podiam conhecer os nomes, porém não sabiam a que grupo cada um desses agentes pertencia, uma vez que definiram os dois termos como sinônimos.

Moraes Neto et al<sup>8</sup> relataram que em duas comunidades de Campos dos Goytacazes a população tinha sua codificação própria para parasitos intestinais sendo as mais comuns: “lombriga”, “giardia”, “solitária” ou “tênia” o que foi similar ao do presente estudo. Segundo Mello et al<sup>7</sup>, a indicação de nomes vulgares de parasitos mostraram que a população detém uma codificação para identificação de helmintoses, assim como conceituação própria sobre sinais e sintomas, aspectos epidemiológicos e formas de tratamento. Essas informações são de fundamental importância para o planejamento das campanhas e projetos educacionais em verminoses. Muitas vezes observa-se na prática de diversos profissionais da área de saúde a falta de tempo e interesse em explicar detalhadamente as informações, o que favorece a aquisição de saberes fragmentados que são internalizados pelo sujeito e propagados de forma incorreta.

Para Busato et al<sup>15</sup>, é necessário atuar com medidas que estimulem mudanças comportamentais em relação ao autocuidado, prevenção e profilaxia das parasitoses, no intuito de melhorar a qualidade de vida da população e, dessa forma, minimizar a infecção por parasitos. Segundo os autores, faz-se necessário o desenvolvimento de atividades de educação em saúde pelos profissionais da área, além de um maior enfoque sobre o tema em escolas e grupos

comunitários para que as pessoas, famílias e comunidades busquem meios de enfrentar as vulnerabilidades presentes no ambiente em relação às enteroparasitoses.

## CONCLUSÃO

A presença de informações fragmentadas sobre parasitoses intestinais entre os diversos anos de ensino, como as evidenciadas nas Escolas Municipais de Niterói, reforça a necessidade de implementação de ações educativas lúdicas estimulando a participação e a aquisição da informação por parte dos estudantes e funcionários. Torna-se importante despertar o professor para trabalhar essas questões em sala de aula, possibilitando o fortalecimento desse conteúdo dentro do ensino de ciências, e com isso a ampliação do conhecimento correto e sólido, o que poderá vir a interferir no empoderamento da comunidade alvo com relação a parasitoses intestinais e melhora na qualidade de vida.

---

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES, PROPPI/FOPESQ – UFF, PROEX – UFF e PIBIC – UFF pela concessão de bolsas e auxílio financeiro e à Fundação Municipal de Niterói pelo apoio ao presente estudo.

---

## REFERÊNCIAS

1. Siqueira LO, Albarello K, Younes S, Hahn S. Diagnóstico de anemia e parasitoses em crianças em situação de vulnerabilidade social. *Rev Dialogos*. 2011;16(2):18-25.
2. Ojha SC, Jaide C, Jinawath N, Rotjanapan P, Baral P. Geohelminths: public health significance. *J Infect Dev Ctries*. 2014;8(1):5-16. [DOI: 10.3855/jidc.3183].

3. Cunha GM, Moraes LRS, Lima AGD, Silveira PSDM, Frediani DA. Prevalência da infecção por enteroparasitas e sua relação com as condições socioeconômicas e ambientais em comunidades extrativistas do município de Cairu-Bahia. *REEC, Rev Eletrônica Eng Civ*. 2013;7(2):27-32. [DOI: <http://dx.doi.org/10.5216/reec.v7i2.27445>].
4. Dhanabal J, Selvadoss PP, Muthuswamy K. Comparative study of the prevalence of intestinal parasites in low socioeconomic areas from South Chennai, India. *J Parasitol Res*. 2014;2014:630968. [DOI: [10.1155/2014/630968](http://dx.doi.org/10.1155/2014/630968)].
5. Almeida Maia CV, Hassum IC, Valladares GS. Parasitoses intestinais em usuários do SUS em Limoeiro do Norte, Ceará, antes de expansão de sistema de esgotamento sanitário. *Holos*. 2015;2:98-109. [DOI: <http://dx.doi.org/10.15628/holos.2015.1973>].
6. Siqueira RV, Fiorini JE. Conhecimentos e procedimentos de crianças em idade escolar frente às parasitoses intestinais. *Rev Univ Alfenas*. 1999;5:215-20.
7. Mello DA, Pripas S, Fucci M, Santoro MC, Pedrazzani ES. Helminthoses intestinais. I – Conhecimentos, atitudes e percepção da população. *Rev Saude Publica*. 1988;22(2):140-9.
8. Moraes Neto AH, Pereira AP, Alencar MF, Souza PR Jr, Dias RC, Fonseca JG et al. A. Prevalence of intestinal parasites versus knowledge, attitudes and practices of inhabitants of low-income communities of Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro State, Brazil. *Parasitol Res*. 2010;107(2):295-307. [DOI: [10.1007/s00436-010-1861-7](http://dx.doi.org/10.1007/s00436-010-1861-7)].
9. Nunes BC. Parasitoses intestinais na ilha da Marambaia, Mangaratiba – RJ e intervenção educativa [dissertação de mestrado]. Niterói (RJ): Universidade Federal Fluminense; 2012.
10. Silva JC, Furtado LF, Ferro TC, Bezerra Kde C, Borges EP, Melo AC. Parasitismo por *Ascaris lumbricoides* e seus aspectos epidemiológicos em crianças do Estado do Maranhão. *Rev Soc Bras Med Trop* 2011;44(1):100-2. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822011000100022>].
11. Corazza-Nunes MJ, Pedrancini VD, Bellanda MT, Olivio AL, Ribeiro AC. Implicações da mediação docente nos processos de ensino e aprendizagem de biologia no ensino médio. *Rev electrón enseñ cien*. 2006;5(3):522-33.
12. Nascimento AM, De Luca Junior W, Santos RL, Dolabella SS. Parasitologia Lúdica: O jogo como agente facilitador na aprendizagem das parasitoses. *Sci Plena*. 2013;9(7)1-6.
13. Frezza TF, Corrêa SA, Santos-Rondon MV, Prado CS, Bastos LA, Allegretti SM. Alunos do ensino médio de escolas da rede pública de Campinas-SP atuando como produtores de conhecimento sobre parasitoses: uma experiência do laboratório de helmintologia (UNICAMP) no programa “Ciência e Arte nas Férias”. *Rev Conex UEPG*. 2015;11(2):128-139. [DOI: [10.5212/conexao.v11i2.7449](http://dx.doi.org/10.5212/conexao.v11i2.7449)].
14. Dias DD, Menezes RA, Souza MJ, Barbosa FH, Andrade FR, Souto RN. Fatores de riscos que contribuem para as parasitoses intestinais em crianças de 0 a 5 anos em Macapá – Amapá, Brasil. *Cien Equatorial*. 2013;3(1):17-28.
15. Busato MA, Dondoni DZ, Rinaldi AL, Ferraz L. Parasitoses intestinais: o que a comunidade sabe sobre este tema? *Rev Bras Med Fam*. 2015;10(34):1-6.
16. Gomes Dos Santos M, Moreira MM, Malaquias MLG, Schall VT. Educação em saúde em escolas públicas de 1º grau de periferia de Belo Horizonte, MG, Brasil. II: Conhecimentos, opiniões e prevalência de helmintiasises entre alunos e professores. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1993;35(6):573-9.

17. Acka CA, Raso G, N'goran EK, Tschannen AB, Bogoch II, Séraphin E et al. Parasitic Worms: Knowledge, Attitudes, and Practices in Western Côte d'Ivoire with Implications for Integrated Control. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(12):e910. [DOI:10.1371/journal.pntd.0000910].
18. Silva TV, Leda LR. Intervenções educativas sobre parasitoses intestinais: aplicação de um jogo para alunos do Ensino Fundamental. *Saúde ambiente rev*. 2013;7(2):23-37.
19. Cadario da Silva PM, Martins ER, Matos WR. Parasitoses intestinais: uma abordagem lúdica numa Escola Pública do Município de Duque de Caxias, RJ. *Saúde ambiente rev*. 2013;8(1):43-53.



# Mumps virus genotypes identified during disease outbreaks in the state of São Paulo, Brazil: 2011 – 2016

## Genótipos dos vírus da caxumba identificados durante surtos da doença no estado de São Paulo, Brasil: 2011 - 2016

RIALA6/1712

Daniela Bernardes Borges da SILVA<sup>1</sup>, Cecília Luiza Simões SANTOS<sup>2</sup>, Katia Corrêa de Oliveira SANTOS<sup>1</sup>, Márcia THEOBALDO<sup>1</sup>, Renato de Sousa PAULINO<sup>1</sup>, Norio Augusto Sasaki<sup>1</sup>, Margarete Aparecida BENEÇA<sup>1</sup>, Terezinha Maria de PAIVA<sup>1\*</sup>

\*Corresponding author: <sup>1</sup>Laboratório de Vírus Respiratórios, Núcleo de Doenças Respiratórias, Centro de Virologia, Instituto Adolfo Lutz. Av. Dr. Arnaldo, 355, São Paulo, SP, Brazil. CEP: 01246-000. Tel: 11 3068 2913. E-mail: terezinha@uol.com.br

<sup>2</sup>Centro de Virologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo

Recebido: 06.09.2016 - Aceito para publicação: 06.12.2016

### ABSTRACT

In São Paulo the mumps virus (MuV) outbreaks have been increasing from 2011 to nowadays. MuV epidemiological surveillance has been improving by using the polymerase chain reaction in real time (rRT-PCR) in addition to the specific IgM antibody (IgM-Ab) detection; in some cases, genome sequencing studies were performed. Increased virus transmission and recent outbreaks have raised interest on MuV genotyping, as a means to understand the transmission pathways and to identify the vaccine-associated cases. From January 2011 to August 2016, MuV infection was analyzed at Institute Adolfo Lutz. A total of 232 (77.33 %) throat wash samples showed positivity to mumps genome, and 68 (22.66 %) were negative when analyzed by rRT-PCR. Among 15 samples for molecular analysis, 10 serum samples from respective patients were also available for detecting anti-MuV IgM-Ab; and from these, four (40%) samples were seropositive. Vaccination status was available only for patients from Cedral and Araraquara. Phylogenetic analysis revealed the circulation of the following mumps virus genotypes in the investigated periods: 2011(M), 2012, and 2013 (K); 2014 (N); 2015 (G, K, and N); 2016 (G). Knowledge on MuV molecular epidemiology in São Paulo-Brazil could contribute to the surveillance and epidemiological program in Brazil, and globally as well.

**Keywords.** mumps virus, molecular epidemiology, public health.

### RESUMO

No estado de São Paulo têm ocorrido surtos de caxumba desde 2011. O diagnóstico laboratorial tem sido realizado no Instituto Adolfo Lutz utilizando-se a técnica de identificação de material genético viral por meio de reação de cadeia de polimerase-em tempo real (rRT-PCR) e pela detecção de anticorpos IgM (Ac-IgM) específicos circulantes. Os recentes surtos de caxumba têm aumentado o interesse em investigar os genótipos dos vírus prevalentes para identificar os casos associadas à vacina. De janeiro de 2011 a agosto de 2016, 300 amostras de lavados da orofaringe coletadas de pacientes suspeitos de infecção foram analisadas. O material genético viral específico foi detectado em 232 (77,33 %) amostras e 68 (22,66 %) foram negativas. Das 10 amostras analisadas pelo teste sorológico, quatro (40 %) demonstraram positividade para Ac-IgM específicos anti-vírus da caxumba e seis foram negativas. Somente os municípios Cedral e Araraquara forneceram os dados referentes à vacinação. Análise filogenética mostrou a circulação dos seguintes genótipos do vírus da caxumba no período investigado: 2011 (M), 2012 e 2013 (K); 2014 (N); 2015 (GKN); 2016 (G). A vigilância virológica é mundialmente imprescindível, para identificar a diversidade e a distribuição dos diferentes genótipos, com vistas à composição de vacinas específicas.

**Palavras-chave.** vírus da caxumba, epidemiologia molecular, saúde pública.

**Introduction** - Mumps (or epidemic parotitis) is an acute infectious disease caused by mumps virus (MuV) characterized by parotid gland swelling. Although the main clinical manifestation of mumps are parotitis (90 % of cases), several other clinical complications as aseptic meningitis, transient deafness, encephalitis, orchitis, oophoritis have been observed<sup>1</sup>. At the time when no specific vaccine product was available, the aseptic meningitis was the most common clinical evidence of mumps. The live attenuated mumps vaccine was first licensed in the USA in 1967; and it has been widely used as a component of the trivalent measles-mumps-rubella (MMR) vaccine ever since. In the state of São Paulo-Brazil, the MMR vaccine program was introduced in 1992 for immunizing children from 01 to 10 years old. The literature data show that the campaign for MuV vaccination has substantially contributed to the decrease of this disease incidence<sup>2</sup>. The lifelong protection for many years due to the natural infection, and in addition to the widespread vaccination appeared to be an approach to control the disease. Re-infection with MuV could occur worldwide by means of natural infection or after vaccination; and owing to these characteristics, this infectious disease is considered as a global Public Health issue. Increased transmissions and recent outbreaks<sup>3-5</sup> emphasize the relevance of the MuV surveillance activities for generating the baseline genetic data. This information aimed at mapping the genotype distribution in the different continents, to identify the vaccine-associated cases<sup>1</sup>. The review published by Li Jin et al<sup>6</sup> showed that only six of the 12 MuV genotypes have been circulating since 2010, including genotypes G (52 %), H (16 %), C (12 %), F (8 %), K (8 %) and D (4 %), based on the baseline genetic data provide by 25 countries. In São Paulo state the MuV outbreaks have been notified by the Epidemiological Surveillance Center of the State Department of Health, São Paulo-Brazil. Laboratory confirmation is based on the detection of MuV-specific IgM antibodies in acute-phase serum samples, and the MuV isolation is performed by cell culture methodology. Virus isolation is a time-consuming technique considering

the needs for achieving a rapid diagnosis. The MuV-specific IgM antibody might be undetectable in the early samples collected at the time less than three days after the mumps symptoms onset, and in samples collected from previously vaccinated individuals<sup>7,8</sup>. Thus, Boddicker et al<sup>9</sup> developed and validated a mumps real-time RT-PCR (rRT-PCR) for improving the sensitivity of PCR assay to detect MuV in clinical samples from patients. This molecular methodology is considered as a valuable tool to detect the MuV RNA directly from clinical samples, as throat wash, collected from patients presenting MuV-specific clinical symptoms. MuV outbreaks have been notified by several countries including Brazil. The present study aimed at investigating the MuV genotypes involved in the mumps outbreaks occurred in the state of São Paulo, Brazil. The obtained results were compared with those described by authors from other countries, taking into account the limited data globally available.

**Material and methods** - From June 2011 to August 2016 the Respiratory Virus Laboratory of the Respiratory Disease Department-Virology Center - Institute Adolfo Lutz (IAL) received 300 throat wash samples collected from patients with suspected mumps. Virus identification was performed by means of the Centers for Disease Control and Prevention - polymerase chain reaction in real time (CDC-rRT-PCR) protocol, kindly provided by Dr. Paul Rota. The virus sequencing reaction was performed as described elsewhere<sup>9</sup>, by using 3130 Applied Biosystems. Nucleotide sequences were aligned using the multiple sequence alignment method implemented in CLUSTAL X<sup>9</sup>. Considering that the molecular assay provides rapid diagnosis, the physicians worldwide prefer to perform the patients follow-up diagnosis by using rRT-PCR. The laboratory diagnosis of mumps has been carried out at IAL only, and being a Public Health Institute, in addition to the rRT-PCR molecular technique, the health centers of some municipalities of the São Paulo state use to sent the blood samples for performing the serological testing for parotitis diagnosis. This assay detects the anti-MuV-specific IgM antibodies in acute-phase

serum samples. Therefore, the received 10 serum samples and stored at -70 °C were analyzed by serological assay, using commercial kit Enzygnost ELISA (anti-parotitis virus/IgM - Siemens, Germany).

**Results** - Of 300 throat wash samples, 232 (77.33 %) and 68 (22.66 %) showed positive and negative results on rRT-PCR, respectively. Among 15 (100 %) patients included in the **Table**, the respective serum samples from 10 (66.70 %) were picked out and sent to IAL, and they were analyzed by serological testing. Of these 10 samples, four (40 %) were positive for anti-MuV-specific IgM antibodies and the respective throat-wash sample was also positive on MuV-rRT-PCR. And six (60 %) sera were anti-MuV-specific IgM negative, but MuV infection was confirmed by rRT-PCR technique.

Of 300 specimens received at IAL from 2011 to 2016, 212 (79.69 %) were collected from January 2015 to August 2016. Nine genotypes were identified in this period, five (60 %), two (20 %) and two (20 %) corresponded to the G, K, and N genotypes, respectively. Vaccination data were available for patients from Cedral and Araraquara municipalities only (**Table**). Although the vaccination information were available for three (20 %) patients, all of them (100 %) showed positive rRT-PCR for MuV. The phylogenetic analysis revealed the circulation of the following mumps genotypes in the investigated period: 2011 (M), 2012 and 2013 (K); 2014 (N); 2015 (G, K, and N); 2016 (G). The common symptoms of parotitis and fever among the investigated patients were clinically confirmed.

**Table.** Origin of Brazilian mumps virus investigated in this study

Samples identification*	Location	Patients age (year/sex)	Date of onset (month/year)	Specimen	Vaccine status	IgM serology
MuVi/Assis-SP.BRA/NK.11[K]	Assis	15/F	May/12	Throat wash	NK	NK
MuVi/Guarulhos-SP.BRA/37.12/2[K]	Guarulhos	37/M	Sep/12	Throat wash	NK	NK
MuVi/Guarulhos-SP.BRA/37.12/2[K]	Guarulhos	23/M	Sep/12	Throat wash	NK	NK
MuVi/São Paulo -SP.BRA/37.13/2[K]	São Paulo	15/M	Sep/13	Throat wash	NK	NEG
MuVi/São Paulo -SP.BRA/37.13/2[K]	São Paulo	14/M	Sep/13	Throat wash	NK	POS
MuVi/São Paulo -SP.BRA/44.14[N]	São Paulo	14/M	Nov/14	Throat wash	NK	NEG
MuVi/Florianópolis -SC.BRA/11.15[G]	Florianópolis	20/M	Mar/15	Throat wash	NK	NK
MuVi/Cedral -SP.BRA/28.15[G]	Cedral	15/F	Jul/15	Throat wash	Yes	NEG
MuVi/Campinas -SP.BRA/39.15[G]	Campinas	20/M	Out/15	Throat wash	NK	NEG
MuVi/São Paulo -SP.BRA/31.15[N]	São Paulo	19/F	NK	Throat wash	NK	POS
MuVi/São Paulo -SP.BRA/32.15[N]	São Paulo	27/F	Aug/15	Throat wash	NK	POS
MuVi/Itatiba-SP.BRA/43.15[G]	Itatiba	10/F	Out/15	Throat wash	NK	POS
MuVi/Araraquara-SP.BRA/42.15[K]	Araraquara	19/F	Nov/15	Throat wash	Yes	NEG
MuVi/Araraquara-SP.BRA/41.15[K]	Araraquara	20/F	Nov/15	Throat wash	Yes	NK
MuVi/Campinas-SP.BRA/52.15[G]	Campinas	20/M	Jan/16	Throat wash	NK	NEG

NK, not know. \*Assigned according to the standardized nomenclature proposed by WHO, 2012



**Discussion** - The present study reports the circulation of MuV genotype N, in the state of São Paulo during the period from 2014 to 2015, which has not been included in the recent review focusing on the baseline genetic data provided by 25 countries<sup>6</sup>. Genotype G has been predominating in Brazil, and this genotype has been circulating in the state of São Paulo in 2015 and in the early of 2016; and according to Li Jin et al<sup>6</sup> the genotype G has been the predominating MuV worldwide, until now. The increase of MuV outbreaks worldwide and the diversity of MuV genotypes arises a question on the cross-protection among the MuV vaccines, accordingly to their genotypes composition and the circulating mumps wild viruses; and investigations on this issue are warranted<sup>10</sup>. Limitations regarding the MuV-specific IgM antibody detection have already observed. Of the 10 serum samples received for performing the serologic testing, four (40 %) were positive for anti-MuV specific IgM antibody and also MuV-rRT-PCR was positive; and six (60 %) sera showed negative results in this serological assay. However, the MuV infection was confirmed by rRT-PCR technique, as shown in **Table**. These results highlight the advice of collecting the blood samples three days or more after the clinical symptoms onset, for improving the sensitivity and specificity of MuV-specific IgM antibody detection, as recommended in the previous studies<sup>1</sup>. Also, limitation regarding the vaccination data was evidenced in this study. Of three (20 %) vaccinated patient, the throat-wash samples collected from all of them showed positive results on MuV/rRT-PCR, and these data revealed MuV re-infection. There is a consensus on the need to follow the studies on genotype cross-neutralization, aiming at establishing whether the genetic variation could lead to the vaccine failure<sup>10</sup>. Of 300 specimens sent to IAL from 2011 – 2016, 212 (79.69 %) were collected from January 2015 to August 2016. In this period, of nine identified genotypes, five (60 %), two (20 %), two (20 %) corresponded to genotypes G, K, N, respectively. These data highlighted a similar distribution of MuV

genotype G in the state of São Paulo, when compared with a recent review on MuV genotypes circulating worldwide, even at limited baseline genetic data considering the global context<sup>1,6</sup>.

**Conclusion** - Phylogenetic analysis revealed the circulation of the following mumps genotypes in the state of São Paulo during the period from 2011 to 2016: 2011 (M), 2012 and 2013 (K); 2014 (N); 2015 (G, K, N); 2016 (G). Li Jin et al<sup>6</sup> review showed that only six of the 12 mumps genotypes have been circulating since 2010, including the genotypes G, H, C, F, K, D based on the analyzed mumps viruses by 25 countries. The present study showed that the genotype N has also been circulating in the state of São Paulo, Brazil, evidencing that how is important to participate in the MuV surveillance in order to improve the worldwide MuV baseline genetic data. In addition, taking into account the vaccine era, a global effort to follow mumps virus surveillance is warranted.

---

## ACKNOWLEDGEMENTS

Our gratitude to Nilva Matias dos Reis, Ana Lúcia de Carvalho Avelino for technical support. We also thank the personnel of the Epidemiological Surveillance Center of the State Department of Health, São Paulo, Brazil

---

## REFERENCES

1. WHO. Mumps virus nomenclature update: 2012. *Wkly Epidemiol Rec*. 2012;87 (22):217–24.
2. Hviid A, Rubin S, Mühlemann K. Mumps. *Lancet*. 2008;371:932-44. [DOI:10.1016/S0140-6736(08)60419-5].
3. Albertson JP, Clegg WJ, Reid HD, Arbise BS, Pryde J, Vaid A, et al. Mumps Outbreak at a University and Recommendation for a Third Dose of Measles-Mumps-Rubella Vaccine — Illinois, 2015–2016. *MMWR Morb.Mortal. Wkly Rep*. 2016;65(29):731–34. [DOI:10.15585/mmwr.mm6529a2].

4. Kutty PK, McLean HQ, Lawler J, Schulte C, Hudson JM, Blog D, et al. Risk factors for transmission of mumps in a highly vaccinated population in Orange County, NY, 2009-2010. *Pediatr Infect Dis J*. 2014;33(2):121-5. [DOI:10.1097/INF.000000000000020].
5. Park SH. Resurgence of mumps in Korea. *Infect Chemother*. 2015;47(1):1-11. [DOI:10.3947/ic.2015.47.1.1].
6. Jin L, Örvell C, Myers R, Rota PA, Nakayama T, Forcic D, et al. Genomic diversity of mumps virus and global distribution of the 12 genotypes. *Rev Med Virol*. 2015;25:85-101. [DOI:10.1002/rmv.1819].
7. Jin L, Brown DW, Litton PA, White JM. Genetic diversity of mumps virus in oral fluid specimens: application to mumps epidemiological study. *J Infect Dis*. 2004;189 (6):1001-8. [DOI:10.1086/382134].
8. Jin L, Vyse A, Brown DW. The role of RTPCR assay of oral fluid for diagnosis and surveillance of measles, mumps and rubella. *Bull World Health Organ*. 2002;80(1):76-7.
9. Boddicker JD, Rota PA, Kreman T, Wangeman A, Lowe L, Hummel KB, et al. Real - time reverse transcription - PCR assay for detection of mumps virus RNA in clinical specimens. *J Clin Microbiol*. 2007;45(9): 2902-8. [ DOI:10.1128/JCM.00614-07].
10. Echevarría JE, Castellanos A, Sanz JC, Martínez de Aragón MV, Peña Rey I, Mosquera M, et al. Mumps virus genotyping: Basis and Known circulating genotypes. *Open Vaccine J*. 2010;3:37-41.



## Resíduos de pesticidas e compostos perfluorados em águas: avaliação da exposição da população através do consumo

### Residues of pesticides and perfluorinated compounds in waters: population exposure assessment through consumption

RIALA6/1713

Schwanz TG. Resíduos de pesticidas e compostos perfluorados em águas: avaliação da exposição da população através do consumo. Santa Maria, RS. 2015. [Tese de Doutorado – Área de Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais. Universidade Federal de Santa Maria – UFSM]. Orientador: Ijoni Costabeber

A contaminação dos recursos hídricos tem causado grande impacto para o meio ambiente. A água constitui-se na maior fonte de alimentação humana e seu valor para a saúde é incalculável. Apesar disso, a presença de contaminantes em águas para o consumo no Brasil é um tema pouco pesquisado e com escassas fontes de informação. As principais contaminações nas águas potáveis ocorrem diretamente pela ação do homem, através do uso abusivo de agrotóxicos ou por contaminantes ambientais, com alta capacidade de bioacumulação no meio ambiente, como os compostos perfluorados e organoclorados. Estes compostos estão presentes nas águas em níveis de traços, portanto, metodologias analíticas adequadas, a fim de mostrar que o método é apropriado, garantindo a confiabilidade dos resultados são necessárias. Este estudo apresenta dois métodos multirresiduais para determinação de compostos perfluorados (PFCs) e para determinação de agrotóxicos em amostras de água de torneira, água engarrafada e água subterrânea coletadas no Brasil, Espanha e França. Para os PFCs foi utilizado o método de extração em fase sólida automatizada “em linha” com a injeção direta da amostra acoplada a espectrometria de massas, com limites de detecção entre 0,15 e 8,76 ng/L. Já a determinação de agrotóxicos foi realizada a partir de extração em fase sólida e análise por técnicas distintas de separação e ionização, LC-ESI-MS/MS, GC-MS/EI e GC-MS/NCI, com limites de detecção entre 1,02 e 48,21 ng/L. Os resultados obtidos mostraram que as águas de torneira apresentam alta concentração de PFCs, especialmente no Brasil, com média de 15,83 ng/L, seguidos pela Espanha e França com 15,33 e 7,73 ng/L, respectivamente. Para as análises de agrotóxicos, os dados encontrados evidenciaram que as águas subterrâneas obtidas no Brasil apresentaram as maiores concentrações dos contaminantes investigados, em comparação com as águas de torneira e águas engarrafadas. Em relação ao risco de exposição pela ingestão através do consumo de água, os PFCs representam um perigo maior (estimado em 54,8, 58,0 e 75,6 ng/indivíduo por dia na Espanha, França e Brasil) em relação aos agrotóxicos (23,10, 29,40, 30,11 ng/indivíduo por dia na Espanha, França e Brasil, respectivamente). Contudo, apesar dos níveis encontrados, em nenhum dos países investigados, o consumo de água potável coloca em risco iminente a contaminação associada à PFCs e agrotóxicos.

**Palavras-chave.** água, PFCs, agrotóxicos, Brasil, Espanha, França.

Tese disponível na Biblioteca do Centro de Ciências Rurais da  
Universidade Federal de Santa Maria - UFSM  
E-mail: ijonicostabeber@gmail.com



## Resíduos de fungicidas em vinhos de diferentes propriedades vitivinícolas do Rio Grande do Sul, Brasil, frente ao uso da tecnologia *thermal pest control* a campo

Fungicide pesticides residues in wines of wine properties of Rio Grande do Sul, Brazil, regarding the use of thermal pest control technology in the fields

RIALA6/1714

Mozzaquatro JO. Resíduos de fungicidas em vinhos de diferentes propriedades vitivinícolas do Rio Grande do Sul, Brasil, frente ao uso da tecnologia *thermal pest control* a campo. Santa Maria, RS. 2015. [Dissertação de Mestrado – Área de Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais. Universidade Federal de Santa Maria – UFSM]. Orientador: Ijoni Costabeber. Coorientador: Osmar Damian Prestes

O uso de compostos químicos em vitivinicultura é extremamente elevado. Neste sentido, torna-se oportuno analisar resíduos de pesticidas em vinhos, pois as uvas figuram a lista de maior número de aplicações de pesticidas na agricultura do país. Com intuito de reduzir o uso de pesticidas, alguns vitivinicultores utilizam a tecnologia *Thermal Pest Control* (TPC) no manejo de seus vinhedos, como forma alternativa no combate às pragas. Trata-se de uma tecnologia que gera e fornece elevadas temperaturas às videiras, conferindo uma maior resistência microbiana. O objetivo deste estudo foi analisar fungicidas em vinhos brancos e tintos, oriundos de propriedades vitivinícolas do Rio Grande do Sul, produzidos a partir de uvas com e sem o emprego da tecnologia TPC durante o seu cultivo. Foram utilizadas amostras das variedades Tannat, Chardonnay e Cabernet Sauvignon nas safras 2011/2012, 2012/2013 e 2013/2014. Realizaram-se vinificações em escala laboratorial e separadamente para aquelas uvas sem o emprego da tecnologia TPC (controle) daquelas que fizeram uso desta (com TPC). No preparo das amostras utilizou-se o método QuEChERS modificado. Após, as análises procederam-se em UHPLC-MS/MS para determinação dos fungicidas. Boscalida, procimidona, piraclostrobina, pirimetanil, tetraconazol e tiofanato-metílico foram detectados acima do LOQ em ambos os tratamentos. Nos tratamentos, controle e com TPC, o pirimetanil obteve maior frequência (85,71 %) e médias (26,33 e 30,16  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), respectivamente. Não houve diferença significativa para os dois tipos de vinhos (tintos e brancos). Nos vinhos da cv. Chardonnay, safra 2012/2013, o fungicida pirimetanil diferiu estatisticamente ( $p=0,021$ ), com média de 64,67  $\mu\text{g L}^{-1}$  (controle), e de 111,12  $\mu\text{g L}^{-1}$  (com TPC). Já nos vinhos da cv. Chardonnay, safra 2013/2014, o procimidona apresentou média superior no controle (6,47  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), do que no tratamento com TPC (0,46  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). E nos vinhos da cv. Cabernet Sauvignon, safra 2013/2014 o composto procimidona obteve média superior para o tratamento com TPC (129,73  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), do que ao controle (3,69  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Diante do exposto, a presença de resíduos de fungicidas foi confirmada neste estudo, porém nenhum dos compostos mostrou-se acima dos LMRs estabelecidos para as uvas, considerando suas correções de massa. Tais resultados demonstraram concentrações de resíduos superiores para aqueles vinhos produzidos a partir de uvas submetidas à tecnologia TPC. Não foram encontradas referências na literatura que abordem resíduos de fungicidas em vinhos, cujas uvas fossem submetidas a esta tecnologia, o que nos leva a deduzir que este seja o primeiro estudo realizado sobre o tema.

**Palavras-chave.** *thermal pest control*, fungicidas, Rio Grande do Sul, vinhos.

Dissertação disponível na Biblioteca do Centro de Ciências Rurais da  
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM  
E-mail: ijonicostabeber@gmail.com



# Agrotóxicos em doces de frutas em pasta: determinação de resíduos por $\mu$ LC-QTRAP-MS/MS e estudo de estabilidade

## Pesticides in fruit jams: residues determination by $\mu$ LC-QTRAP-MS/MS and stability study

RIALA6/1715

Reichert B. Agrotóxicos em doces de frutas em pasta: determinação de resíduos por  $\mu$ LC-QTRAP-MS/MS e estudo de estabilidade. Santa Maria, RS. 2015. [Tese de Doutorado – Área de Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais. Universidade Federal de Santa Maria – UFSM]. Orientador: Ijoni Costabeber. Coorientadora: Ionara Regina Pizzutti

Este trabalho apresenta um método multirresidual para determinação de resíduos de agrotóxicos em doces de fruta em pasta. Para a obtenção de amostras homogêneas e de fácil manipulação preparou-se uma mistura dos doces de frutas e água ultrapura. O preparo das amostras foi feito utilizando o método QuEChERS modificado. Com o objetivo de diminuir o efeito matriz das amostras e pela alta detectabilidade do equipamento de cromatografia de micro vazão a líquido acoplada à espectrometria de massas híbrida triplo quadrupolo-armadilha de íons linear ( $\mu$ LC-QTRAP-MS/MS) os extratos de acetonitrila foram diluídos na razão de 1:30 (v/v) antes da análise. A validação do método analítico foi feita pela análise de amostras de doces de uva fortificadas nas concentrações de 9 e 45  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Dos 107 agrotóxicos avaliados 93 % obtiveram recuperações de 70 a 120 % e desvio padrão relativo  $\leq 20\%$ . Os limites de notificação foram de 9 e 45  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para, respectivamente, 66 % e 26 % dos agrotóxicos avaliados, 5 % dos compostos não alcançaram os pré-requisitos necessários para a validação e não foram detectados nas concentrações estudadas. Após a validação do método, foram analisadas 51 amostras de doces de frutas provenientes do Brasil e da Espanha. Em 80 % das amostras foram detectados resíduos de agrotóxicos, 51 % destas continham no mínimo um agrotóxico em concentração maior que 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Ainda, avaliou-se a estabilidade de cinco agrotóxicos no preparo de doces de frutas caseiros. Para isso, cinco tipos de frutas (laranja, maçã, morango, pera e pêssego) foram trituradas e fortificadas com uma mistura de carbendazim, clorpirifós, imidacloprido, iprodiona e propargito a 500  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . As frutas trituradas e fortificadas foram cozidas com açúcar e água (proporção de 5:5:2, m/m/m) em panela aberta sob fogo médio durante 30 min. O método QuEChERS modificado foi aplicado às frutas não fortificadas, às frutas fortificadas e aos doces de frutas caseiros. Os extratos dessas amostras foram analisados por cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massas híbrida quadrupolo de tempo de voo (LC-QTOF-MS), com o objetivo de verificar a presença dos metabólitos dos agrotóxicos e determinar componentes co-extraídos das matrizes. As amostras foram analisadas também por  $\mu$ LC-QTRAP-MS/MS para comparar a concentração dos agrotóxicos nas frutas fortificadas com as nos doces de frutas correspondentes. A partir dessa relação foi possível estimar um fator de processamento para os agrotóxicos no preparo dos doces de frutas caseiros (concentração do agrotóxico no doce de fruta/concentração do agrotóxico na fruta fortificada).

**Palavras-chave.** doces de frutas em pasta, agrotóxicos,  $\mu$ LC-QTRAP-MS/MS, LC-QTOFMS.

Tese disponível na Biblioteca do Centro de Ciências Rurais da  
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM  
E-mail: ijonicostabeber@gmail.com

## AGRADECIMENTOS

O Corpo Editorial agradece a todos os relatores abaixo relacionados que com seu trabalho voluntário e anônimo ao longo de 2016 contribuíram para o bom andamento das atividades e elevação do nível dos artigos publicados pela Revista

- **Adelaide Del Pino Beleia** Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Tecnologia de Alimentos. Londrina, PR
- **Adriana Palma de Almeida** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Contaminantes, Núcleo de Contaminantes Orgânicos. São Paulo, SP
- **Alcina Maria Liserre** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Alimentos, Núcleo de Microbiologia. São Paulo, SP
- **Alexandre Tourino Mendonça** Universidade Vale do Rio Verde. Três Corações, MG
- **Alice Sakuma** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Materiais de Referência. 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
- **Amauri Antiquera Leite** Universidade Estadual de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Araraquara, SP
- **Ana Maria Centola Vidal Martins** Centro Universitário de Rio Preto. São José do Rio Preto, SP
- **Ananda Helena Nunes Cunha** Universidade Federal de Goiás. Goiânia, GO
- **Anderson Felicori Fernandes** Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais. Rio Pomba, MG
- **Aroldo Arévalo Pinedo** Universidade Federal do Tocantins, Engenharia de Alimentos. Palmas, TO
- **Bianca Ramos Marins** Fundação Oswaldo Cruz, Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio. Rio de Janeiro, RJ
- **Carina Lumie Pereira Nagata** Universidade Vale do Rio Verde. Três Corações, MG
- **Carla Pagliari** Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia, Laboratório da Disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis. São Paulo, SP
- **Carlos Eugenio Daudt** Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Santa Maria, RS
- **Carmen Maria Olivera Müller** Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Florianópolis, SC
- **Cassiane Dezoti da Fonseca** Universidade de São Paulo, Escola de Enfermagem, Laboratório Experimental de Modelos Animais. São Paulo, SP
- **Cecília Bittencourt Severo** Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Departamento de Ciências Básicas da Saúde Parasitologia e Micologia. Porto Alegre, RS
- **Ceres Mattos Della Lucia** Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Nutrição e Saúde. Viçosa, MG
- **Christiane Soares Pereira** Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Departamento de Bacteriologia. Rio de Janeiro, RJ
- **Cibele Cristina Osawa** Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Rio de Janeiro, RJ
- **Claudia Maria Antunes Uchôa Souto Maior** Universidade Federal Fluminense, Instituto Biomédico, Departamento de Microbiologia e Parasitologia. Niterói, RJ
- **Daiana Novello** Universidade Estadual do Centro-Oeste do Paraná Departamento de Nutrição. Guarapuava, PR



- **Danielle Fabíola Pereira da Silva** Universidade Federal de Viçosa, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Fitotecnia. Viçosa, MG
- **Edeilza Gomes Brescansin** Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia e Farmacologia. Maringá, SP
- **Edeltrudes Oliveira Lima** Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas. João Pessoa, PB
- **Eduardo Ramirez Asquieri** Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Farmácia, Departamento de Análises Clínicas Toxicológicas e Bromatológicas, Laboratório de Química dos Alimentos. Goiânia, GO
- **Elane Schwinden Prudêncio** Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Florianópolis, SC
- **Eliana Badiale Furlong** Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química e Alimentos, Laboratório de Ciência de Alimentos. Rio Grande, RS
- **Elza Iouko Ida** Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Londrina, PR
- **Fernanda Bovo Campagnollo** Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciência dos Alimentos, Laboratório de Microbiologia Quantitativa de Alimentos. Campinas, SP
- **Fernando Henrique Andrade Nogueira** Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia. Natal, RN
- **Flaviane Alves de Pinho** Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Laboratório de Imunobiologia e Soroepidemiologia. São Paulo, SP
- **Geraldo Arraes Maia** Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, CE
- **Gina Maria Bueno Quirino Cardozo** Instituto de Tecnologia de Alimentos. Campinas, SP
- **Gizele Scotti do Canto** Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia Industrial. Santa Maria, RS
- **Graça Maria de Castro Viana** Universidade Federal do Maranhão, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Patologia. São Luis, MA
- **Gubio Soares Campos** Universidade Federal da Bahia, Laboratório de Virologia. Salvador, BA
- **Itabajara da Silva Vaz Junior** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia. Porto Alegre, RS
- **Jacqueline Tanury Macruz Peresi** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Laboratórios Regionais, Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas. São José do Rio Preto, SP
- **Jane Martha Graton Mikcha** Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas. Maringá, PR
- **Jefferson Malveira Cavalcante** Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia Química. Fortaleza, CE
- **Joice Sifuentes dos Santos** Universidade Norte do Paraná. Londrina, PR
- **Jorge Timenetsky** Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Microbiologia. São Paulo, SP
- **José Ricardo Jensen** Instituto Butantan, Centro de Pesquisa e Formação em Imunologia, Laboratório de Imunogenética. São Paulo, SP
- **Kamila Nascimento de Oliveira** Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, RJ
- **Larissa Lagoa Ribeiro Furtini** Universidade Federal de Lavras, Laboratório de Microbiologia. Lavras, MG

- **Leadir Lucy Martins Fries** Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Laboratório de Microbiologia dos Alimentos. Santa Maria, RS
- **Livia Melo Villar** Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Hepatites Virais. Rio de Janeiro, RJ
- **Lucile Tiemi Abe Matsumoto** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Alimentos, Núcleo de Química, Física e Sensorial. São Paulo, SP
- **Lucineia Gomes da Silva** Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, RJ
- **Marcelo Antonio Morgano** Instituto de Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos. Campinas, SP
- **Marcelo Henrique Otênio** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Gado de Leite. Juiz de Fora, MG
- **Márcia de Aguiar Ferreira** Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Brasília, DF
- **Márcia Monks Jantzen** Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Ciência dos Alimentos. Pelotas, RS
- **Marcio Hipólito** Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento Em Sanidade Animal. São Paulo, SP
- **Marco Antonio Moreira Furtado** Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica, Departamento de Alimentos e Toxicologia. Juiz de Fora, MG
- **Marcos dos Santos Lima** Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano. Petrolina, PE
- **Maria Aparecida de Oliveira** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Laboratórios Regionais, Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas. Ribeirão Preto, SP
- **Maria Claudia Dantas Porfrio 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 Gomes de Azevedo Medeiros** Universidade Federal Fluminense, Faculdade de Nutrição. Rio de Janeiro, RJ
- **Maria Gisele Gonçalves** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Imunologia. São Paulo, SP
- **Maria Helena Iha** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Laboratórios Regionais, Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas. Ribeirão Preto, SP
- **Maria Raquel Hidalgo Campos** Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Nutrição. Goiânia, GO
- **Maristela Cortez Sawitzki** Universidade Federal do Pampa. Uruguaiana, RS
- **Mauricio Morishi Ogusku** Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Coordenação de Sociedade, Ambiente e Saúde, Laboratório de Micobacteriologia. Manaus, AM
- **Nádia Cristiane Steinmacher** Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Medianeira, PR
- **Nelma de Mello Silva Oliveira** Universidade José do Rosário Vellano, Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismos. Alfenas, MG
- **Orlando Marino Gadas de Moraes** Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Escola de Nutrição, Departamento de Tecnologia de Alimentos. Rio de Janeiro, RJ
- **Patrícia Matos Scheuer** Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Santa Catarina. Florianópolis, SC





- **Raimundo Antônio Gomes de Oliveira** Universidade Federal do Maranhão, Hospital Universitário, Centro de Pesquisa Clínica, Laboratório de Pesquisa Clínica. São Luís, MA
- **Raphael Salles Scortegagna Medeiros** Instituto do Câncer do Estado de São Paulo. São Paulo, SP
- **Raquel Gouvêa** Universidade Federal Fluminense, Centro de Ciências Médicas, Departamento de Tecnologia de Alimentos. Niterói, RJ
- **Regilda Saraiva dos Reis Moreira Araujo** Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Nutrição. Teresina, PI
- **Regina Célia Rodrigues de Miranda Milagres** Universidade Federal de Viçosa, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Nutrição e Saúde. Viçosa, MG
- **Regina Maura Cabral de Melo Abrahão** Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Laboratório de Micobactérias. São Paulo, SP
- **Renata Katsuko Takayama Kobayashi** Universidade Estadual de Londrina, Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Microbiologia. Londrina, PR
- **Renato Souza Cruz** Universidade Estadual de Feira de Santana, Departamento de Tecnologia. Feira de Santana, BA
- **Rodrigo Ivan Prim** Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC
- **Rosane da Silva Rodrigues** Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Ciências Domésticas, Departamento de Ciências dos Alimentos. Pelota, RS
- **Rosemar Antoniassi** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Agroindústria de Alimentos, Óleos e Gorduras. Rio de Janeiro, RJ
- **Ruth Estela Gravato Rowlands** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Alimentos, Núcleo de Microbiologia. São Paulo, SP
- **Silvana Magalhães Salgado** Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Nutrição. Recife, PE
- **Sílvia Maria Santos Carvalho** Universidade Estadual de Santa Cruz, Departamento de Ciências Biológicas, Ciências Biológicas. Ilhéus, BA
- **Simone Baldini Lucheis** Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Gabinete da Coordenadoria, Departamento de Descentralização do Desenvolvimento. Bauru, SP
- **Solange Cadore** Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química. Campinas, SP
- **Tatiana Saldanha** Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos. Seropédica, RJ
- **Tiane Martin de Moura** Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Nutrição. Pelotas, RS
- **Virginia del Carmen Troncoso Valenzuela** Fundação Ezequiel Dias, Serviço de Microscopia de Produtos. Belo Horizonte, MG
- **Vivianne Montarroyos Padilha** Universidade Federal de Pernambuco. Recife PE
- **Voltaire Sant'Anna** Universidade Estadual do Rio Grande do Sul. Encantado, RS

#### Agradecimento especial pela revisão do inglês

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

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

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

### Informações Gerais

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

São aceitos manuscritos nos idiomas: português e inglês.

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

**Revista do Instituto Adolfo Lutz (RIAL)**

**Núcleo de Acervo**

Av. Dr. Arnaldo, 355 - Cerqueira César - São Paulo - SP - Brasil - CEP: 01246-000

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 e devem ter entre 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: [\[http://www.scielo.br/pdf/csp/v21n1/28.pdf\]](http://www.scielo.br/pdf/csp/v21n1/28.pdf).

**Livros:**

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

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

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

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

**Capítulos de livro:**

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

**Dissertações, teses e monografias:**

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

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

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

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

**Dados eletrônicos:**

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

**Legislação:**

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

**Autoria institucional:**

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

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

**Patente:**

Larsen CE, Trip R, Johnson CR, inventors: Novoste Corporation, assignee. Methods for procedures related to electrophysiology 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:

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

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

- 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 está disponível gratuitamente em:

Portal de Revistas em Veterinária e Zootecnia - <http://revistas.bvs-vet.org.br/rialutz>

Portal do Instituto Adolfo Lutz - <http://www.ial.sp.gov.br>

Portal LILACS - <http://lilacs.bvsalud.org/>

Estratégia de recuperação por título da Revista: (ta:(Rev. Inst. Adolfo Lutz))

BVS Rede de Informação e Conhecimento - <http://ses.sp.bvs.br/>

Estratégia de recuperação por título da Revista: (ta:(Rev. Inst. Adolfo Lutz))

Portal de Revistas Saúde SP (Metodologia SciELO) -

[http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci\\_serial&pid=0073-9855&lng=pt&nrm=iso](http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_serial&pid=0073-9855&lng=pt&nrm=iso)





SECRETARIA  
DA SAÚDE

