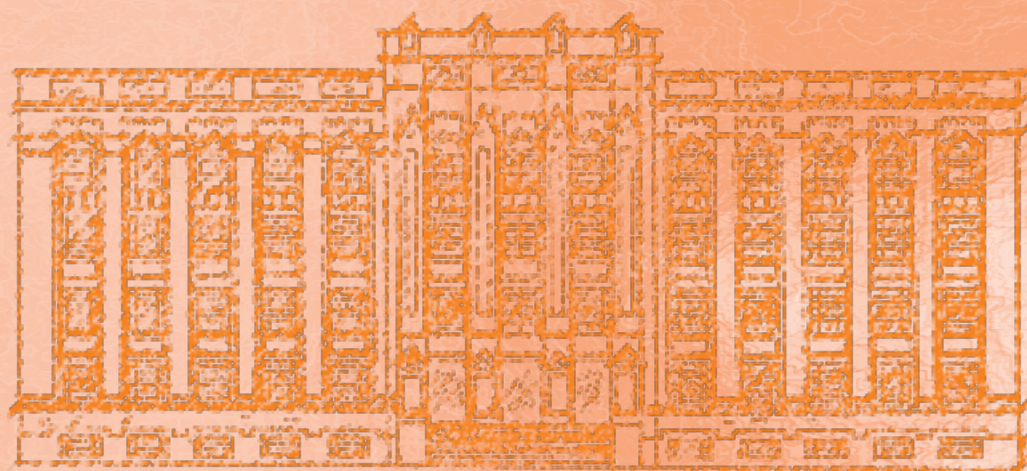


ISSN: 1983-3814 (*on-line*)  
RIALA6

# REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO  
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

**Volume 76 número único, 2017**





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

# REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Volume 76, 2017

---



## 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  
2017, 76

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/>

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

**1729 O círculo vicioso da negligência da leptospirose no Brasil**

The vicious circle of the leptospirosis negligence in Brazil  
Cláudio Manuel RODRIGUES

■ ARTIGO ORIGINAL/ORIGINAL ARTICLE

**1716 Evaluation of the “shelf life” of nitrocellulose membranes immobilized with *Paracoccidioides brasiliensis* antigen for performing the immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis**

Avaliação do “tempo de prateleira” de membranas de nitrocelulose imobilizadas com antígeno de *Paracoccidioides brasiliensis* para o imunodiagnóstico da paracoccidioidomicose

Luciane Regina Franciscone SILVA, Camila Mika KAMIKAWA, Angela Noronha PASSOS, Valdelene Sayuri KOHARA, Adriana Pardini VICENTINI

**1718 Análise microscópica do amido extraído de milho (*Zea mays*) convencional e transgênico**

Microscopic analysis of the starch extracted from conventional and transgenic corn (*Zea mays*)

Juliane dos Santos SOARES, Márcia Bittar ATUI, Maria Aparecida Moraes MARCIANO, Irineu LORINI

**1719 Atividade antimicrobiana de óleos essenciais e compostos isolados frente aos agentes patogênicos de origem clínica e alimentar**

Antimicrobial activity of the essential oils and isolated compounds on the hospital-borne and foodborne pathogens

Caio Henrique da Silva SANTOS, Roberta Hilsdorf PICCOLI, Victor Maximiliano Reis TEBALDI

**1720 Estudos da fauna flebotomínica (Diptera: Psychodidae: *Phlebotominae*) e infecção natural por *Leishmania infantum* em municípios da região noroeste do estado de São Paulo, Brasil**

Studies on the phlebotomine sandflies fauna (Diptera: Psychodidae: *Phlebotominae*) and on the natural infection by *Leishmania infantum* in municipalities of northwest region of the State of São Paulo

Vanessa Gusmon da SILVA, Helena Hilomi TANIGUCHI, Virgínia Bodelão RICHINI-PEREIRA, Diego Borin NÓBREGA, Carlos Roberto ELIAS, José Eduardo TOLEZANO

**1723 Adaptação do Ecomapa proposto no Modelo Calgary para avaliação socioambiental de parasitoses intestinais em crianças de creches filantrópicas**

Adapting the Ecomap proposed in the Calgary Model for the socio-environmental evaluation of intestinal parasites in children at philanthropic day care centers

Guilherme Sgobbi ZAGUI, Brisa Maria FREGONESI, Thaís Vilela SILVA, Carolina Sampaio MACHADO, Gabriel Pinheiro MACHADO, Fabiana Cristina JULIÃO, Karina Aparecida de Abreu TONANI, Susana Inés SEGURA-MUÑOZ

- 
- 1725 Pertussis characterization in the central-west region of São Paulo state, Brazil**  
Caracterização da coqueluche na região centro-oeste do Estado de São Paulo, Brasil  
André MARTINS, Salete França PÔRTO, Claudia Regina DELAFIORI, Luciano Moura MARTINS, Carlos Henrique CAMARGO, Daniela LEITE
- 1727 Desempenho da cultura líquida MGIT após implementação em uma rede de laboratórios públicos do estado de São Paulo**  
Performance of liquid culture MGIT after implementation in a network of public laboratories of Sao Paulo state  
Heloisa da Silveira Paro PEDRO, Andrea Gobetti Vieira COELHO, Susilene Maria Tonelli NARDI, Gleize VILELA, Jaqueline Otero SILVA, Ana Carolina Chiou NASCIMENTO, Leonilda Chiare GALLE, Dalva Cristina Girello AILY, Regina Ruivo FERRO E SILVA, Maria de Lourdes Matsuura SHIKAMA, Andréa Resende LEITE, Mara Aparecida Garnica SUAIDEN, Lucilaine FERRAZOLI
- 1730 Aspectos epidemiológicos da esquistossomose em área do sudoeste de Minas Gerais, Brasil**  
Epidemiological aspects of schistosomiasis in area at the southwest of Minas Gerais, Brazil  
Raquel Lopes Martins SOUZA, Cybele GARGIONI, Rosângela Vieira SIQUEIRA, Rita Maria da SILVA, Pedro Luiz Silva PINTO, Herminia Yohko KANAMURA
- 1731 Método espectrofotométrico na região UV a 205 nm para determinação de íon nitrato em água: validação**  
Spectrophotometric method in UV region at 205 nm for determination of nitrate ion in water: validation  
Maria Anita SCORSAFAVA, Arlete de SOUZA, Gisele Letícia ALVES
- 1732 Antifungal activity of geraniol and citronellol against food-relevant dematiaceous fungi *Cladosporium* spp.**  
Atividade antifúngica de geraniol e citronelol frente a fungos dematiáceos de importância para os alimentos do gênero *Cladosporium* spp.  
Aldeir Sabino dos Santos, Gezaílton Santos Silva, Kaltz Victor Souza Silva, Maria Islaine de Oliveira Lima, Juliana Moura Mendes Arrua, Edeltrudes de Oliveira Lima, Fillipe de Oliveira Pereira

#### ■ COMUNICAÇÃO BREVE/ BRIEF COMMUNICATION

- 1722 Avaliação das condições higienicossanitárias em restaurantes comerciais de Vitória, ES**  
Evaluation of hygienic and sanitary conditions in the commercial restaurants in Vitória, ES  
Grazielli Ramos de LYRA, Maria Clara de Moraes MOTTA, Jackline Freitas Brilhante de SÃO JOSÉ
- 1724 Utilização de ingredientes sucedâneos ao trigo na elaboração de bolos sem glúten**  
Substitutes ingredients of wheat for making gluten-free cakes  
Laiz Aparecida Azevedo SILVA, Flávia Vitorino FREITAS, Tamires dos Santos VIEIRA, Wagner Miranda BARBOSA, Erika Madeira Moreira da SILVA
- 1728 Condições higienicossanitárias em serviços de nutrição hospitalar durante período de intervenção**  
Hygienic-sanitary conditions in hospital nutrition services during intervention period  
Lize STANGARLIN-FIORI, Laissa Benites MEDEIROS, Ana Lúcia SERAFIM, Vera Lucia PONCHEK, Luisa Helena R. HECKTHEUER

#### ■ RESUMOS DE TESES E DISSERTAÇÕES

- 1717 Avaliação *in vitro* do efeito pró-inflamatório e oxidativo dos pesticidas mancozebe, clorotalonil e tiofanato metílico**  
*In vitro* evaluation of pro-inflammatory and oxidative effect of mancozeb, chlorothalonil and thiophanate methyl pesticides  
Weis GCC.
- 1721 Aspectos soroepidemiológicos da leishmaniose visceral no Departamento Regional de Saúde (DRS) XV região de São José do Rio Preto, estado de São Paulo, Brasil, 2008 - 2012**  
Seroepidemiological aspects of visceral leishmaniasis in the Regional Department of Health (DRS) XV region of São José do Rio Preto, state of São Paulo, Brazil, 2008 - 2012  
Bertollo DMB.



---

**1726 Prevalência e fatores de risco associados às parasitoses intestinais em cães e gatos de Hospital Veterinário e de cães do Programa de Controle de Leishmaniose**

Prevalence and risk factors associated with intestinal parasitosis in dogs and cats attended in Veterinary Hospital and dogs from Leishmaniasis Control Program  
Souza PMC.

■ **COLABORADORES**

■ **INSTRUÇÕES AOS AUTORES**



# Evaluation of the “shelf life” of nitrocellulose membranes immobilized with *Paracoccidioides brasiliensis* antigen for performing the immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis

Avaliação do “tempo de prateleira” de membranas de nitrocelulose imobilizadas com antígeno de *Paracoccidioides brasiliensis* para o imunodiagnóstico da paracoccidioidomicose

RIALA6/1716

Luciane Regina Franciscone SILVA, Camila Mika KAMIKAWA, Angela Noronha PASSOS, Valdelene Sayuri KOHARA, Adriana Pardini VICENTINI\*

\*Correspondence to: Centro de Imunologia, Instituto Adolfo Lutz, Avenida Dr. Arnaldo, 355, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 01246-000. Fone/Fax: +55 11 3068 2898. E-mail: apardini@ial.sp.gov.br

Recebido: 09.08.2016 - Aceito para publicação: 01.02.2017

## ABSTRACT

The immunoblotting reaction for performing the paracoccidioidomycosis (PCM) immunodiagnosis is an in-house methodology; and being a laborious task involving two previous steps, SDS-PAGE and Western blot, we evaluated the shelf life of nitrocellulose membranes containing the immobilized *P. brasiliensis* antigens, stored at -20 °C for 7, 15, 30, 45, 60 and 90 days. Twenty-eight serum samples were analyzed on two nitrocellulose membranes groups: (a) membranes previously blocked with PBS-5 % non-fat dry milk and (b) the priority non-blocked membranes. No difference was detected in the reactivity pattern in serum samples evaluated in the both membrane groups, especially for those stored for 7, 15, 30, 45 and 60 days. It might be emphasized that a good stability of *P. brasiliensis* antigens, immobilized on the nitrocellulose membranes, enable them to be stored up to 60 days at -20 °C. This finding contributes to the rapid diagnosis of PCM, and for sending them to other laboratories without adequate infrastructure for carrying out the steps that precede the immunodetection as the antigen production, SDS-PAGE and Western blot techniques. This scheme contributes substantially to improve the quality of PCM serodiagnosis, as it provides reproducible results in the units of the Laboratory Network.

**Keywords.** *Paracoccidioides brasiliensis*, paracoccidioidomycosis, immunoblotting, serologic tests.

## RESUMO

Considerando-se que o *immunoblotting* para o imunodiagnóstico da paracoccidioidomicose (PCM) é uma metodologia *in house* e laboriosa envolvendo duas etapas iniciais, SDS-PAGE e *Western blot*, neste estudo foi avaliado o tempo de prateleira das membranas de nitrocelulose sensibilizadas com antígeno de *P. brasiliensis*, armazenadas a -20 °C durante 7, 15, 30, 45, 60 e 90 dias. Vinte e oito amostras de soro foram analisadas em dois grupos de membranas de nitrocelulose (membranas previamente bloqueadas com PBS-leite 5 % e as não-bloqueadas). Não houve diferença no padrão de reatividade quando os soros foram avaliados frente a ambos os grupos, especialmente para membranas armazenadas por 7, 15, 30, 45 e 60 dias. A boa estabilidade do antígeno utilizado para sensibilizar as membranas fez com que estas pudessem ser armazenadas a -20 °C até 60 dias. Estas características contribuem para efetuar o diagnóstico rápido da PCM, bem como as perspectivas dessas membranas sensibilizadas serem encaminhadas para os laboratórios, que não possuem infraestrutura necessária para executar as etapas que antecedem a realização de *immunoblotting*, como a produção de antígeno, as técnicas de SDS PAGE e *Western blot*. Este procedimento contribui substancialmente para melhorar o diagnóstico sorológico da PCM, pois poderá fornecer resultados reprodutíveis nas unidades componentes da Rede de Laboratórios.

**Palavras-chave.** *Paracoccidioides brasiliensis*, paracoccidioidomicose, immunoblotting, testes sorológicos.

## INTRODUCTION

Paracoccidioidomycosis (PCM) is the most important systemic mycosis of Latin America, especially in Brazil, caused by the thermally dimorphic fungi *P. brasiliensis* complex and *P. lutzii*<sup>1-5</sup>. In endemic areas, the estimated incidence is approximately one to three cases per 100.000 inhabitants per year<sup>6</sup>. In Brazil the real incidence of PCM is still underestimated because according to the Brazilian regulations, the mandatory notification of this disease has not been required<sup>7</sup>. The definitive diagnosis of PCM is usually based on the demonstration of multibudding yeast cells in different biological specimens and/or the isolation of the fungus by culturing; however, the former shows low sensitivity, and the latter is time-consuming<sup>8,9</sup>. Consequently, serological techniques are an important tool not only for disease diagnosis, but also for monitoring the patient response to treatment<sup>8,10</sup>. Circulating antibodies to *P. brasiliensis* can be detected by serological assays such as double immunodiffusion (ID), counterimmunoelectrophoresis, ELISA, immunoblotting (IB)/Western blott (WB), latex agglutination and dot-blot<sup>10-18</sup>. Despite the availability of these serological assays, none of them has been providing high rates of intrinsic parameters such as sensitivity and specificity for an accurate diagnosis<sup>11</sup>. Among these methodologies, ID test has been routinely used by clinical laboratories due to its easy procedure, the low cost involved in its execution as well as its high specificity (about 100 %) and sensitivity (65 %–90 %)<sup>9-11</sup>. However, ID false negative results in PCM patients with active infection have been reported<sup>19</sup>. According to Do Valle et al.<sup>20</sup> several causes for these false negative reactions might be suggested: a) the prozone effect due to the excess of antigens owing to the extensive dissemination of disease; b) the formation of immune complexes with occluded epitopes; c) the presence of asymmetric antibodies which inhibit the secondary binding in precipitation reactions; and d) the occurrence of antibody contents below the method sensitivity. Our group has demonstrated that the use of IB assay significantly improves the sensitivity of PCM immunodiagnosis<sup>13,15,16</sup>. In addition, the IB

is able to determine the reactivity of specific antigenic fractions, such as gp43 and gp70. These results demonstrate that ID and IB assays show to be complementary for the presumptive diagnosis and prognosis of disease, and possibly for early detection of relapses. These findings suggest that at least two serological tests for specific antibody detection should be used in cases of questionable diagnosis. In a general way, the shelf life is defined as the maximum period of time recommended for storing products, during which the defined quality of a specified proportion of the goods remains acceptable under expected (or specified) conditions of distribution, storage and display<sup>21</sup>. It applies to foods, beverages, pharmaceutical drugs, biological or chemicals reagents, diagnostic kits and many other perishable items<sup>21</sup>. It is known that clinical laboratories have increasingly sought to provide a “rapid response” not only aiming at the diagnosis, but also the surveillance of numerous diseases of public health importance. Considering the statement above cited as well as the fact that the IB reaction for PCM immunodiagnosis happens to be an in-house methodology, and being a laborious technique involving two previous steps, SDS-PAGE and WB, this study aimed at evaluating the shelf life of nitrocellulose membranes containing immobilized *Paracoccidioides brasiliensis* antigen.

## MATERIAL AND METHODS

### Sera Samples

Twenty-eight serum samples were evaluated in this study. Fourteen were randomly selected, and collected from patients with clinical suspicion of paracoccidioidomycosis to perform the presumptive diagnosis, besides twelve reagent serum samples and two samples showing negative reactivity to *P. brasiliensis* antigen in double ID and IB assays.

### Consent

Informed consent was obtained from the patients for publishing this report. This research project was submitted and approved by the Ethical Committee for Research with human subjects of Adolfo Lutz Institute (CEPIAL n° 31/09).

### ***Paracoccidioides brasiliensis* Antigens**

The employed antigenic preparation was a 20-day culture filtrate (Ag C) obtained from the yeast phase of *P. brasiliensis* according to Garcia et al<sup>22</sup> and modified by Silva et al<sup>13</sup>. Briefly, the fungus was cultured in NGTA (Neopeptone, Glucose, Thiamine, Asparagine) liquid medium for 20 days at 36 °C under shaking. After the incubation time, the culture was treated with borate-thimerosal solution (1:5,000), filtered, divided into small volumes and stored at 4 °C until use.

### **SDS-PAGE and Immunoblotting Assay**

For performing sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), *P. brasiliensis* antigens were diluted in buffer containing 62 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2 % (wt/vol) SDS, 50 mM 2-mercaptoethanol, 10 % glycerol, and 0.01 % bromophenol blue, then boiled for 3 min and centrifuged before being applied to gels. Then, the antigens were subjected to electrophoresis (20 mA at room temperature) on a 10 % discontinuous SDS buffer system<sup>23</sup> in a Mini-protean II, Electrophoresis Cell (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA). The molecular mass was determined by using 6.5–175 kD pre-stained standard protein marker (New England BioLabs). WB assays were carried out as previously described<sup>24</sup>. Proteins from SDS-PAGE were electrotransferred onto 0.20 µm nitrocellulose membranes (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo, USA) in a Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA), with 25 mM Tris, 192 mM glycine, pH 8.3, and methanol 20 % (v:v). The IB protocols were performed according to Passos<sup>16</sup>. Thus, the nitrocellulose membranes containing electrophoresed antigens were blocked with 5 % non-fat dry milk in PBS (PBS-5 % L) for sixty min at room temperature (25 °C). The membranes were incubated for 120 min at room temperature with human sera diluted at 1:100 in PBS containing 3 % non-fat dry milk (PBS-3 % L). After that, they were washed six times with PBS containing 0,1 % (w/v) of Tween 20 (PBS-T) and developed with peroxidase-conjugated goat anti-human IgG antibody (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo, USA) diluted at 1:3,000 in PBS-3 % L, and incubated for 90 minutes under stirring at room temperature (25 °C), protected from light.

The membranes were washed again six times for 10 minutes each in PBS-T. The reactions were revealed by employing a solution of 4-chloro-1 naftol (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA), and the blocking was made by successive washes in distilled water.

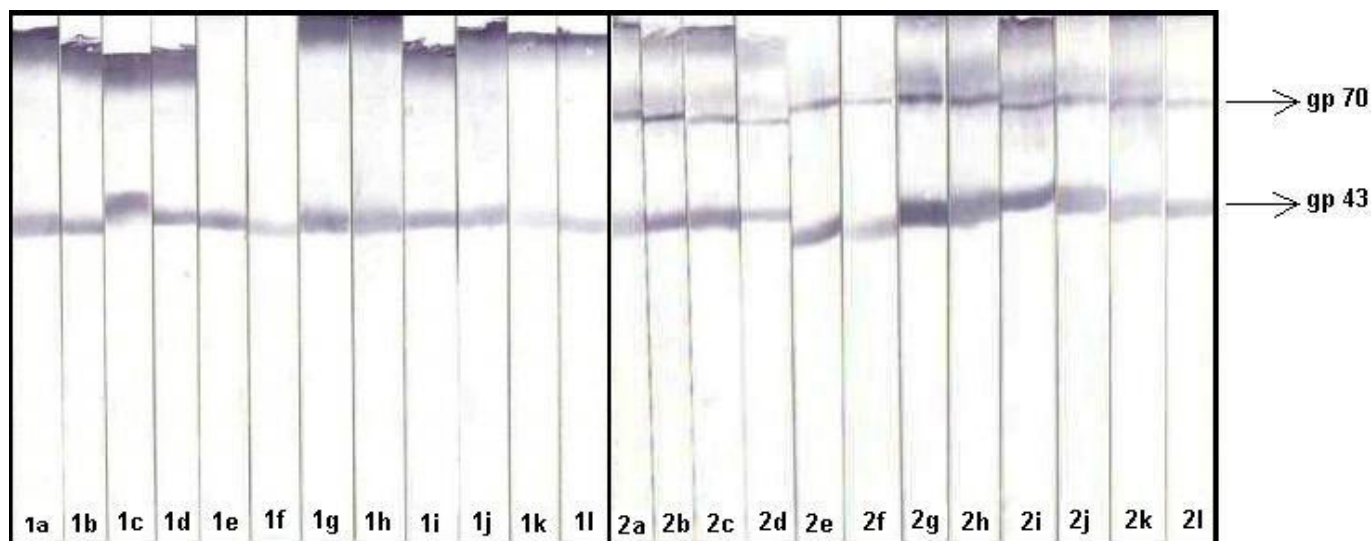
### **Evaluation of the shelf life of nitrocellulose membranes**

Nitrocellulose membranes containing immobilized *P. brasiliensis* antigen were divided into two groups: a) membrane blocked with PBS-5 % L was incubated for 60 min in shaker platform at room temperature, and then washed twice with PBS pH 7.4; b) priority non-blocked membranes. The membranes were then wrapped in plastic film and aluminum foil, and stored at -20 °C for 7, 15, 30, 45, 60 and 90 days. At the time previously established, the membranes were removed from the freezer to perform the IB assays.

## **RESULTS**

Concerning the stability of nitrocellulose membranes, no difference in the reactivity pattern was found when the serum samples were evaluated against the both groups, i.e., the membranes previously blocked with PBS-5 % non-fat dry milk for 60 min at room temperature, and those kept immediately after the transfer process, especially for membranes stored for 7, 15, 30, 45 and 60 days.

Although, the impaired reactivity pattern was observed in those membranes stored for a period exceeding 60 days. In the membranes evaluated after 90 days of storage, the samples showed lower reactivity and poor intensity pattern or absence of reactivity when compared to the membranes of other storage periods. Furthermore, these results indicated that the nitrocellulose embranes containing *P. brasiliensis* immobilized antigen, stored at -20 °C in two distinct conditions, did not alter the antigenicity. These findings indicated that regardless of the membranes storage condition, the antigen remains stable and capable to recognize the species-specific antibodies, especially the anti-glycoproteins of 43 and 70 kDa, present in sera from patients with active disease or with clinical suspicion of paracoccidioidomycosis (**Figure**).



**Figure.** Stability of the nitrocellulose membranes containing culture filtrate sample of 113 *Paracoccidioides brasiliensis*, stored at -20 °C, and analyzed on immunoblotting assay. Membranes were divided into two groups: (1) membrane blocked with PBS-5 % L (a,c,e,g,i,k) and (2) priority non-blocked membranes (b,d,f,h,j,l), and stored for 7 (a,b), 15 (c,d), 30 (e,f), 45 (g,h), 60 (i,j) and 90 (k,l) days

## DISCUSSION

Serological techniques are usually simpler than culture methodology, being very useful for carrying out the presumptive diagnosis and for following-up the patients infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. Among them, double ID assay remains as the main serological test for paracoccidioidomycosis<sup>8-11</sup>. Passos et al<sup>15</sup> evaluated the performance of ID and IB assays in the serological diagnosis of PCM, showing that the agreement analysis between these techniques performed by Cohen kappa index was considered good ( $k=0.76$ ). Both methods demonstrated high efficiency (>90 %), and IB showed a better ability to discriminate the positive samples, when the diagnosis was not feasible by ID, corroborating the results observed by Silva et al<sup>13</sup>. These findings demonstrated that ID and IB assays showed to be complementary to the presumptive diagnosis, the prognosis of disease, and being possible to perform the early relapses detection, suggesting that at least two serological tests for antibody detection should be employed in cases of questionable diagnosis. Although, despite the advantages of this approach, it should be noted that for performing the

immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis, no commercial IB or WB kits have been available until now. Thus, these two methods have been carried out thoroughly as homemade and as hand-crafted techniques at mycology-serology laboratories. Both techniques can be classified as a complex and time-consuming procedure, as they involve several specific steps, before performing the immunodetection. These techniques require some approaches as the separation of proteins or of *P. brasiliensis* antigenic fractions by SDS-PAGE, followed by electrophoretic transfer of the fungal components to the nitrocellulose membrane. A high level of stability is essential for any biological pattern, and also it is desirable to the majority of organic products<sup>21</sup>. For this reason, it is relevant to evaluate the shelf life of the stored membranes to investigate whether they maintain the standard efficiency/immunoreactivity with the same quality of those newly produced. Thus, the use of serological tests which satisfy the characteristics as the rapid and easy implementation, and especially with good sensitivity, specificity, positive and negative predictive values, and accuracy has become increasingly frequent. In paracoccidioidomycosis field, this is the first study that addresses the

stability or shelf life of nitrocellulose membranes containing immobilized *P. brasiliensis* antigen. In the present study, an in-house immunoblotting assay was standardized, in which the nitrocellulose membranes containing *P. brasiliensis* immobilized antigens were employed. It was demonstrated that their storage at -20° C in two distinct conditions did not interfere in their antigenic characteristics. These findings indicate that regardless the nitrocellulose membranes storage condition, the antigen remains stable and effective to recognize the species-specific antibodies, especially the anti-glycoproteins of 43 and 70 kDa present in serum samples collected from patients with active disease or with clinical suspicion of paracoccidioidomycosis. In conclusion, it can be stated that the high sensitivity, the relative specificity associated with the good stability of nitrocellulose membranes strengthen the fact that the IB assay significantly improves the sensitivity of PCM immunodiagnosis. Also, it is suggested that at least two serological tests for specific antibody detection should be took over in the cases of questionable diagnosis found in double ID and ELISA. It should also be noted that the long durability of antigens immobilized into nitrocellulose membrane provides perspective for shipping them to other laboratories without adequate infrastructure for carrying out all of the steps for performing these immune-detection techniques, as the production of antigen, SDS-PAGE and WB techniques. Thus, these findings will contribute substantially to improve the serodiagnosis of PCM, and to provide reproducible results in the units of the Laboratory Network.

### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the financial support from Adolfo Lutz Institute. Luciane Regina Franciscone Silva, Angela Noronha Passos and Camila Mika Kamikawa received grants from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). We are grateful to Miss Lucia Cupertino Barreto for her technical assistance.

### REFERENCES

1. Colombo AL, Tobón A, Restrepo A, Queiroz-Telles F, Nucci M. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. *Med Mycol* 2011;49(8):785-98. [DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/13693786.2011.577821>].
2. Gonzalez A, Hernandez O. New insights into a complex fungal pathogen: the case of *Paracoccidioides* spp. *Yeast*. 2016;33(4):113-28. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/yea.3147>].
3. De Oliveira HC, Assato PA, Marcos CM, Scorzoni L, de Paula E Silva AC, Da Silva J de F et al. Paracoccidioides-host Interaction: An Overview on Recent Advances in the Paracoccidioidomycosis. *Front Microbiol*. 2015;25 (6):1319 [DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.01319>].
4. Seyedmousavi S, Guillot J, Tolooe A, Verweij PE, de Hoog GS. Neglected fungal zoonoses: hidden threats to man and animals. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21(5):416-25. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2015.02.031>].
5. Teixeira MM, Theodoro RC, Oliveira FF, Machado GC, Hahn RC, Bagagli E et al. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. *Med Mycol*. 2014; 52(1):19-28. [DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/13693786.2013.794311>].
6. Martinez R. Epidemiology of paracoccidioidomycosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2015;57 Suppl 19:11-20. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652015000700004>].
7. Martinez R. Paracoccidioidomycosis: the dimension of the problem of a neglected disease. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010;43(4):480. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822010000400034>].
8. Teles FR, Martins ML. Laboratorial diagnosis of paracoccidioidomycosis and new insights for the future of fungal diagnosis. *Talanta*. 2011;85(5):2254-64. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2011.07.099>].
9. Silva Ferreira C, de Castro Ribeiro EM, Miranda Goes AD, Mello Silva B. Current strategies for diagnosis of paracoccidioidomycosis and prospects of methods based on gold nanoparticles. *Future Microbiol*. 2016;11:973-85. [DOI: <http://dx.doi.org/10.2217/fmb-2016-0062>].

10. De Camargo ZP. Serology of paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*. 2008;165:289-302.
11. da Silva JF, de Oliveira HC, Marcos CM, Assato PA, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJ. Advances and challenges in paracoccidioidomycosis serology caused by *Paracoccidioides* species complex: an update. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016;84(1):87-94. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.06.004>].
12. Fernandes VC, Coutinho JB, Veloso JM, Araújo AS, Pedroso EP, Goes AM. Combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* recombinant rPb27 and rPb40 antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *J Immunol Methods*. 2011;367(1-2):78-84. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2011.02.006>].
13. Silva DF, Assis CM, Zamboni IM, Barreto LC, Kohara VS, Vicentini-Moreira AP. Use of immunoblotting assay improves the sensitivity of paracoccidioidomycosis diagnosis. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2008;14(2):313-21.
14. Perenha-Viana MC, Gonzales IA, Brockelt SR, Machado LN, Svidzinski TI. Serological diagnosis of paracoccidioidomycosis through Western blot technique. *Clin Vaccine Immunol*. 2012;19:616-9. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/CVI.05693-11>].
15. Passos AN, Kohara VS, Moreto TC, Mendes RP, Kamikawa CM, Vicentini AP. Analysis of the intrinsic parameters of double immunodiffusion and immunoblotting assays for the paracoccidioidomycosis diagnosis. XI International Meeting on Paracoccidioidomycosis; São Paulo; May 2011 [abstract 45-6].
16. Passos AN. Avaliação da aplicabilidade da técnica de immunoblotting para a pesquisa de anticorpos circulantes anti-*Paracoccidioides brasiliensis* e anti-*Histoplasma capsulatum* em laboratório de Saúde Pública [dissertação de mestrado]. São Paulo (SP): Coordenadoria de Controle de Doenças; 2012.
17. Silveira-Gomes F, Sarmiento DN, Pinto TM, Pimentel RF, Nepomuceno LB, Espirito Santo EP, et al. Development and evaluation of latex agglutination test for the serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Clin Vaccine Immunol*. 2011;18(4):604-8. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/CVI.00130-10>].
18. Kamikawa CM, Vicentini AP. Dot-blot methodology for rapid diagnosis of paracoccidioidomycosis caused by *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Infect Dis Ther*. 2015; 3(6). [DOI: <http://dx.doi.org/10.4172/2332-0877.1000256>].
19. Neves AR, Manomi RL, Rossi CL, Camargo ZP, Blotta MH. Negative immunodiffusion test results obtained with sera of paracoccidioidomycosis patients may be related to low-affinity immunoglobulin G2 antibodies directed against carbohydrate epitopes. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003;10(5):802-7. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/CDLI.10.5.802-807.2003>].
20. Do Valle AC, Costa RL, Fialho Monteiro PC, Von Helder J, Muniz MM., Zancopé-Oliveira RM. Interpretation and clinical correlation of serological tests in paracoccidioidomycosis. *Med Mycol*. 2001;39:373-7.
21. Kirkwood TB. Predicting the stability of biological standards and products. *Biometrics*. 1977;33(4):736-42.
22. Garcia NM, Assis CM, Del Negro GMB, Aguiar MSMV, Lacaz CS. Análise imunoquímica de antígeno metabólico de *P. brasiliensis*. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1993;35(suppl.10):70.
23. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
24. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979;76(9):4350-4.



## Avaliação *in vitro* do efeito pró-inflamatório e oxidativo dos pesticidas mancozebe, clorotalonil e tiofanato metílico

### *In vitro* evaluation of pro-inflammatory and oxidative effect of mancozeb, chlorothalonil and thiophanate methyl pesticides

RIALA6/1717

Weis GCC. Avaliação *in vitro* do efeito pró-inflamatório e oxidativo dos pesticidas mancozebe, clorotalonil e tiofanato metílico. Santa Maria, RS. 2017. [Dissertação de Mestrado – Área de Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais. Universidade Federal de Santa Maria – UFSM]. Orientador: Ijoni Costabeber

Os pesticidas são amplamente utilizados na agricultura e na saúde pública para o controle e prevenção de pragas. O uso indiscriminado desses compostos pode desencadear a contaminação ambiental e aumentar o risco de exposição dos seres humanos. A exposição aos pesticidas pelos humanos pode ocorrer de forma direta, através de atividade ocupacional, ou de forma indireta, pelo ambiente e pela alimentação. A exposição crônica aos pesticidas pode resultar em distúrbios neurológicos, reprodutivos, teratogênicos e imunológicos. Os pesticidas mancozebe, clorotalonil e tiofanato metílico são fungicidas amplamente utilizados no mundo. Apesar de suas características de baixa toxicidade aguda e baixa persistência no ambiente, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram os efeitos citotóxicos desses compostos. Entretanto, os efeitos imunológicos que esses pesticidas podem desencadear são pouco explorados. Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* o efeito pró-inflamatório e oxidativo dos pesticidas mancozebe, clorotalonil e tiofanato metílico. Os macrófagos RAW 264.7 (ATCC<sup>®</sup> TIB-71<sup>™</sup>) foram expostos a diferentes concentrações (0,1 – 100 µg/mL) de cada pesticida por 72 horas, sendo mantidos em atmosfera com 5 % CO<sub>2</sub> a 37 °C. Os pesticidas foram dissolvidos em dimetilsulfóxido, o qual foi utilizado como controle negativo. Como controle positivo para a ativação inflamatória, utilizou-se a fitohemaglutinina. A avaliação da proliferação celular, do metabolismo oxidativo e dos níveis das citocinas pró-inflamatórias (IL-1β, IL-6, TNF-α e IFN-γ), da citocina anti-inflamatória (IL-10) e das caspases (Casp1, Casp3, Casp8) foi realizada por testes fluorimétricos e moleculares. Os resultados obtidos demonstraram efeito pró-inflamatório significativo dos pesticidas mancozebe, clorotalonil e tiofanato metílico nas respectivas concentrações de 1, 3 e 100 µg/mL, ocorrendo aumento da proliferação celular e dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e caspases. Entretanto, o efeito oxidativo somente foi observado nos macrófagos expostos ao clorotalonil na concentração de 3 µg/mL. Assim, nas condições de análises utilizadas, os pesticidas estudados atuam ativando o sistema imune. Os resultados encontrados contribuem para a melhor compreensão dos efeitos imunológicos que a exposição a estes pesticidas pode desencadear.

**Palavras-chave.** mancozebe, clorotalonil, tiofanato metílico, macrófagos RAW 264.7, pró-inflamatório, estresse oxidativo.

Dissertação disponível na Biblioteca do Centro de Ciências Rurais da  
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM  
E-mail: ijonicostabeber@gmail.com





# Análise microscópica do amido extraído de milho (*Zea mays*) convencional e transgênico

## Microscopic analysis of the starch extracted from conventional and transgenic corn (*Zea mays*)

[RIALA6/1718](#)

Juliane dos Santos SOARES<sup>1\*</sup>, Márcia Bittar ATUI<sup>1</sup>, Maria Aparecida Moraes MARCIANO<sup>1</sup>, Irineu LORINI<sup>2</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Núcleo de Morfologia e Microscopia, Centro de Alimentos, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, São Paulo, SP, Brasil, CEP 01246-902. Tel: 11 3068 2934. E-mail: juliane.ds.soares@gmail.com

<sup>2</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Centro Nacional de Pesquisa de Soja (Embrapa Soja), Londrina, PR, Brasil

Recebido: 04.10.2016 - Aceito para publicação: 01.02.2017

### RESUMO

Os programas de melhoramento genético têm desenvolvido uma grande variedade de sementes de milho, com características que conferem maior resistência às adversidades do plantio, e permitem a extensão do seu cultivo nas mais diversas condições climáticas. A análise microscópica de grãos é uma ferramenta de grande relevância na caracterização das matérias primas e modificações do amido. Levando-se em conta o fato do uso de transgênicos em alimentos ser ainda controverso, e principalmente para os consumidores, o considerável aumento de sua utilização como ingrediente em produtos alimentícios, o presente trabalho investigou a possibilidade de detectar, por meio de microscopia, a variação das características dos grãos de amido de milho transgênico em comparação com os grãos de amido de milho convencional. Os resultados indicaram diferenças entre os grãos de amido extraídos de milho convencional e naqueles extraídos de milho transgênico. O amido extraído de milho convencional, em sua maioria, caracterizou-se pela presença de grânulos de formato poliédrico, alguns ligeiramente abaulados, com hilo em formato estrelado. No amido extraído dos grãos de milho transgênico, o hilo apresentou formato linear, pontual ou ausente. Estas propriedades serão úteis para caracterizá-los nos trabalhos de pesquisa e de identificação em produtos alimentícios.

**Palavras-chave.** *Zea mays*, alimentos geneticamente modificados, amido, histologia.

### ABSTRACT

The genetic programs have developed the varieties of maize seed, with features that provide greater resistance to the planting adversity, thus to carry out the extension of their cultivation at varied weather conditions. Microscopic analysis of grain is a relevant tool for characterizing the raw materials and the starch modifications. Taking into account the fact of the use of genetically modified organisms (GMOs) in food being still controversial, especially for consumers, and also owing to their significant increased use as ingredients in food products, the present study investigated the possibility in detecting the characteristics variations of transgenic corn starch grains by microscopy, in comparison with the conventional corn starch grains. The results showed significant differences between the conventional starch grains-extracted maize and those derived from transgenic maize. Conventional corn-extracted starch was characterized mostly by the presence of polyhedral shaped beads, some of them slightly cambered, with Starry format hilum, while the extracted starch from genetically modified maize grain, the hilum showed a linear format, punctual or absent. These findings will be valuable for conducting studies and for performing food products characterization and identification.

**Keywords.** *Zea mays*, genetically modified food, starch, histology.

## INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é uma das maiores fontes de alimento e matéria prima, sendo alimentação básica de várias civilizações ao longo do tempo<sup>1</sup>.

Há uma grande diversidade nas condições de cultivo do milho no Brasil, desde a agricultura tipicamente de subsistência, sem utilização de insumos modernos, até lavouras que utilizam o mais alto nível tecnológico e alcançam produtividades equivalentes às obtidas em países de agricultura mais avançada<sup>2,3</sup>.

Aproximadamente 70 % do milho cultivado no mundo é destinado a cadeia produtiva de suínos e aves, na produção de ração. No Brasil, o consumo neste tipo de atividade corresponde a, respectivamente, 70 e 80 % e, em ambos os casos, algum tipo de transformação industrial ou no campo pode ser necessária<sup>2,3</sup>.

Os maiores produtores mundiais de milho são os Estados Unidos, China e Brasil que, na safra 2014/15, produziram 361,1; 215,6; e 85,0 milhões de toneladas, respectivamente<sup>2,3</sup>. Grande parte da produção é utilizada para a extração do amido, para atender a demanda das indústrias<sup>4</sup>.

O grão de milho é uma cariopse que consiste de embrião, endosperma, pericarpo e pedúnculo, conforme **Figura 1**.

O pericarpo (camada externa) é derivado da parede do ovário e pode ser incolor, vermelho, marrom ou variegado. Os embriões do milho não armazenam reservas durante o desenvolvimento da semente, a não ser uma pequena quantidade de

lipídios no escutelo. Observa-se, entretanto, que as reservas de carboidratos são polimerizadas no endosperma na forma de amido e as reservas de proteínas, acumuladas nos corpos proteicos distribuídos em todo o endosperma<sup>5</sup>.

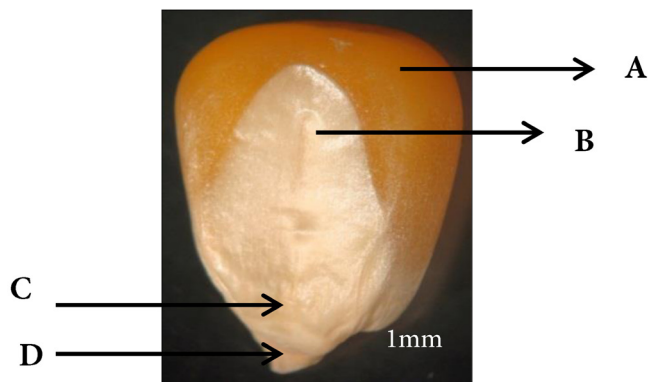
O endosperma é um tecido triploide, que se forma como resultado da fusão do núcleo do pólen com dois núcleos femininos<sup>6</sup>. Esse tecido é responsável por 98 % do amido, 80 % da proteína e 15 % dos lipídios presentes no grão<sup>7</sup>.

Através do processo de moagem úmida do milho, o principal produto obtido é o amido, aproximadamente 72-73 % do total dos grãos. Uma das propriedades do amido é a capacidade de formar uma pasta ou gel viscoso com a água por aquecimento, que o torna adequado para várias utilizações em indústrias alimentares e não-alimentares<sup>8</sup>. O amido de milho é amplamente utilizado na produção de alimentos, principalmente em biscoitos, pães, pós para pudins, fermento em pó, macarrão, melhoradores de farinhas, balas de goma, além de produtos farmacêuticos, dentre outras aplicações industriais<sup>2,3,9,10</sup>.

O amido é um homopolissacarídeo composto por cadeias de amilose (cadeia linear) e amilopectina (cadeia ramificada), cujo percentual de uma para outra varia de acordo com a fonte de amido. O milho possui 25 % a 28 % de amilose com o restante sendo amilopectina. O milho de alta amilose pode atingir até 80 %.

O tamanho e a forma dos grãos de amido permitem identificá-los microscopicamente, podendo ser utilizados corantes, como soluções de iodo, que coram o interior da cadeia de amilose, e formam um composto de coloração azul. Outros detalhes físicos que ajudam na identificação dos amidos são a aparência sob luz polarizada, a posição do hilo e a presença de estrias nos grânulos. As estrias devem-se às camadas que se depositam ao redor de um ponto interno denominado hilo, que pode ser central ou excêntrico. No caso do amido de milho, os grãos são poliédricos e arredondados, medindo geralmente de 10 a 15  $\mu\text{m}$ , com a cruz bem marcada, hilo central e estrelado e ausência de estria<sup>11,12</sup>.

As características morfológicas dos amidos de diferentes origens podem variar em função



**Figura 1.** Estrutura do grão de milho sob aumento de 50x. (A) Pericarpo; (B) Endosperma; (C) Embrião; (D) Pedúnculo

das linhagens e das diferentes práticas de cultivo. A variabilidade do tamanho e forma dos grânulos de amido é atribuída à origem biológica. A morfologia dos grânulos depende da bioquímica do cloroplasto ou amiloplasto, bem como da fisiologia da planta. A média de tamanho de cada grânulo de amido de milho varia de 1 a 7 µm para os pequenos grânulos e de 15 a 20 µm para os grânulos maiores<sup>10,13</sup>.

No Brasil, o crescimento da produtividade de milho decorre de modelo já descrito nos Estados Unidos pelo uso de sementes híbridas com maior potencial de rendimento (melhoramento genético), aumento do uso de fertilizantes e defensivos, melhoria no arranjo espacial de plantas (espaçamento e densidade), uso de máquinas agrícolas mais eficientes e adoção do sistema de plantio direto na palha. A adoção conjunta de cultivares melhorados, de insumos e de técnicas de cultivos adequados fez com que o rendimento das lavouras aumentasse progressivamente<sup>2,3</sup>.

A biologia molecular permitiu avanços na compreensão dos mecanismos genéticos e bioquímicos básicos também no setor agrícola, que permitiu o desenvolvimento de novas estratégias de melhoramento por meio da transformação genética. Sendo uma das maiores *commodities* na agricultura mundial e uma fonte importante de nutrientes para homens e animais, o milho tem sido alvo de muitos estudos de manipulação genética<sup>14</sup>, que visam desenvolver grande variedade de sementes de milho, com características que conferem maior resistência às adversidades do plantio, permitindo assim a extensão do seu cultivo nas mais diversas condições climáticas<sup>5</sup>.

As primeiras atividades com germoplasma de milho no Brasil datam de 1937, pela Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, em Piracicaba, SP. Em 1975, a EMBRAPA montou o banco ativo de germoplasma e, a partir daí, foram desenvolvidos diversos melhoramentos genéticos com o objetivo de aumentar a qualidade e quantidade das sementes e minimizar custos por meio de recursos e equipamentos de última geração<sup>15</sup>.

O Núcleo de Biologia Aplicada da EMBRAPA Milho e Sorgo desenvolve ação multidisciplinar,

com a utilização conjunta de técnicas de melhoramento genético e biologia molecular, para desenvolver novas linhagens de milho tropical com qualidade nutricional melhorada, introduzir genes endógenos com sequências alvo específica por meio da engenharia genética, influenciando na produção do amido<sup>5</sup>.

Os tipos de sementes de milho são identificados como híbridos ou variedades, sendo que os híbridos podem ser simples, triplos ou duplos. Os híbridos simples são resultantes do cruzamento de duas linhagens puras e indicados para sistemas de produção que utilizam alta tecnologia, pois possuem o maior potencial produtivo, são também os de maior valor comercial. O híbrido triplo é o cruzamento entre uma linha pura e um híbrido simples, sendo indicado para média a alta tecnologia, enquanto o híbrido duplo é o resultado do cruzamento entre dois híbridos simples, sendo indicado também para média tecnologia<sup>2,3</sup>.

As sementes das variedades melhoradas apresentam menor custo e são adequadas a regiões onde, devido às condições econômico-sociais e de baixa tecnologia, a utilização de milho híbrido torna-se inviável. São também importantes em sistemas de produção agroecológicos ou orgânicos, pois, embora não restrinjam o uso de híbridos, as variedades são preferidas por permitirem ao produtor produzir sua própria semente a um preço bem menor<sup>2,3</sup>.

Como o milho é uma matéria-prima amplamente utilizada devido às suas características nutricionais e sua aplicabilidade na culinária, o estudo e a caracterização dos seus grãos de amido por meio da análise microscópica, apresenta grande relevância, especialmente considerando que os grãos de amido extraídos de milho transgênico, têm sido cada vez mais utilizados como ingrediente em diversos tipos de produtos alimentícios. Desta maneira, para auxiliar na pesquisa e identificação do amido de milho transgênico presente em produtos alimentícios, foi realizado este estudo com o objetivo de verificar se existem variações nas características microscópicas do grão de amido de milho transgênico, em comparação com o grão de amido de milho convencional.

## MATERIAL E MÉTODOS

As amostras utilizadas neste estudo são representativas, uma vez que estes eventos representam 90 % do milho híbrido cultivado no Brasil, abrangendo o milho colhido, comercializado e exportado.

Foram analisadas doze amostras de grãos de milho, sendo seis contendo eventos de transgenia e suas respectivas amostras convencionais. Estas amostras foram coletadas de produtores de sementes de milho da região Sul do Brasil, assim especificadas: A1) milho convencional; A2) milho transgênico estaqueado com dois eventos, lagarta e lagarta+herbicida; B1) milho convencional; B2) milho transgênico estaqueado com um evento, lagarta+herbicida; C1) milho convencional; C2) milho transgênico estaqueado com um evento, lagarta+herbicida; D1) milho convencional; D2) milho transgênico estaqueado com um evento, lagarta+herbicida; E1) milho convencional; E2) milho transgênico estaqueado com dois eventos, lagarta e lagarta+herbicida; F1) milho convencional; F2) milho transgênico estaqueado com um evento, lagarta+herbicida. A **Figura 2a** apresenta as amostras de milho; a coloração avermelhada dos grãos é devida ao corante usado para identificar o tratamento com fungicida, sendo retirado facilmente na lavagem do grão, como pode ser observado na **Figura 2a**.

As amostras foram processadas e analisadas no Núcleo de Morfologia e Microscopia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, no período de julho de 2014 a junho de 2015.

Para a obtenção do amido, foi utilizada a técnica desenvolvida no Núcleo de Morfologia e Microscopia do Instituto Adolfo Lutz, descrita a seguir.

Os grãos de milho convencional e transgênico foram previamente amolecidos em água e triturados em gral de porcelana com o auxílio de um pistilo, conforme **Figura 2b**.

Em seguida, o material triturado foi envolto em gaze, formando uma pequena bolsa, que foi suspensa e submersa em água contida em um copo graduado de 1.000 mL, durante 24 horas. A bolsa foi ocasionalmente comprimida manualmente, auxiliando na liberação do amido, como observado

na **Figura 2c**.

Após a sedimentação do amido, o sobrenadante foi descartado e o sedimento obtido filtrado a vácuo e recolhido em papel de filtro, de acordo com a **Figura 2d**.

O amido obtido no papel de filtro foi transferido para uma bandeja e seco em temperatura ambiente antes de seu armazenamento em frasco de vidro com tampa esmerilhada.



**Figura 2.** a. Amostras de milho convencional com o respectivo transgênico; b. Grãos de milho triturados em gral de porcelana com o auxílio de um pistilo; c. Material triturado envolto em gaze e suspenso em copo graduado com água; d. Sedimento obtido retido em papel de filtro

A metodologia utilizada para a análise histológica do amido de milho foi extraída do livro *Métodos de Análise Microscópica de Alimentos: Isolamento de Elementos Histológicos*<sup>16</sup>.

Os ensaios foram realizados por três analistas que elaboraram o registro descritivo e fotográfico dos grãos de amido presentes nas amostras analisadas, para demonstrar como estes podem ser identificados microscopicamente.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ensaio para a pesquisa e identificação histológica consiste no reconhecimento de elementos histológicos e/ou amidos de cada vegetal. Assim, o profissional deve ser capaz de diferenciar tais atributos em cada tipo de produto, revelando os ingredientes que fazem parte de sua formulação. Quando o produto

alimentício é composto de vários ingredientes vegetais, o microscopista deve ter conhecimento dos elementos histológicos característicos de cada um deles, pois muitas vezes, em uma mistura, não é possível identificar todos os elementos do vegetal, uma vez que o mesmo passou por etapas de processamento e também pode se apresentar em pequenas quantidades, o que dificulta a sua visualização.

Segundo Menezes<sup>17</sup>, os grãos de amido de milho são sensivelmente poliédricos, quando procedentes da parte externa da semente, e ligeiramente abaulados. Os da zona central branca são quase esféricos e bem menores, apresentam hilo pontuado, emitindo prolongamentos curtos em forma de estrela, e estrias raramente visíveis. Ainda segundo este autor, os grãos de amido de milho não se apresentam agrupados em grãos compostos, medem geralmente 30 µm, e à luz polarizada apresentam cruz bem visível, tanto no campo escuro, como no claro. Singh et al<sup>10</sup> e Li et al<sup>13</sup> observaram a presença de pequenos furos e estrias equatoriais ou sulcos em grânulos de amido maiores.

Desta forma, o amido de milho convencional, já estudado e caracterizado, pode ser facilmente identificado em produtos que o contém. Porém, o

amido de milho transgênico, por ser um produto relativamente novo, não havia sido estudado e descrito morfológicamente. Neste estudo foram verificadas as diferenças e semelhanças entre os dois tipos de amido, uma vez que o amido extraído de milho transgênico vem sendo amplamente utilizado. Vale ressaltar que as amostras analisadas neste trabalho são representativas, pois correspondem aos seis eventos mais utilizados na transgenia do milho, representando 90 % do milho plantado no Brasil.

Os resultados das análises histológicas das amostras de milho convencional e transgênico estão apresentados na **Tabela**.

Pelos resultados obtidos, pode-se observar que nas amostras de milho convencional (A1, B1, C1, D1, E1 e F1), os grãos de amido extraídos apresentaram-se em sua maioria de forma poliédrica e alguns ligeiramente abaulados, com o hilo estrelado, concordando com a descrição de Menezes<sup>17</sup>. Nas suas variedades transgênicas (A2, B2, C2, D2, E2 e F2), não houve diferenciação evidente no formato dos grãos. No entanto, o hilo que nas amostras convencionais apresentava-se estrelado, nas amostras transgênicas apresentou-se na maioria das vezes linear, pontual ou sem hilo (**Tabela e Figura 3**).

**Tabela.** Caracterização morfológica dos grãos de amido extraídos de milho convencional e transgênico

Amostra	Forma dos grãos	Forma do hilo nos grãos	Polarização
A1 (convencional)	Maioria poliédricos e alguns abaulados	Maioria estrelado	Presente
A2 (transgênico)	Alguns poliédricos e alguns abaulados	Maioria linear ou sem hilo	Presente
B1 (convencional)	Maioria poliédricos e alguns abaulados	Estrelado	Presente
B2 (transgênico)	Alguns poliédricos e alguns abaulados	Estrelado nos poliédricos e sem hilo nos abaulados	Presente
C1 (convencional)	Maioria poliédricos e alguns abaulados	Estrelado	Presente
C2 (transgênico)	Maioria poliédricos e alguns abaulados	Maioria linear ou pontuado	Presente
D1 (convencional)	Maioria poliédricos e alguns abaulados	Estrelado	Presente
D2 (transgênico)	Maioria poliédricos e alguns abaulados	Maioria linear	Presente
E1 (convencional)	Maioria poliédricos e alguns abaulados	Estrelado	Presente
E2 (transgênico)	Maioria poliédricos e alguns abaulados	Maioria linear, pontuado ou sem hilo	Presente
F1 (convencional)	Maioria poliédricos e alguns abaulados	Maioria estrelado e hilo linear nos abaulados	Presente
F2 (transgênico)	Maioria poliédricos e alguns abaulados	Maioria linear ou pontuado	Presente

O formato do hilo presente nos grânulos de amido é uma característica para a diferenciação entre o amido de milho transgênico e convencional. Em relação ao formato dos grânulos, este não é um parâmetro a ser utilizado, pois não houve diferenciação evidente entre os grãos de amido convencional e transgênico.

Em todas as amostras de milho, tanto convencional como transgênico, foi possível observar a cruz de polarização quando vistos sob luz polarizada, conforme visto na **Figura 4 (a e b)**.

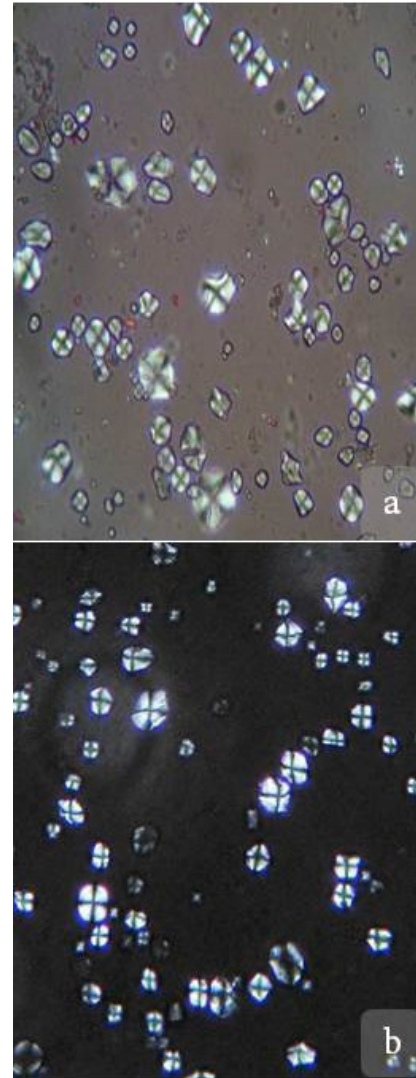
### CONCLUSÃO

O presente estudo vem a contribuir para o ensaio microscópico, ao demonstrar as diferenças morfológicas entre os grãos de amido extraídos de milho convencional e os grãos de amido extraídos de milho transgênico e auxiliar na análise de controle de qualidade de alimentos.

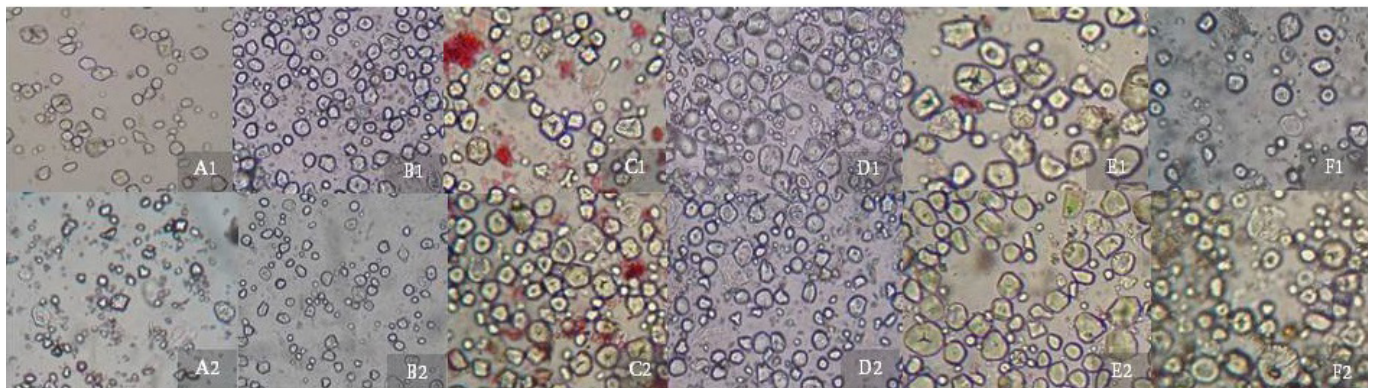
O formato do hilo presente nos grãos de amido demonstrou ser uma característica para a diferenciação entre o amido de milho transgênico e o convencional.

A luz polarizada é um recurso que auxilia na pesquisa e identificação de grãos de amido de milho, tanto convencional como transgênico.

Os resultados obtidos nesse estudo servirão como referência para a pesquisa e identificação microscópica dos grãos de amido de milho geneticamente modificado em produtos alimentícios, para o controle da qualidade e identidade dos mesmos.



**Figura 4.** a. Grânulos de amido de milho convencional sob aumento de 40x, e b. Grânulos de amido de milho transgênico sob aumento de 40x, ambos evidenciando a cruz de polarização quando vistos sob luz polarizada



**Figura 3.** A1, B1, C1, D1, E1 e F1. Grãos de amido de milho convencional, sob aumento de 40x em microscopia óptica, em sua maioria de forma poliédrica, com hilo estrelado; A2, B2, C2, D2, E2 e F2. Grãos de amido de milho transgênico, em sua maioria de forma poliédrica, com hilo linear ou pontuado, ou com ausência de hilo sob aumento de 40x em microscopia óptica.

## AGRADECIMENTOS

A Fernando Augusto Henning, Pesquisador da Embrapa Soja, pela coleta e envio das amostras de milho convencional e transgênico usadas neste trabalho.

A Antônio Roberto Ferreira, do Centro de Alimentos, pelas fotomicrografias contidas neste artigo.

## REFERÊNCIAS

1. Associação Brasileira das Indústrias de Milho – ABIMILHO. O cereal que enriquece a alimentação humana. [acesso 2015 Out 7]. Disponível em: [http://www.abimilho.com.br/milho/cereal].
2. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA. Milho e Sorgo. Cultivo do milho. [acesso 2015 Out 21]. Disponível em: [http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho\_5\_ed/index.htm].
3. Federação das Indústrias do Estado de São Paulo - FIESP. Informativo DEAGRO, SAFRA mundial de milho 2015/16, 9º Levantamento do USDA. [acesso 2016 Jan 15]. Disponível em: [http://az545403.vo.msecnd.net/uploads/2016/01/boletim\_milho\_janeiro2016.pdf].
4. Peter M, Paraginski RT, Santos RF, Rockenbach BA, Villanova FA, Oliveira M. Propriedades tecnológicas e de cristalinidade de amido extraído de grãos de milho armazenados em diferentes temperaturas. VI Conferência Brasileira de Pós-Colheita; outubro de 2014; Maringá: Anais. p. 692-9.
5. Carneiro AA, Carneiro NP, Carvalho CHS, Vasconcelos MJV, Paiva E, Lopes MA. Milho transgênico. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento*. 2000;3(15):42-6. [acesso 2015 Jan 15]. Disponível em: [https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/67512/1/Milho-transgenico.pdf].
6. Wolf MJ, Buzan CL, Macmasters MM, Rist CE. Structure of the mature corn kernel. 1. Gross anatomy and structural relationships. *Cereal Chem*. 1952;29(5):321-33.
7. Glover DV, Mertz ET. *In*: Olson RA, Frey KJ. *Corn. Nutritional quality of cereal grains: genetic and agronomic improvement*. Madison: ASA; 1987. p. 183-336.
8. Nguyen QD, Jensen CTB, Kristensen PG. Experimental and modelling studies of the flow properties of maize and waxy maize starch pastes. *Chem Eng J*. 1998;70:165-71.
9. Sandhu KS, Singh N, Lim ST. A comparison of native and acid thinned normal and waxy corn starches: Physicochemical, thermal, morphological and pasting properties. *LWT-Food Sci Technol*. 2007;40(9):1527-36.
10. Singh N, Singh J, Kaur L, Sodhi NS, Gill BS. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. *Food Chem*. 2003;81(2):219-31.
11. Flint O. *Microscopía de los alimentos: manual de métodos prácticos utilizando la microscopía óptica*. Zaragoza: Acribia; 1996.
12. Sahai D, Jackson DS. Structural and chemical properties of native corn starch granules. *Starch/Starke*. 1996;48(7/8):249-55. [DOI: http://dx.doi.org/10.1002/star.19960480703].
13. Li JH, Vasanthan T, Rosnagel B, Hoover R. Starch from hull-less barley: I. Granule morphology, composition and amylopectin structure. *Food Chem*. 2001;74(4):395-405.
14. Barcelo P, Lazzeri PA. Transformation of cereals by microprojectile bombardment of immature inflorescence and scutellum tissues. *In*: Jones H. *Plant gene transfer and expression protocols*. New York: Springer; 1995. p.113-23.
15. Netto DAM, Andrade RV. Recursos fitogenéticos de milho, sorgo e milheto. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo; 2000. [acesso 2015 Jan 15]. Disponível em: [https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/30832/1/doc-2.pdf].
16. Rodrigues RMM, Atui MB, Correia M. *Métodos de análise microscópica de alimentos: Isolamento de Elementos Histológicos*. Vol. I. São Paulo: Letras & Letras; 1999.
17. Menezes Junior JBF. Investigação sobre o exame microscópico de algumas substâncias alimentícias. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 1949;9(1/2):28-32.



# Atividade antimicrobiana de óleos essenciais e compostos isolados frente aos agentes patogênicos de origem clínica e alimentar

## Antimicrobial activity of the essential oils and isolated compounds on the hospital-borne and foodborne pathogens

RIALA6/1719

Caio Henrique da Silva SANTOS<sup>1</sup>, Roberta Hilsdorf PICCOLI<sup>2</sup>, Victor Maximiliano Reis TEBALDI<sup>1\*</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Centro Universitário de Barra Mansa, Rua Vereador Pinho de Carvalho, 267, Barra Mansa, RJ, Brasil. CEP: 27330-550. Tel: 24 33250222. E-mail: victormaxibio@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, Lavras, MG, Brasil

Recebido: 24.03.2017 - Aceito para publicação: 26.07.2017

### RESUMO

Os óleos essenciais de plantas demonstram atividade antimicrobiana frente a diversos micro-organismos, e são considerados como alternativa ao uso de antibióticos convencionais. Este estudo testou a eficácia de óleos essenciais de canela (*Cinnamomum cassia*), orégano (*Origanum vulgare*), cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), citronela (*Cymbopogon nardus*), além dos compostos isolados citral contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e citral e carvacrol contra *Pseudomonas aeruginosa*. Empregou-se o método de microdiluição em Caldo Trypticaseína de Soja (TSB) em placa de 96 cavidades para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e posterior semeadura em Ágar Trypticaseína de Soja (TSA) para definir a Concentração Bactericida Mínima (CBM). Os inóculos foram padronizados ( $10^7$  UFC/mL) de acordo com a escala de MacFarland. Os óleos essenciais de canela, orégano e citronela mostraram atividade antimicrobiana contra os dois microrganismos em diferentes concentrações. O óleo essencial de cravo-da-índia não apresentou efeitos inibitórios nas concentrações testadas. O carvacrol inibiu *P. aeruginosa* a partir da concentração 1,25 %. O citral inibiu *S. aureus* a partir da concentração 0,03 %, porém não apresentou atividade contra *P. aeruginosa*. O óleo essencial de citronela e o composto citral foram mais eficazes contra *S. aureus*. Para *P. aeruginosa*, o óleo essencial de canela apresentou atividade antimicrobiana nas menores concentrações.

**Palavras-chave.** óleos essenciais, extratos de plantas, agentes antimicrobianos, resistência microbiana a medicamentos.

### ABSTRACT

Essential oils of plants have demonstrated antimicrobial activity against various microorganisms, as an alternative to the use of conventional antibiotics. This study aimed at testing the effectiveness of essential oils of cinnamon (*Cinnamomum cassia*), oregano (*Origanum vulgare*), clove (*Syzygium aromaticum*), citronella (*Cymbopogon nardus*), plus the major compound citral against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and citral and carvacrol against *Pseudomonas aeruginosa*. Tests were performed through the microdilution method in Trypticase Soy Broth (TSB) in 96 well plates to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), and then seeded in Trypticase Soy Agar (TSA) for determining the Minimum Bactericidal Concentration (MBC). The inocula were standardized ( $10^7$  CFU/mL) according to the MacFarland scale. The essential oils of cinnamon, oregano and citronella showed activity against both microorganisms at different concentrations. The essential oil of clove showed no inhibitory effects. The carvacrol inhibited the growth of *P. aeruginosa* at the concentration of 1.25 %. Citral inhibited *S. aureus* from 0.03 % concentration; however, it did not exhibited activity against *P. aeruginosa*. The essential oil of citronella and the citral compound were the most effective against *S. aureus*, while the essential oil of cinnamon showed antimicrobial activity at the lowest concentrations against *P. aeruginosa*.

**Keywords.** essential oils, plant extracts, antimicrobial agents, drug resistance microbial.



## INTRODUÇÃO

Dentre as grandes preocupações da Saúde Pública nos dias atuais destacam-se as doenças infecciosas de origem clínica e alimentar. Doenças de origem alimentar são resultado da ingestão de alimentos contaminados com micro-organismos ou substâncias químicas. A manifestação clínica mais comum das doenças de origem alimentar assume a forma de sintomas gastrointestinais; entretanto, podem também apresentar sintomas relacionados a distúrbios neurológicos, ginecológicos, imunológicos, entre outros. Diversos patógenos são conhecidos por causarem doenças quando veiculados a alimentos e água, entre os quais as bactérias constituem um grande grupo de micro-organismos causadores de doenças, com destaque para *Staphylococcus aureus*. Estima-se que 25 % da população humana seja portadora permanente deste micro-organismo. Uma vez instalado em seu hospedeiro, pode causar uma enorme variedade de sintomas clínicos, afetando a pele, pulmões, coração, sistema nervoso central, ossos e articulações, corrente sanguínea e trato gastrointestinal<sup>1</sup>. A intoxicação alimentar estafilocócica manifesta-se logo após a ingestão do alimento contaminado com enterotoxinas pré-formadas, sendo que para a produção de enterotoxinas em quantidade suficiente para provocar intoxicação são necessárias entre  $10^5$  a  $10^6$  unidades formadoras de colônias (UFC) de *S. aureus* por grama de alimento<sup>2</sup>.

Com relação ao ambiente hospitalar, este além de permitir a seleção de agentes infecciosos resistentes em decorrência do uso indiscriminado de antimicrobianos e por reunir pessoas com diferentes vulnerabilidades à infecção, apresenta intensa realização de procedimentos invasivos, aspectos que o caracterizam como um ambiente favorável à propagação das infecções hospitalares<sup>3</sup>.

Dentre os principais patógenos de infecção hospitalar, destacam-se as espécies de *Pseudomonas*, sendo a *Pseudomonas aeruginosa* o principal micro-organismo de interesse clínico<sup>4</sup>, devido sua capacidade de adaptação às condições de nutrição, temperatura e umidade disponíveis no ambiente, bem como sua resistência intrínseca ou adquirida

a diversos antimicrobianos e desinfetantes<sup>5</sup>, sendo oportunista e podendo causar infecções urinárias, dermatites e uma grande variedade de infecções sistêmicas, principalmente em pacientes imunocomprometidos<sup>6</sup>. Outra característica marcante e preocupante desta espécie é a resistência cruzada aos antimicrobianos, que resulta da co-resistência, ou seja, da presença de múltiplos mecanismos de resistência num único hospedeiro levando à resistência a múltiplos fármacos<sup>7,8</sup>.

A resistência às drogas antimicrobianas é causada pela mutação espontânea e recombinação gênica, que desenvolvem variedades genéticas onde a seleção natural acontece dando vantagens às mais resistentes. A resistência microbiana aos antibióticos tornou-se um problema de saúde pública mundial, que ocasiona diminuição da eficácia dos antibióticos e, uma vez que os micro-organismos se tornam resistentes aos medicamentos de primeira linha, torna-se necessário o uso de farmacoterapias de custos mais elevados<sup>9,10</sup>, sendo que em algumas regiões do mundo, infecções são resistentes a todos antibióticos conhecidos<sup>11</sup>.

A resistência cada vez maior de micro-organismos aos produtos químicos e drogas convencionais levou os cientistas a pesquisarem novas fontes de antimicrobianos com atividades de amplo espectro<sup>12</sup>. Os óleos essenciais contêm uma vasta série de metabólitos secundários que podem inibir ou retardar o crescimento de bactérias, leveduras e bolores, cujos componentes têm uma variedade de alvos de ação, particularmente sobre a membrana e o citoplasma microbiano, e em certas situações alteram completamente a morfologia das células<sup>12-14</sup>, podendo ser uma alternativa ao uso de pesticidas sintéticos e como conservantes de alimentos<sup>15,16</sup>. Os óleos essenciais são líquidos voláteis, de cor límpida, solúveis em lipídeos e solventes orgânicos que têm densidade inferior à da água. Eles podem estar presentes em todos os órgãos de plantas, incluindo botões, flores, folhas, sementes, ramos, caules, flores, frutos, raízes ou casca, mas geralmente estão armazenados em células secretoras, cavidades, canais, tricomas glandulares ou células epidérmicas. Estas plantas em geral

são conhecidas por seus efeitos antioxidantes, bem como por suas propriedades antissépticas, medicinais e pela fragrância, sendo muitas vezes usadas na preservação de alimentos e como analgésicos, sedativos, anti-inflamatórios, anestésicos locais e espasmolíticos<sup>16</sup>.

Existem vários métodos para avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos vegetais. Os mais conhecidos incluem método de difusão em ágar, método de microdiluição e método de microdiluição.

O trabalho visou avaliar a eficácia da atividade antibacteriana dos óleos essenciais de canela (*Cinnamomum cassia*), orégano (*Origanum vulgare*), citronela (*Cymbopogon nardus*) e cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) e os compostos isolados citral e carvacrol, sobre bactérias patogênicas (*P. aeruginosa* e *S. aureus* ATCC 25923) por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) e verificar, dentre os compostos testados, aqueles que apresentam maior potencial de uso como antimicrobiano.

## MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa desenvolvida foi dispensada da submissão ao Comitê de Ética por não envolver, de forma direta, pesquisas em seres humanos ou animais.

### Micro-organismos, manutenção e preparação do inóculo

Os micro-organismos utilizados neste estudo foram *S. aureus* ATCC 25923, cedido pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal de Lavras e *P. aeruginosa* isolada de aspirado traqueal, pertencente à coleção de culturas do laboratório de um hospital do Sul Fluminense – RJ, gentilmente cedida para a realização do estudo.

As culturas estoque foram mantidas em meio de congelamento (glicerol: 15 mL; peptona bacteriológica: 0,5 g; extrato de levedura: 0,3 g; NaCl: 0,5 g e água destilada: 100 mL) à -18 °C.

Para a reativação das cepas, foram inoculados 10 µL da cultura estoque em tubos contendo 3 mL

de caldo TSB (Caldo Trypticaseína de Soja) e incubados a 37 °C por 24 h. Após período de incubação, procedeu-se o crescimento em TSA (Ágar Trypticaseína de Soja). As suspensões bacterianas foram padronizadas para conter 10<sup>7</sup> UFC/mL, por meio da escala de MacFarland.

### Óleos essenciais e compostos isolados

Os óleos essenciais de cravo-da-índia (*S. aromaticum*), canela (*C. cassia*) e orégano (*O. vulgare*) foram adquiridos de FERQUIMA<sup>®</sup> Indústria e Comércio Ltda. O óleo essencial de citronela (*C. nardus*) foi extraído de acordo com a metodologia descrita por Guimarães et al<sup>17</sup> e caracterizado por cromatografia em fase gasosa no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras. Os compostos fenólicos citral e carvacrol foram adquiridos de Sigma-Aldrich<sup>®</sup>. Os componentes majoritários dos óleos essenciais, conforme especificado pelo fornecedor, foram: a) para o óleo de cravo-da-índia: eugenol (84 %), beta-cariofileno (6 %), acetato de eugenila (8 %); b) para o óleo essencial de canela: aldeído cinâmico (81 %), cumarina (3 %), benzaldeído (3 %), álcool cinâmico (3 %), estireno (3 %); c) para o óleo essencial de orégano: carvacrol (71 %), γ-terpineno (4,5 %), β-cariofileno (4 %), p-cimeno (3,5 %), timol (3 %). O óleo essencial de citronela, após quantificação e caracterização de seus componentes, apresentou os seguintes compostos majoritários: geraniol (33,7 %), citronelal (23,2 %), β-citronelol (14,2 %), elemol (3,6 %) e β-elemeno (3,6 %). A diluição dos óleos essenciais e compostos majoritários foi realizada na proporção 10 µL para 990 µL de TSB para *S. aureus* e na proporção de 50 µL para 950 µL de TSB para *P. aeruginosa*. Em cada diluição foi acrescida o emulsificante Tween 80 (0,5 %)<sup>18</sup>.

### Determinação das Concentrações Inibitória Mínima (CIM) e Bactericida Mínima (CBM)

O experimento foi conduzido em triplicata e realizado no Laboratório de Microbiologia e no Laboratório de Análises Clínicas do Centro Universitário de Barra Mansa.

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos óleos essenciais de canela, citronela, cravo-da-índia,

orégano e compostos fenólicos citral e carvacrol foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo realizada em microplacas de 96 cavidades, utilizando caldo TSB + 0,5 % de Tween 80, de acordo com o NCCLS (M7-A6)<sup>19</sup>. As concentrações finais (em %) dos óleos essenciais de canela, citronela, cravo-da-índia, orégano e composto fenólico citral para verificação da atividade antimicrobiana sobre *S. aureus* ATCC 25923 foram: 0,008; 0,01; 0,03; 0,06; 0,12; 0,25; 0,50; 1,00. As concentrações finais (em %) dos óleos essenciais de canela, citronela, cravo-da-índia, orégano e compostos fenólicos citral e carvacrol para verificação da atividade antimicrobiana sobre *P. aeruginosa* foram: 0,03; 0,07; 0,15; 0,31; 0,62; 1,25; 2,50; 5,00. Foram inoculados 10 µL de suspensão bacteriana, padronizada em 10<sup>7</sup> UFC/mL, nas cavidades das microplacas, que foram tampadas e incubadas a 37 °C por 24 h, com posterior leitura visual para determinação da CIM, que correspondeu à menor concentração dos compostos que resultou em inibição completa do crescimento bacteriano, em comparação ao controle. Para a determinação da CBM, cada uma das suspensões da microplaca preparada para a determinação da CIM foi semeada em placas contendo TSA, incubadas a 37 °C por 24 h. Em todos os ensaios foram utilizados um controle negativo, caldo TSB acrescido de 0,5 % de Tween 80 e óleo essencial ou seus compostos isolados, e um controle positivo, caldo TSB acrescido de Tween 80 e inóculo bacteriano.

### Determinação da redução logarítmica

Foi determinada a redução logarítmica obtida após tratamento com as soluções antimicrobianas, de acordo com Sharma e Anand<sup>20</sup>, para cada tratamento empregado, por meio da seguinte equação  $\text{Log } N - \text{Log } n$ , em que  $N$  é a concentração inicial do inóculo bacteriano (neste estudo, 10<sup>7</sup> UFC/mL) e  $n$  é a contagem de células após tratamento com os compostos antimicrobianos.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

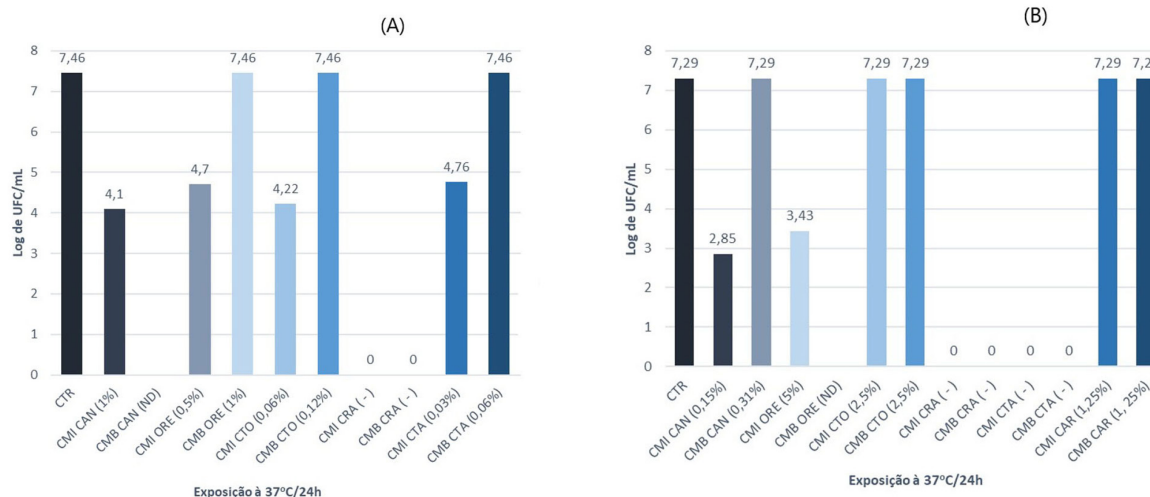
Os resultados obtidos para atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, canela, orégano, citronela e dos compostos isolados citral e carvacrol, expressos como CIM e CBM, estão dispostos na **Tabela** e os valores de redução logarítmica obtidos para *S. aureus* e *P. aeruginosa* estão expressos na **Figura**.

Os dados apresentados indicam que tanto *S. aureus* quanto *P. aeruginosa* apresentaram susceptibilidade a maior parte dos óleos essenciais e compostos isolados testados, sendo que organismos Gram-negativos são menos susceptíveis à ação de antibacterianos por apresentarem uma membrana externa envolvendo a parede celular<sup>21</sup> que restringe a difusão de compostos hidrofóbicos através de sua cobertura lipopolissacarídica<sup>22</sup>.

**Tabela.** Valores de CIM e CBM após a exposição de células de *S. aureus* ATCC 25923 e *P. aeruginosa* isolada de aspirado traqueal a diferentes concentrações de óleos essenciais e compostos citral e carvacrol

Compostos	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	CIM (%)	CBM (%)	CIM (%)	CBM (%)
OE de canela	1	NO	0,15	0,31
OE de orégano	0,5	1	5	NO
OE de citronela	0,06	0,12	2,5	2,5
OE de cravo-da-índia	(-)	(-)	(-)	(-)
Citral	0,03	0,06	(-)	(-)
Carvacrol	NT	NT	1,25	1,25

\*Nota: CIM = Concentração Inibitória Mínima; CBM = Concentração Bactericida Mínima; NO = não observado; (-) = ausência de atividade antimicrobiana; NT= não testado



**Nota:** CTR: controle positivo; CAN: canela; ORE: orégano; CTO: citronela; CRA: cravo-da-índia; CTA: citral; CAR: carvacrol; NO: não observado; CIM: concentração inibitória mínima; CBM: concentração bactericida mínima.

**Figura.** Redução logarítmica observada após exposição a diferentes concentrações de óleos essenciais e compostos frente a (A) *S. aureus* ATCC 25923 e (B) *P. aeruginosa* isolada de aspirado traqueal

Entre os óleos essenciais avaliados, o de cravo-da-índia foi o único que não promoveu inibição no crescimento microbiano em nenhuma concentração avaliada, ao contrário do que foi observado por Abdullah et al<sup>23</sup>, que ao testarem o óleo essencial de cravo-da-índia frente a seis diferentes micro-organismos por meio do método de difusão em ágar, verificaram atividade antimicrobiana para todos os micro-organismos avaliados em concentrações a partir de 0,625 % e de 1,25 % para *S. aureus* e para *P. aeruginosa*, respectivamente – e por Ates e Erdogru<sup>24</sup>, que verificaram que o óleo essencial de cravo-da-índia promoveu inibição de uma gama de micro-organismos através do método de difusão em placa.

Para o óleo essencial de orégano, a CIM verificada foi de 0,50 % para *S. aureus*, em conformidade com estudos anteriores que evidenciaram valores aproximados de CIM para este óleo essencial entre 0,25 % e 1,00 %<sup>25,26</sup>; para *P. aeruginosa*, o óleo essencial de orégano apresentou valor de CIM de 5 % e assim como Becerril et al<sup>27</sup>, que encontraram resultados inibitórios deste óleo essencial contra *P. aeruginosa*, indica que este óleo essencial é um agente antimicrobiano eficiente mesmo em baixas concentrações.

O óleo essencial de canela apresentou CIM de 1 % e 0,15 % frente *S. aureus* e *P. aeruginosa*, respectivamente. Chaudhry e Tariq<sup>28</sup> testaram a atividade antimicrobiana de *C. cassia* contra 178 cepas de 12 gêneros bacterianos isolados de cavidade oral e evidenciaram efeitos inibitórios e bactericidas, ressaltando ainda que sua atividade antimicrobiana é devida ao composto majoritário cinamaldeído, além de componentes como eugenol, ácido cinâmico, diterpenos e proantocianidinas.

O citral, um dos principais componentes do óleo essencial de citronela, apresentou efeito inibitório e bactericida somente para *S. aureus*, nas concentrações 0,03 e 0,06 % respectivamente, enquanto que o óleo essencial de citronela apresentou os mesmos efeitos em concentrações duas vezes maiores, 0,06 e 0,12 %, respectivamente. Além do citral, outros compostos são encontrados no óleo essencial de citronela, como linalol, citronelal, citronelol, cis-citral, geraniol, trans-citral, acetato de geranila e  $\beta$ -cariofileno<sup>29</sup>, sendo que o efeito antibacteriano do óleo essencial pode estar relacionado às altas quantidades de citronelal e limoneno<sup>30</sup>. Diferentemente do composto citral, o óleo essencial de citronela apresentou atividade antimicrobiana contra *P. aeruginosa*, com CIM e CBM de 2,5 %; estes resultados evidenciam que outros compostos são responsáveis pela ação

antimicrobiana com possível sinergismo, uma interação positiva em que dois ou mais agentes em combinação exercem efeito inibitório maior que cada agente isolado<sup>31</sup>. Seixas et al<sup>32</sup> testaram o óleo essencial de citronela sobre *Fusarium subglutinans* e constataram que o óleo essencial mostrou maior atividade em relação aos principais compostos isoladamente, ou seja, os compostos da citronela atuaram de forma conjunta proporcionando maior efeito antimicrobiano devido à atividade sinérgica entre os compostos. Vários outros estudos apontam a atividade antimicrobiana do óleo essencial de citronela e do citral contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*<sup>29,33,34</sup>.

O composto carvacrol foi testado somente frente a *P. aeruginosa*, sendo que a concentração de 1,25 % foi considerada tanto inibitória quanto bactericida.

Quanto ao potencial para reduzir cargas microbianas presentes, a Figura evidencia que as concentrações bactericidas dos compostos citral e carvacrol para *S. aureus* e *P. aeruginosa* respectivamente, promoveram redução logarítmica comparável ao controle - 7,46 Log UFC/mL para *S. aureus* e 7,29 Log UFC/mL para *P. aeruginosa*.

Para os óleos essenciais, as concentrações bactericidas apresentaram redução logarítmica comparável ao controle, com exceção do OE de canela para *S. aureus* e do OE de orégano para *P. aeruginosa*, para os quais não foi observado o efeito bactericida, somente o efeito inibitório que permitiram redução de 4,1 Log UFC/mL e 3,4 Log UFC/mL, respectivamente.

Para *S. aureus*, as concentrações inibitórias dos óleos essenciais de canela, citronela e orégano promoveram reduções logarítmicas de 4,1 Log UFC/mL, 4,2 Log UFC/mL e 4,7 Log UFC/mL, respectivamente. Considerando que a presença de enterotoxinas estafilocócicas está associada a presença de  $10^5$  a  $10^6$  UFC de *S. aureus* por grama de alimento<sup>2</sup> e que a redução da população microbiana pode prevenir intoxicações de origem bacteriana no homem e, conseqüentemente a ocorrência de surtos de doenças transmitidas por alimentos<sup>35</sup>, a utilização de óleos essenciais ou compostos majoritários, como apresentado neste estudo, pode ser uma alternativa importante para prevenção da presença de enterotoxinas.

## CONCLUSÃO

O estudo permitiu constatar a eficácia dos óleos essenciais de canela, orégano, citronela e dos compostos citral e carvacrol no controle de micro-organismos patogênicos de origens clínica e alimentar e verificar aqueles que apresentaram maior potencial antimicrobiano, como o óleo essencial de citronela e o composto citral frente a *S. aureus* e o óleo essencial de canela frente a *P. aeruginosa*.

## REFERÊNCIAS

1. Bachert C, Gevaert P, Van Cauwenberge P. *Staphylococcus aureus* enterotoxins: a key in airway disease? *Allergy*. 2002;57(6):480-7. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1034/j.1398-9995.2002.02156.x>].
2. Borges MF, Nassu RT, Pereira JL, Andrade APC, Kuaye, AY. Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. *Cienc Rural*. 2008;38(5):1431-8.
3. Appolinário RS. Absenteísmo na equipe de enfermagem: análise da produção científica. *R Enferm*. 2008;16(1):83-7.
4. Euzéby JP. LPSN. List of prokariotic names with standing in nomenclature. [acesso 2016 maio 29]. Disponível em: [<http://www.bacterio.net/pseudomonas.html>].
5. Tavares W. Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antifécciosos. 3ª ed. São Paulo: Atheneu; 2002.
6. Koneman WE, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr WC. Bacilos Gram-Negativos Não-Fermentadores. In: Koneman, E. W. Diagnóstico microbiológico - texto e atlas colorido. 5ª ed. Rio de Janeiro: Médica e Científica, 2001;263-329.
7. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis*. 2002;34(5):634-40. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1086/338782>].
8. McGowan JE Jr. Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. *Am J Med*. 2006;119(6 Suppl 1):S29-36. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.amjmed.2006.03.014>].

9. ECDC/EMEA. Joint Technical Report. The bacterial challenge: time to react. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control; 2009. [DOI: <http://dx.doi.org/10.2900/2518>].
10. World Health Organization - WHO. Antimicrobial resistance, fact sheet 194. [acesso 2016 Mai 23] Disponível em: [<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>].
11. Abad MJ, Ansuategui M, Bermejo P. Active antifungal substances from natural sources. *Arkivoc*. 2007;7:116–45.
12. Chorianopoulos NG, Giaouris ED, Skandamis PN, Haroutounian SA, Nychas GJ. Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid-base sanitizers. *J Appl Microbiol*. 2008;104(6):1586–96. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.13652672.2007.03694.x>].
13. Burt SA, Reinders RD. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett Appl Microbiol*. 2003;36(3):162–7. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01285.x>].
14. De Martino L, De Feo V, Nazzaro F. Chemical composition and *in vitro* antimicrobial and mutagenic activities of seven Lamiaceae essential oils. *Molecules*. 2009;14(10):4213–30. [DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules14104213>].
15. Antunes MDC, Cavaco AM. The use of essential oils for postharvest decay control. A review. *Flavour Fragr J*. 2010;25(5):351–366. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ffj.1986>].
16. Nedorostova L, Kloucek P, Kokoska L, Stolcova, M. Comparison of antimicrobial properties of essential oils in vapour and liquid phase against foodborne pathogens. *Planta Med*. 2008, 74:PI6. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0028-1084914>].
17. Guimarães LGL, Cardoso MG, Zacaroni LM, Lima RK, Pimental FA, Morais AR. Influence of light and temperature on the oxidation of the essential oil of lemongrass (*Cymbopogon citratus* (D.C.) STAPP). *Quim Nova*. 2008;31(6):1476–80.
18. Inouye S, Tsuruoka T, Uchida K, Yamaguchi H. Effect of sealing and Tween 80 on the antifungal susceptibility testing of essential oils. *Microbiol Immunol*. 2001;45(3):201–8. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1348-0421.2001.tb02608.x>].
19. National Committee for Clinical Laboratory Standards - NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard — Sixth Edition. NCCLS document M7-A6, Wayne, Pa, USA; 2003.
20. Sharma M, Anand SK. Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry – a case. *Food Control*, 2002;13(6-7):469–77. [DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0956-7135\(01\)00068-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0956-7135(01)00068-8)].
21. Ratledge C, Wilkinson SG. An overview of microbial lipid. In: Ratledge C, Wilkinson SG (eds): *Microbial lipids*, Vol. 1 (pp 3– 22). London: Academic Press; 1988.
22. Vaara M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol Rev*. 1992;56(3):395–411.
23. Abdullah BH, Hatem SF, Jumaa W. A comparative study of the antibacterial activity of clove and rosemary essential oils on multidrug resistant bacteria. *UK J Pharm Biosci*. 2015;3(1):18–22. [DOI: <http://dx.doi.org/10.20510/ukjpb/3/i1/89220>].
24. Ates DA, Erdogrul OT. Antimicrobial activities of various medicinal and commercial plant extracts. *Turk J Biol*. 2003;27:157–62.
25. Santos JC, Carvalho Filho CD, Barros TF, Guimarães AG. *In vitro* antimicrobial activity of essential oils from oregano, garlic, clove and lemon against pathogenic bacteria isolated from *Anomalocardia brasiliensis*. *Semin: Ciênc Agrár*. 2011;32(4):1557–64. [DOI: <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2011v32n4p1557>].
26. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol*. 1999;86(6):985–90. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00780.x>].
27. Becerril R, Nerín C, Gómez-Lus R. Evaluation of bacterial resistance to essential oils and antibiotics after exposure to oregano and cinnamon essential oils. *Foodborne Pathog Dis*. 2012;9(8):699–705. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2011.1097>].

28. Chaudhry NMA, Tariq P. Anti-microbial activity of *Cinnamomum cassia* against diverse microbial flora with its nutritional and medicinal impacts. *Pak J Bot*. 2006;38(1):169-74.
29. Nakahara K, Alzoreky NS, Yoshihashi T, Nguyen HTT, Trakoontivakorn G. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cymbopogon nardus* (citronella grass). *JARC*. 2003;37(4):249-52. [DOI: <http://dx.doi.org/10.6090/jarq.37.249>].
30. Millezi AF, Baptista NN, Caixeta DS, Rossoni DF, Cardoso MG, Piccoli RH. Caracterização química e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. *Rev Bras Plantas Med*. 2014;16(1):18-24. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722014000100003>].
31. Cuenca-Estrella M. Combinations of antifungal agents in therapy - what value are they? *J Antimicrob Chemother*. 2004;54(5):854-69. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkh434>].
32. Seixas PTL, Castro HC, Santos GR, Cardoso DP. Controle fitopatológico do *Fusarium subglutinans* pelo óleo essencial do capim-citronela (*Cymbopogon nardus* L.) e do composto citronelal. *Rev Bras Plantas Med*. 2011;13(esp):523-6. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722011000500003>].
33. Saddiq AA, Khayyat SA. Chemical and antimicrobial studies of monoterpene: Citral. *Pestic Biochem Physiol*. 2010;98(1):89-93. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2010.05.004>].
34. Wei LS, Wee W. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon nardus* citronella essential oil against systemic bacteria of aquatic animals. *Iran J Microbiol*. 2013;5(2):147-52.
35. Lamaita HC, Cerqueira MMOP, Carmo LS, Santos DA, Penna CFAM, Souza MR. *Staphylococcus sp.* counting and detection of staphylococcal enterotoxins and toxic shock toxin syndrome from cooled raw milk. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2005;57(5):702-9. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352005000500017>].



# Estudos da fauna flebotomínica (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) e infecção natural por *Leishmania infantum* em municípios da região noroeste do estado de São Paulo, Brasil

## Studies on the phlebotomine sandflies fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and on the natural infection by *Leishmania infantum* in municipalities of northwest region of the State of São Paulo

RIALA6/1720

Vanessa Gusmon da SILVA<sup>1</sup>, Helena Hilomi TANIGUCHI<sup>1</sup>, Virgínia Bodelão RICHINI-PEREIRA<sup>2</sup>, Diego Borin NÓBREGA<sup>3</sup>, Carlos Roberto ELIAS<sup>1</sup>, José Eduardo TOLEZANO<sup>1\*</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Núcleo Parasitoses Sistêmicas, Centro de Parasitologia e Micologia, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira César, São Paulo, SP, Brasil, CEP 01246-902. Tel: 11 3068 2891. Email: tolezano@hotmail.com

<sup>2</sup>Núcleo de Ciências Biomédicas, Centro do Laboratório Regional de Bauru, Instituto Adolfo Lutz

<sup>3</sup>Department of Production Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Calgary

Recebido: 23.09.2016 - Aceito para publicação: 23.03.2017

### RESUMO

A expansão geográfica e o crescente aumento dos casos de leishmaniose visceral na região noroeste do estado de São Paulo despertaram o interesse em desenvolver estudo para identificar a fauna flebotomínica e avaliar sua infecção natural por *Leishmania infantum* nos municípios de Fernandópolis, Santa Fé do Sul e Votuporanga. Foram realizados inquéritos entomológicos com a utilização de armadilhas luminosas do tipo CDC, instaladas em diferentes ecótopos peridomiciliares, durante o período de agosto de 2013 a novembro de 2014. A detecção de DNA de *L. infantum* em flebotomíneos foi realizada por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Foram coletados 507 flebotomíneos, sendo 116 fêmeas (22,9%) e 391 machos (77,1%), representados por sete espécies, com predomínio de *Lutzomyia longipalpis*, com 461 exemplares (90,9%). As análises moleculares revelaram DNA de *L. infantum* em um exemplar de *L. longipalpis* capturado em Fernandópolis. Estes resultados confirmam a presença desta espécie nos municípios pesquisados. E o encontro de pelo menos um exemplar, naturalmente infectado, em Fernandópolis evidencia a necessidade de realizar ações de controle direcionadas aos vetores neste município, com o intuito de conter sua dispersão e prevenir a ocorrência de casos humanos de leishmaniose visceral.

**Palavras-chave.** leishmaniose visceral, *Lutzomyia longipalpis*, *Leishmania*.

### ABSTRACT

The geographical expansion and the increase of visceral leishmaniasis cases in northwest region of the São Paulo state aroused the interest of conducting a study to identify the phlebotomine sandflies fauna, and to evaluate the rate of natural infection by *Leishmania infantum* in Fernandópolis, Santa Fé do Sul and Votuporanga. Entomological surveys were conducted using the CDC miniature light traps, installed in different types of peridomestic ecotopes, during the period from August 2013 to November 2014. The *L. infantum* DNA detection in phlebotomine sandflies was performed by means of conventional Polymerase Chain Reaction (PCR). Five hundred seven phlebotomine sandflies specimens were collected, being 116 females (22.9%) and 391 males (77.1%), which were represented by seven species, prevailing *Lutzomyia longipalpis*, with 461 specimens (90.9%). Molecular analysis revealed DNA of *L. infantum* in one specimen of *L. longipalpis* from Fernandópolis. These findings confirm the occurrence of this species in all of the surveyed municipalities. And the existence of at least one specimen, naturally infected in Fernandópolis, highlights the need for performing the further control measures directed to the vectors in this municipality, for restraining their spread and to prevent the occurrence of human cases of visceral leishmaniasis.

**Keywords.** visceral leishmaniasis, *Lutzomyia longipalpis*, *Leishmania*.



## INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é a forma mais grave de um complexo de doenças humanas e animais denominadas leishmanioses, sendo endêmica, em 70 países e está amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais<sup>1</sup>. Seu grande impacto na saúde pública ocorre devido às altas taxas de letalidade e morbidade, bem como a sua endemicidade em populações de baixa renda de diversos países, tornando-a, assim uma das doenças mais negligenciadas em todo o mundo<sup>2</sup>.

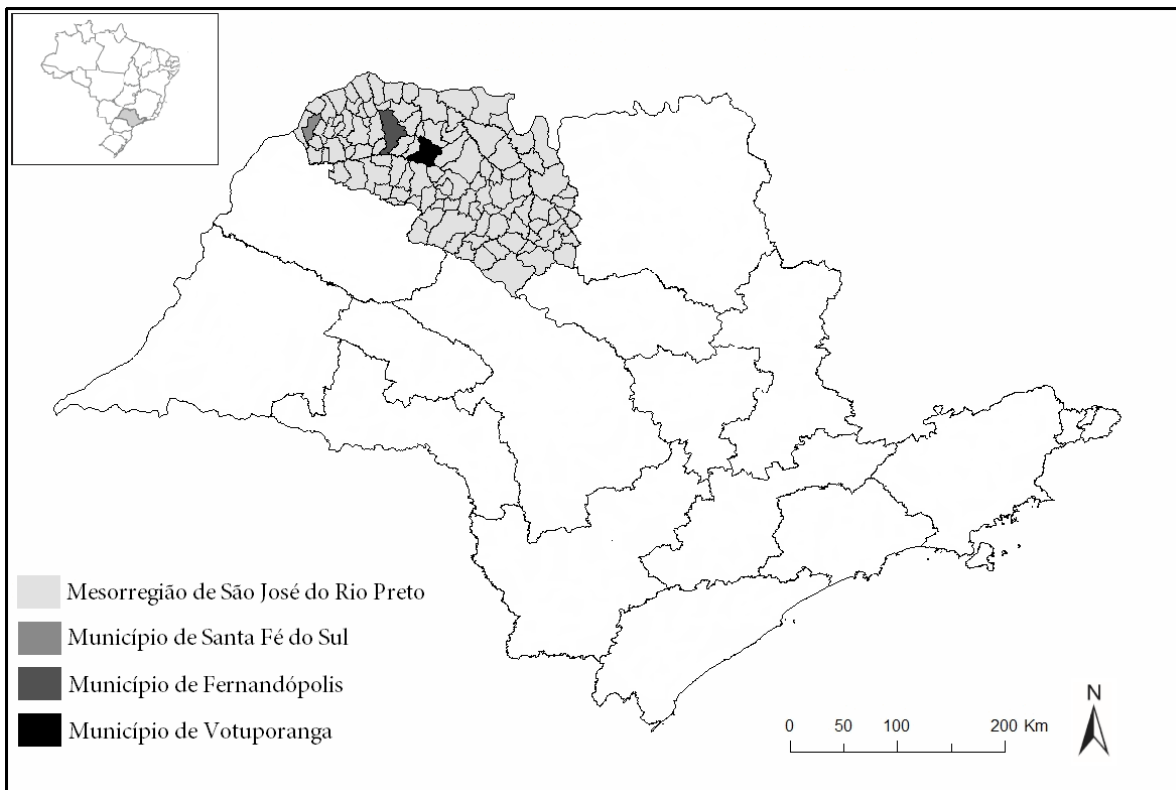
No estado de São Paulo, a doença foi notificada, pela primeira vez, em 1999, no município de Araçatuba e, desde então, expandiu-se pelo estado, primeiramente nos municípios adjacentes à Araçatuba e, subsequentemente naqueles que estabeleceram um fluxo migratório com os municípios endêmicos da região do extremo oeste paulista<sup>3-5</sup>.

Com a identificação de foco de leishmaniose visceral na mesorregião de São José do Rio Preto, confirmada em 2009, primeiramente, no município de Jales e, posteriormente, expandindo-se aos municípios de Urânia, Santa Fé do Sul e Votuporanga, estudos vêm sendo desenvolvidos na região com o intuito de explicar o quadro epidemiológico da doença<sup>6,7</sup>. Assim, este estudo tem como objetivo realizar um levantamento da fauna flebotômica e avaliar a taxa de infecção natural dos mesmos por *Leishmania infantum* nos municípios de Fernandópolis, Santa Fé do Sul e Votuporanga.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Área de estudo

As coletas entomológicas foram realizadas nos municípios de Fernandópolis, Santa Fé do Sul e Votuporanga, todos da mesorregião de São José do Rio Preto (**Figura**). Esta mesorregião tem como linhas demarcatórias os rios Paraná



**Figura.** Mapa do estado de São Paulo, destacando a mesorregião de São José do Rio Preto e os municípios de Santa Fé do Sul, Fernandópolis e Votuporanga

e Grande, e, em sua composição física, apresenta um relevo pouco acidentado, localizada no Planalto Ocidental da Bacia Sedimentar do rio Paraná, sobre as formações Adamantina e Santo Anastácio, ambas as unidades do Grupo Bauru<sup>8</sup>. De acordo com o Sistema de Informação Ambiental do Programa Biota/Fapesp – SinBiota<sup>9</sup>, a vegetação da região é constituída por fragmentos de Floresta Estacional Semidecidual (Mata Atlântica) em contato com agrupamentos de Savana (Cerrado). Segundo a classificação de Köppen, a região é caracterizada, predominantemente, pelo clima tropical chuvoso com inverno seco (Aw), cuja temperatura média no mês mais frio é superior a 18 °C. Apresenta também precipitações superiores a 750 mm anuais, podendo chegar a 1800 mm<sup>10</sup>.

### Coleta e identificação dos flebotomíneos

As coletas foram realizadas de forma não sistematizada, durante o período de agosto de 2013 a novembro de 2014 (Tabela 1), utilizando armadilhas de isca luminosa do tipo CDC instaladas em distintos ecótopos peridomiciliares (galinheiros, pocilgas, currais, canis e áreas de mata) em 49 pontos de coleta: sendo 4 em Fernandópolis, 6 em Santa Fé do Sul e 39 em Votuporanga. As armadilhas foram posicionadas a uma altura de, aproximadamente, um metro do solo, sendo estas ligadas pouco tempo antes do crepúsculo vespertino e desligadas e/ou retiradas após o crepúsculo matutino, permanecendo, assim, funcionando durante todo o período noturno ininterruptamente.

Os flebotomíneos machos foram examinados conforme descrito por Forattini<sup>11</sup>, em relação

às fêmeas, somente a cabeça e os três últimos segmentos foram montados em lâmina e lamínula, e o restante do corpo foi encaminhado para análise molecular. A identificação e a nomenclatura taxonômica foram realizadas de acordo com Galati<sup>12</sup>.

### Diagnóstico molecular da infecção dos flebotomíneos

As fêmeas foram agrupadas em *pools* (1-6 espécimes) de acordo com a espécie, data e local da coleta. O DNA foi extraído por meio do kit DNeasy<sup>®</sup> Blood & Tissue (Qiagen), seguindo o protocolo do fabricante com algumas modificações. Estas incluíram, inicialmente, duas incubações com proteinase K e Buffer ATL, sendo a primeira com duração de uma hora a 56 °C, seguida por outra a 70 °C por 10 minutos. Outra incubação por 10 minutos a 56 °C também foi realizada, quando se adicionou o Buffer AL.

O DNA extraído foi amplificado, primeiramente, usando os seguintes iniciadores para amplificação do gene ITS1 de *Leishmania*<sup>13</sup>: LITSR (5' CTGGATCATTTTCCGATG 3') e L5.8S (5' TGATACCACTTATCGCACTT 3'), que amplificam um fragmento de 300-350 pares de base<sup>14</sup>. A mistura de reação (12 µL) foi preparada contendo a concentração final de 0,2 µM de cada iniciador; 1,6 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM dNTP (Invitrogen<sup>®</sup>); 1 U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen<sup>®</sup>), tampão da enzima e 1 µL de DNA da amostra. A amplificação do DNA foi realizada em termociclador automático Veriti<sup>®</sup> Thermal Cycler (Applied Biosystems<sup>®</sup>), utilizando o seguinte ciclo: desnaturação inicial

**Tabela 1.** Frequência mensal das coletas de flebotomíneos realizadas nos municípios pesquisados, entre o período de agosto de 2013 a novembro de 2014

Município	Número de coletas entomológicas																	
	Ano 2013					Ano 2014										Total		
	Mês	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set		Out	Nov
Fernandópolis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	2	-	-	-	4
Santa Fé do Sul	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	2
Votuporanga	4	2	-	2	6	5	4	3	-	-	-	1	2	7	-	-	2	38

a 95 °C durante 2 minutos, seguido por 35 ciclos de 95 °C durante 20 segundos (desnaturação), 53 °C durante 30 segundos (anelamento) e 72 °C durante 60 segundos (extensão), e com uma extensão final de 72 °C por 6 minutos. Para cada bateria de amostra submetida à amplificação, foi utilizado um controle negativo (água livre de nucleasse) e um controle positivo (DNA extraído de cultura de *Leishmania braziliensis* MHOM/BR/1975/M2903).

Em sequência, as amostras positivas na primeira reação foram submetidas a PCR espécie-específica, dirigida a um fragmento de minicírculo de kDNA de *L. infantum*. Os iniciadores usados foram Lch14 (5' CGCACGTTATATCTACAGGTTGAG 3') e Lch15 (5' TGTTTGGGATTGAGGTAATAGTGA 3') que amplificam um fragmento de 167 pares de base<sup>15</sup>. A mistura de reação (12 µL) foi preparada contendo a concentração final de 0,2 µM de cada iniciador; 1,6 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM dNTP (Invitrogen®); 1 U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen®), tampão da enzima e 1 µL de DNA da amostra. As condições térmicas foram aplicadas como descrito por Lachaud et al<sup>16</sup>. A cada conjunto de reações foi utilizado um controle negativo (água livre de nuclease) e dois controles positivos (DNAs extraídos de culturas de *L. infantum* MHOM/BR/2002/LPC-RPV e *L. infantum*).

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1 % corado com SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen®), e visualizados pelo Software GeneTools (Syngene) usando o transluminador DigiGenius (Syngene).

### Análises estatísticas

Os dados foram organizados em planilhas e as análises descritivas foram registradas no programa Microsoft Excel® (Office 2010). A taxa mínima de infecção foi estimada como descrito por Paiva et al<sup>17</sup>. Também foi calculado o risco relativo de um flebotomíneo fêmea infectar um ser humano com *L. infantum*, através do Índice Estimado do Risco de Exposição (IERE), de forma simplificada, conforme descrito por Orshan et al<sup>18</sup>, que consiste na multiplicação do percentual de fêmeas infectadas (número de *pools* positivos dividido pelo número total de fêmeas analisadas) pelo número de espécimes

do sexo feminino coletados nas capturas relevantes.

Intervalos de confiança para as proporções estimadas foram calculados seguindo-se a distribuição binomial. Análises foram conduzidas no software R.

## RESULTADOS

No total foram coletados 507 flebotomíneos, representados por 391 (77,1 %; IC95 %: 73,2 - 80,7) machos e 116 (22,9 %; IC95 %: 19,3 - 26,8) fêmeas. No município de Fernandópolis foram coletados 55 flebotomíneos, dos quais 7 (12,7 %; IC95 %: 5,3 - 24,5) eram fêmeas; em Santa Fé do Sul foram coletados 70 flebotomíneos, sendo 7 (10 %; IC95 %: 4,1 - 19,5) fêmeas em apenas dois dos seis pontos de coleta instalados; e, em Votuporanga foram coletados 382 flebotomíneos, sendo 102 (26,7 %; IC95 %: 22,3 - 31,4) fêmeas em 38 dos 39 pontos de coleta onde foram colocadas armadilhas luminosas.

Na **Tabela 2**, verifica-se que foram coletadas 7 espécies de flebotomíneos, representadas por *Brumptomyia avellari*, *Brumptomyia cunhai*, *Evandromyia lenti*, *Evandromyia sallesi*, *Lutzomyia longipalpis*, *Migonemyia migonei*, *Nyssomyia whitmani*. Nos municípios de Fernandópolis, Santa Fé do Sul e Votuporanga, a espécie predominante foi *L. longipalpis* com 92,8 %; 95,8 % e 89,9 %, respectivamente.

A PCR foi realizada em 116 fêmeas de flebotomíneos agrupadas em 53 *pools*, sendo 1 *pool* de *E. lenti* e 4 de *L. longipalpis* oriundos de Fernandópolis; 4 *pools* de *L. longipalpis* de Santa Fé do Sul; e, 3 *pools* de *B. avellari*, 5 de *E. lenti* e 37 de *L. longipalpis* provenientes de Votuporanga. Destes, somente um exemplar de *L. longipalpis*, proveniente de Fernandópolis, coletado em galinheiro, amplificou tanto na PCR gênero-específico para *Leishmania* quanto na PCR espécie-específico para *L. infantum*.

De modo geral, considerando que um *pool* de flebotomíneo apresentou positividade da PCR, foi possível deduzir uma taxa de infecção de 0,86% (1/116 fêmeas; IC95 % 0,0 - 4,7 %). No entanto, ao avaliarmos esta taxa por município pesquisado, o município de Fernandópolis apresentou uma taxa mínima de infecção de 16,5 % (1/6 fêmeas;

**Tabela 2.** Total de flebotomíneos coletados nos municípios de Fernandópolis, Santa Fé do Sul e Votuporanga

Espécie	Fernandópolis					Santa Fé do Sul					Votuporanga				
	M	F	T	%	IC95%	M	F	T	%	IC95%	M	F	T	%	IC95%
<i>B. avellari</i>	0	0	0	0	-	0	0	0	0	-	12	6	18	4,7	3,3 - 6,5
<i>B. cunhai</i>	0	0	0	0	-	1	0	1	1,4	0,2 - 5,1	0	0	0	0	-
<i>E. lenti</i>	1	1	2	3,6	1,0 - 9,0	2	0	2	2,8	0,8 - 7,2	11	6	17	4,4	3,1 - 6,2
<i>E. sallesi</i>	0	0	0	0	-	0	0	0	0	-	3	0	3	0,8	0,3 - 1,7
<i>L. longipalpis</i>	45	6	51	92,8	86,2 - 96,8	60	7	67	95,8	91,0 - 98,4	253	90	343	89,8	87,4 - 91,8
<i>M. migonei</i>	0	0	0	0	-	0	0	0	0	-	1	0	1	0,3	0,0 - 0,9
<i>N. whitmani</i>	2	0	2	3,6	1,0 - 9,0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	-
<b>Total</b>	<b>48</b>	<b>7</b>	<b>55</b>	<b>100</b>	<b>-</b>	<b>63</b>	<b>7</b>	<b>70</b>	<b>100</b>	<b>-</b>	<b>280</b>	<b>102</b>	<b>382</b>	<b>100</b>	<b>-</b>

M: macho, F: fêmea, T: total

IC95 % 0,4 – 64,1 %). A probabilidade ou risco de uma espécie de flebotomíneo infectar um ser humano com *L. infantum* foi estimada em 14,3 % no município de Fernandópolis.

## DISCUSSÃO

Todas as espécies coletadas nas áreas de estudo já haviam sido registradas anteriormente no estado de São Paulo<sup>12,19</sup>.

Das 7 espécies coletadas, *L. longipalpis*, a principal vetora de *L. infantum*, foi a espécie predominante, representando 90,9 % dos exemplares coletados. Esta espécie é altamente antropofílica e de grande adaptabilidade aos ambientes antrópicos. Além disso, o comportamento eclético apresentado por *L. longipalpis* concomitantemente com a presença de animais domésticos e sinantrópicos favorecem a aproximação e a manutenção destes insetos no ambiente peridomiciliar<sup>20</sup>. Esta característica comportamental foi evidenciada nos três municípios pesquisados, uma vez que todos os exemplares foram coletados em abrigos de animais domésticos circundados ou não por árvores frutíferas próximas às habitações humanas.

Apesar de terem sido coletadas em pequeno número, duas outras espécies de importância epidemiológica, por serem incriminadas na transmissão de *L. braziliensis*, principal agente

etiológico da leishmaniose tegumentar no estado de São Paulo<sup>21</sup>, foram coletadas em Fernandópolis e Votuporanga, são elas: *M. migonei* e *N. whitmani*, respectivamente.

*E. lenti* foi a segunda espécie predominante, representando 4 % das espécies coletadas, e presente nos três municípios estudados. Apesar da baixa proporção, esta espécie merece destaque, pois já foi encontrada naturalmente infectada por *L. braziliensis*, em Minas Gerais e Mato Grosso do Sul, e *L. infantum*, em Minas Gerais<sup>22-25</sup>. Esta espécie é comumente encontrada em tocas de animais silvestres, anexos domésticos e, até mesmo, em paredes externas e internas de domicílios<sup>26,27</sup>. Neste estudo, *E. lenti* foi coletada associada aos anexos de animais domésticos nos municípios de Fernandópolis (galinheiro) e Santa Fé do Sul (pocilga); já em Votuporanga, foi capturada somente em um ponto de coleta caracterizado por apresentar uma residência muito próximo à área de mata.

Embora pouco expressiva, também merece destaque a espécie *E. sallesi*, que já foi encontrada naturalmente infectada por *L. infantum* em Lassance, MG, podendo estar envolvida em ciclos silvestres e/ou rurais de transmissão de LV nesta região<sup>28</sup>. Os espécimes desta espécie foram coletados nas proximidades de uma residência inserida em uma trilha ecológica, constituída de vegetação primária, localizada em área urbana do município de Votuporanga.

O gênero *Brumptomyia*, que apresenta preferência alimentar por dasipodídeos (tatus), e, desta forma, encontra-se comumente associada a eles<sup>26</sup>, foi representada por duas espécies: *B. avellari* e *B. cunhai* nos municípios de Votuporanga e Santa Fé do Sul, respectivamente. Estas espécies foram coletadas em armadilhas instaladas em abrigos de animais domésticos (pocilgas) adjuntos às áreas de mata, os quais, possivelmente, apresentam tocas de dasipodídeos em suas proximidades.

Com relação ao sexo, verificou-se predominância de machos em todos os municípios pesquisados, foram coletados 391 (77,1 %) exemplares machos e 116 (22,9 %) fêmeas. Estes dados corroboram aos encontrados por outros estudos, nos quais, na maioria das coletas, observa-se um número maior de machos que fêmeas<sup>25,29</sup>. Algumas hipóteses têm sido levantadas para explicar este padrão. Uma delas leva em consideração a emergência tardia das fêmeas em relação aos machos<sup>30,31</sup>. A outra leva em consideração a liberação de mediadores químicos, tais como cairomônios e feromônios, pelos hospedeiros vertebrados e flebotomíneos. Estudos realizados por Kelly e Dye<sup>32</sup> sobre a dinâmica de agregação de *L. longipalpis* mostram que os machos, atraídos por cairomônios liberados por galináceos, liberam feromônios e formam aglomerados com o intuito de atrair as fêmeas ao local do repasto sanguíneo, garantindo, assim, a cópula.

Neste estudo foi possível detectar a infecção de uma fêmea de *L. longipalpis* por *L. infantum* pela primeira vez no município de Fernandópolis, apresentando uma taxa de infecção natural do município em 16,5 %. Dados similares foram relatados por Saraiva<sup>33</sup>, em Belo Horizonte, MG, onde uma taxa de infecção de 19 % foi observada em *L. longipalpis* por *L. infantum*. Entretanto, este achado deve ser analisado com cautela, pois, em ambos os estudos, foram avaliados um número reduzido de insetos coletados nas localidades pesquisadas.

Dentre as variáveis utilizadas para a avaliação dos fatores de risco para leishmaniose visceral, considerando os dados entomológicos, um dos parâmetros valorizados é o da exposição

humana à picada dos flebotomíneos infectados<sup>18,34</sup>. Nesse estudo, foi estimado um IERE de 14,3 % no município de Fernandópolis, considerado superestimado em razão da alta taxa de infecção obtida no município, decorrente do reduzido número de coletas entomológicas realizadas.

## CONCLUSÃO

Em resumo, este estudo contribuiu para o conhecimento da fauna flebotomínica na região noroeste do estado de São Paulo, no entanto, estudos mais sistematizados são necessários para uma melhor caracterização da fauna de flebotomíneos nas regiões pesquisadas. Além disso, foi adicionalmente demonstrada a detecção de DNA de *L. infantum* em *L. longipalpis*, confirmando a sua capacidade e competência vetorial, e, demonstrando que a infecção circula em flebotomíneos encontrados no ambiente peridomiciliar. Por fim, esses achados evidenciam que as medidas de vigilância e controle precisam ser urgentemente estabelecidas nos municípios com o intuito de evitar a dispersão dos casos de leishmaniose visceral.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Processo 134438/2013/2). Aos médicos veterinários Mileno Castro Tonissi, Fabiana Sisto Sandrin Giacometi e Élcio Sanchez Esteves Júnior, das Prefeituras de Fernandópolis, Santa Fé do Sul e Votuporanga, respectivamente, bem como de toda a equipe dos CCZs pela colaboração nas coletas de flebotomíneos. E a equipe de campo do IAL, José Eduardo R. Barbosa, Roberto M. Hiramoto, Edson B. dos Anjos, Juliana M. Guerra e Natália C. C. A. Fernandes no auxílio das coletas entomológicas.

**Financiamento:** PPSUS-FAPESP 12/51267-4 e SVS-MS Chamamento de Pesquisa 20/2013.

## REFERÊNCIAS

1. Organização Mundial da Saúde – OMS. Regional Office for South-East Asia. FAQs: Frequently asked questions on visceral leishmaniasis (kala-azar). New Delhi. Índia: OMS; 2014. p. 20.
2. Organização Mundial da Saúde – OMS. Control of leishmaniasis. In: WHO Expert Committee on the control of leishmaniasis. Genebra. Suíça: OMS; 2010. p.186.
3. Camargo-Neves VLF, Katz G. Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo. *Rev Soc Bras Med Tropical*. 1999;32(Supl.2):63-4.
4. Tolezano JE, Luvizotto MCR, Uliana SRB, Araújo MFL, Taniguchi HH, Barbosa JAR, et al. Leishmaniose Visceral Americana (LVA) em Araçatuba, região oeste do Estado de São Paulo. Investigações laboratoriais e diagnóstico de uma doença emergente em terras paulistas. *Rev Soc Bras Med Tropical*. 1999;32(Supl.2):218.
5. Cardim MFM, Rodas LAC, Dibo MR, Guirado MM, Oliveira AM, Chiaravalloti Neto F. Introdução e expansão da leishmaniose visceral americana em humanos no estado de São Paulo, 1999-2011. *Rev Saúde Pública*. 2013;47(4):1-9. [DOI:<http://dx.doi.org/10.1590/S0034-8910.2013047004454>].
6. Scandar SAS, Silva RA, Cardoso Júnior RP, Oliveira FH. Ocorrência de leishmaniose visceral americana na região de São José do Rio Preto, estado de São Paulo, Brasil. *Bepa*. 2011;8(88):13-22.
7. Oliveira AM, Guirado MM, Dibo MR, Rodas LAC, Bocchi MR, Chiaravalloti Neto F. Occurrence of *Lutzomyia longipalpis* and human and canine cases of visceral leishmaniasis and evaluation of their expansion in the northwest region of the state of São Paulo, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016;49(1):41-50. [DOI:<http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0353-2015>].
8. Silva FP, Kiang CH, Caetano-Chang MR. Hidroestratigrafia do Grupo Bauru (K) no estado de São Paulo. *Águas Subterrâneas*. 2005; 19(2): 19-36. [DOI:<http://dx.doi.org/10.14295/ras.v19i2.8225>].
9. Sistema de Informação Ambiental do Programa Biota/Fapesp – SinBiota. Atlas Biota 2.1. [acesso em 2016 Ago 23]. Disponível em: [<http://sinbiota.biota.org.br/>].
10. Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas a Agricultura – Cepagri. Clima dos municípios paulistas: a classificação climática de Köppen para o estado de São Paulo. [acesso em 2016 Ago 23]. Disponível em: [<http://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima-dos-municipios-paulistas.html>].
11. Forattini OP. Entomologia médica. 4ª ed. São Paulo: Ed. Edgard Blucher; 1973.
12. Galati EAB. Phlebotominae (Diptera, Psychodidae): classificação, morfologia, terminologia e identificação de adultos. Apostila da disciplina Bioecologia e Identificação de Phlebotominae. São Paulo: Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo. 126p.
13. El Tai NO, Osman OF, EL Fari M, Presber W, Schönián G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2000;94(5):575-9.
14. Schönián G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003; 47(1): 349-58. [DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0732-8893\(03\)00093-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0732-8893(03)00093-2)].
15. Silva RC, Richini-Pereira VB, Kikuti M, Marson PM, Langoni H. Detection of *Leishmania (L.) infantum* in stray dogs by molecular techniques with sensitive species-specific primers. *Vet Q*. 2007;37(1):23-30. [DOI:<http://dx.doi.org/10.1080/1652176.2016.1252073>].
16. Lachaud L, Marchergui-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP, Bastien P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol*. 2002;40(1):210-5. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.40.1.201-215.2002>].
17. Paiva BR, Secundino NFC, Pimenta PFP, Galati EAB, Andrade Júnior HF, Malafronte RS. Padronização de condições para detecção de DNA de *Leishmania* spp. em flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) pela reação em cadeia polimerase. *Cad Saúde Pública*. 2007;23(1):87-94.

18. Orshan L, Elbaz S, Bem-Ari Y, Akad F, Afik O, Ben-Avi I, et al. Distribution and Dispersal of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in a Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis Focus, the Northern Negev, Israel. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(7):1-21. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0004819>].
19. Shimabukuro PHF, Galati EAB. Lista de espécies de Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do Estado de São Paulo, com comentários sobre sua distribuição geográfica. *Biota Neotrop*. 2011;11(Supl.1):685-704.
20. Dias FOP, Lorosa ES, Rebêlo JMM. Fonte alimentar sanguínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). *Cad Saúde Pública*. 2003;19(5):1373-80.
21. Miranda JC, Dias ES. Vetores das leishmanioses nas Américas. *In: Barral A, Costa J. Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas*. 2011. v.1, p. 55-64.
22. Margonari C, Soares RP, Andrade-Filho JD, Xavier DC, Saraiva L, Fonseca AL, et al. Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) and *Leishmania* infection in Gafanoto Park, Divinópolis, Brazil. *J Med Entomol*. 2010;47(6):1212-9.
23. Paiva BR, Oliveira AG, Dorval MEMC, Galati EAB. Species-specific identification of *Leishmania* in naturally infected sandflies captured in Mato Grosso do Sul, State, Brazil. *Acta Trop*. 2010;115(1-2):126-30. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.02.013>].
24. Sanguinette CC. Leishmanioses no município de Várzea da Palma, Minas Gerais, Brasil: estudos dos flebotomíneos e da leishmaniose canina. [dissertação]. Belo Horizonte: Fundação Oswaldo Cruz; 2011.
25. Lana RS, Michalsky EM, Fortes-Dias CL, França-Silva JC, Lara-Silva FO, Lima ACVMR, et al. Phlebotomine sandfly fauna and *Leishmania* infection in the vicinity of the Serra do Cipó National Park, a natural brazilian heritage site. *BioMed Research International*. 2015: 9p.
26. Aguiar GM, Medeiros WM. Distribuição e Hábitats. *In: Rangel EF, Lainson R. Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2003. p. 207-55.
27. Sherlock IA. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1996;91(6):671-84.
28. Saraiva L, Carvalho GM, Gontijo CM, Quaresma PF, Lima AC, Falcão AL, et al. Natural infection of *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia sallesi* (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania infantum chagasi* in Brazil. *J Med Entomol*. 2009;46(5):1159-63.
29. Sanguinette CC, Silva DF, Stumpp RGV, Rego FD, Tonelli GB, Tanure A, et al. Comparison of the phlebotomine (Diptera: Psychodidae) fauna of urban, transitional, and wild areas in northern Minas Gerais, Brazil. *Parasit Vectors*. 2015;8:428. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-015-1003-2>].
30. Forattini OP. Nota sobre criadouros naturais de flebotomos em dependências peri-domiciliares, no estado de São Paulo. *Arq Fac Hig Saúde Pública*. 1953;7:157-65.
31. Galati EAB, Nunes VLB, Rêgo Júnior FA, Oshiro ET, Chang MR. Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev Saúde Pública*. 1997;31(4) 378-90.
32. Kelly DW, Dye C. Pheromones, kairomones and the aggregation dynamics of the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Animal Behavior*. 1997;53(4):721-31.
33. Saraiva L. Estudos da fauna flebotomínica (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), sua infecção natural por *Leishmania* spp. e aspectos biogeográficos da leishmaniose visceral, na região nordeste do município de Belo Horizonte, Minas Gerais – Brazil. [dissertação]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2008.
34. Kolaczinski JH, Reithinger R, Worku DT, Ocheng A, Kasimiro J, Kabatereine N, et al. Risk factors of visceral leishmaniasis in East Africa: a case-control study in Pokot territory of Kenya and Uganda. *Int J Epidemiol Advance*. 2008; 32(2)-34452. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/ije/dym275>].



## Aspectos soropidemiológicos da leishmaniose visceral no Departamento Regional de Saúde (DRS) XV região de São José do Rio Preto, estado de São Paulo, Brasil, 2008 - 2012

Seroepidemiological aspects of visceral leishmaniasis in the Regional Department of Health (DRS) XV region of São José do Rio Preto, state of São Paulo, Brazil, 2008 – 2012

RIALA6/1721

Bertollo DMB. **Aspectos soropidemiológicos da leishmaniose visceral no Departamento Regional de Saúde (DRS) XV região de São José do Rio Preto, estado de São Paulo, Brasil, 2008 - 2012.** São Paulo, SP. 2016. [Dissertação de Mestrado - Área de concentração: Pesquisa Laboratorial de Saúde Pública, Programa de Pós Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo]. Orientador: José Eduardo Tolezano.

O objetivo foi descrever as características soropidemiológicas da leishmaniose visceral (LV) no DRS XV, região de São José do Rio Preto, São Paulo, 2008 e 2012. Foram analisados dados secundários dos casos humanos, presença de vetores e resultados dos inquéritos sorológicos caninos. Foram notificados 251 casos suspeitos de LV humana (LVH), dos quais, 99 (39,4 %) confirmados, sendo 68 (68,7 %) autóctones da região do DRS XV. Houve predomínio pelo sexo masculino, a faixa etária mais acometida foi para menores de 10 anos e maiores de 51 anos de idade. A taxa de letalidade foi de 16,2 %, superior à média para o estado, estimada em 8,3 %. A relação entre número de casos confirmados e óbitos, disponíveis no SINAN/NET nos níveis municipal, estadual e nacional divergem quanto aos números de casos, foram 61 no SINAN nacional com 10 óbitos, enquanto que pelo SINAN estadual 68 com 11 óbitos. Em relação à LV canina (LVC) foram coletadas 45.343 amostras de sangue de cães. Foram utilizados quatro diferentes algoritmos, 12.871 (28,4 %) examinadas apenas pela RIFI; 632 (1,4 %), pelo ELISA e RIFI, ambos os grupos a partir de eluato de sangue coletado em papel de filtro; 22.387 (49,4 %) por ELISA e RIFI e 9.453 (20,8 %) pelo TR-DPP e ELISA, estes dois grupos examinados com soro sanguíneo. Dos 25 municípios incluídos no estudo, 12 realizaram inquérito amostral, oito (8) inquérito censitário, dois (2) com, pelo menos, um inquérito amostral e outro censitário e em cinco (5) municípios não houve registro de realização de qualquer tipo de inquérito. As maiores taxas de positividade nos inquéritos censitários foram observadas em Urânia 25,4 %, Votuporanga 20,1 % e Palmeira D'Oeste 19,0 %. A maioria dos municípios não realizou os inquéritos censitários e/ou amostrais, como preconizado pelo Programa Vigilância e Controle da LV (PVCLV). A principal via de acesso a região rodovia Euclides da Cunha percorre o território de 14 municípios que apresentaram transmissão ou presença de vetor. A interligação entre as ferrovias Ferrobán e Ferronorte aponta possível rota de disseminação vinda de Mato Grosso do Sul. Com base nos resultados obtidos é possível concluir que a LV está em crescente expansão geográfica na região. Altas prevalências de LVH e LVC na região do DRS XV. A maioria dos municípios não atende ao programa de PVCLV. O contínuo processo migratório, a rodovia Euclides da Cunha e a ferrovia Ferronorte se apresentam como possíveis rotas de expansão da LV.

**Palavras-chave.** leishmaniose visceral, inquéritos epidemiológicos, epidemiologia, diagnóstico sorológico, letalidade.

Dissertação disponível em: <http://pesquisa.bvsalud.org/ses/resource/pt/ses-34219>

E-mail: denise-bertollo@hotmail.com; dmbbertollo@ial.sp.gov.br





## Avaliação das condições higienicossanitárias em restaurantes comerciais de Vitória, ES

### Evaluation of hygienic and sanitary conditions in the commercial restaurants in Vitória, ES

RIALA6/1722

Grazielli Ramos de LYRA, Maria Clara de Moraes MOTTA, Jackline Freitas Brilhante de SÃO JOSÉ\*

\*Endereço para correspondência: Departamento de Educação Integrada em Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo. Av. Marechal Campos, 1468, Maruípe, Vitória, ES, Brasil. CEP: 29040-090. Tel: 27 3335 7017. E-mail: jackline.jose@ufes.br

Recebido: 20.11.2016 - Aceito para publicação: 19.07.2017

#### RESUMO

O controle das condições higienicossanitárias em restaurantes é tarefa árdua, pois a contaminação pode ocorrer em diferentes etapas do preparo dos alimentos. Objetivou-se avaliar as Boas Práticas de Manipulação e a contaminação microbiológica de ambientes e de superfícies de preparo em restaurantes comerciais de Vitória, ES. A pesquisa foi realizada de fevereiro a maio de 2015, e na primeira etapa foi feita a avaliação de Boas Práticas por meio de lista de verificação baseada na Resolução RDC 216/2004. Na segunda etapa foram coletadas amostras do ar e de superfícies de preparo e de utensílios. O percentual de adequação aos itens avaliados nos restaurantes (n=8) variou de 39,59 % a 83,61 %. Três restaurantes apresentaram de 76 a 100 % e quatro de 51 a 75 % de atendimento aos itens. As contagens médias de mesófilos aeróbios e fungos filamentosos e leveduras no ar estavam acima de 30 UFC/cm<sup>2</sup>/semana. Foram observadas contagens elevadas em superfícies de bancadas e utensílios, e em todos os restaurantes havia alguma superfície de preparo com contagem superior ao limite máximo estipulado pela *American Public Health Association*. Medidas de controle devem ser implementadas nos restaurantes para contribuir no fornecimento de refeições seguras aos consumidores.

**Palavras-chave.** boas práticas, segurança de alimentos, legislação sanitária, lista de verificação.

#### ABSTRACT

Controlling the hygienic and sanitary conditions in restaurants is an arduous task because at every steps of food production the contamination may occur. This study aimed at evaluating the Good Handling Practices (GHP) and the microbiological contamination of environment and of the food preparation surfaces in commercial restaurants in Vitória, ES. This study was carried out from February to May 2015, and firstly the GHP was evaluated using a check list based on the Resolution RDC 216/2004. Secondly, the microbiological samples from air, handling surfaces and utensils were collected. The percentage of adequacy to the check list for restaurants (n=8) ranged from 39.59 % to 83.61 %. Three restaurants presented from 76 to 100 % and four from 51 to 75 % as for in the attendance. Aerobic mesophilic bacteria and mold and yeast counting in the air were >30 CFU/cm<sup>2</sup>/week. High counts were found in the countertops surfaces and utensils. In all of analyzed restaurants there were some food preparation surfaces, from which were detected higher microorganisms counts than that maximum limit stipulated by *American Public Health Association*. Control measures should be implemented in restaurants for reducing the risk of food contamination.

**Keywords.** good practices, food safety, health legislation, check list.

## INTRODUÇÃO

Serviços de alimentação são estabelecimentos que realizam atividades de preparo de alimentos que ocorrem fora do domicílio, podendo, porém, ser consumida em qualquer lugar<sup>1,2</sup>. Os restaurantes comerciais proporcionam ao consumidor algumas vantagens, como grande variedade de opções, rapidez de atendimento e preços acessíveis de forma geral. Porém, alguns pontos são dados como importantes, por exemplo, exposição em temperaturas adequadas, segurança dos alimentos e aplicação das Boas Práticas<sup>1</sup>.

Os consumidores se tornaram conscientes de seus direitos e também da segurança dos alimentos que consomem. Assim, atividades como a produção, preparação, distribuição, armazenamento e comercialização de alimentos, exigem cuidados especiais com o ambiente de trabalho, com equipamentos e utensílios, com os alimentos propriamente ditos, com os manipuladores de alimentos, com as instalações sanitárias e com o controle de pragas<sup>2,3</sup>.

Doenças de origem alimentar são causadas principalmente pela ingestão de micro-organismos viáveis (infecção) ou toxinas que estes produzem (intoxicação) em quantidades suficientes para desenvolver a patologia<sup>3,4</sup>. Para garantir alimentos mais seguros, têm sido usadas ferramentas como as Boas Práticas e a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC)<sup>4</sup>. Neste contexto, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou em 2004, a Resolução RDC 216<sup>5</sup>, que visa estabelecer procedimentos de Boas Práticas para serviços de alimentação a fim de garantir as condições higienicossanitárias do alimento preparado.

A avaliação das condições microbiológicas de setores de preparo de alimentos é fundamental para a produção de refeições com qualidade. A higienização deficiente de equipamentos e utensílios tem sido responsável, isoladamente ou associada a outros fatores, por surtos de doenças de origem alimentar ou por alterações de alimentos processados<sup>6</sup>. Outro fator importante é a contaminação microbiológica do ar, caracterizada por aerossóis que podem conter células vegetativas de bactérias<sup>4,7</sup>. Diante do exposto, com este trabalho objetivou-se avaliar as Boas Práticas de

Manipulação e a qualidade microbiológica de ambientes e superfícies de preparo em restaurantes comerciais de Vitória, ES, no ano de 2015.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um estudo transversal, no período de fevereiro a maio de 2015, em oito restaurantes comerciais localizados em Vitória, ES. Os restaurantes foram contatados por meio de carta convite, para apresentação dos objetivos da pesquisa e, em seguida, sendo solicitada a permissão para visita. Todos os responsáveis pelos estabelecimentos participantes assinaram um termo de autorização para a realização da pesquisa.

Para definição da amostra, considerou-se o número total de restaurantes (n=38) cadastrados no Sindicato de Bares e Restaurantes do Espírito Santo (SINDIBARES) e localizados em dois bairros de grande circulação de pessoas. Dentre os 38 restaurantes contatados, apenas 8 concordaram em participar da pesquisa, sendo que apenas três destes autorizaram a coleta para análise microbiológica. Os motivos apontados pelos responsáveis para recusa da participação da pesquisa foram a falta de interesse, recusa na autorização para entrada no setor de manipulação dos alimentos e/ou falta de tempo para receber os pesquisadores.

A coleta dos dados ocorreu por meio de observação direta durante as visitas realizadas por pesquisador treinado. Para a avaliação, foi utilizada uma lista de verificação baseada na Resolução RDC 216/2004<sup>5</sup> com 91 itens. Cada item possuiu três possibilidades de resposta: 'Conforme', 'Não Conforme' e 'Não se aplica'. Para classificação de cada restaurante, foram utilizados os critérios de pontuação estabelecidos no item D da RDC 275/2002<sup>8</sup>: Grupo 1 (76 a 100 % de atendimento dos itens), Grupo 2 (51 a 75 % de atendimento dos itens) e Grupo 3 (0 a 50 % de atendimento dos itens). Esta classificação também foi adotada para cada um dos doze blocos da lista de verificação. Para cada restaurante, foram obtidos os valores de adequação geral e os valores de cada bloco avaliado na lista.

Para a coleta de amostras de ar, foram fixadas as seguintes áreas: setor de pré-preparo de vegetais e setor de pré-preparo de carnes. As amostras de ar

foram coletadas antes do início das atividades por meio da técnica de sedimentação simples por 15 minutos, em placas de Petri contendo os meios de cultivo ágar padrão para contagem, ágar batata dextrose e ágar Maconkey, conforme metodologia proposta por Evancho et al<sup>9</sup>. Os resultados das contagens foram expressos em Unidades Formadoras de Colônia/cm<sup>2</sup>/semana (UFC/cm<sup>2</sup>/semana), calculados conforme a fórmula a seguir:

$$\text{Partículas viáveis por cm}^2/\text{semana} = (\text{UFC} \cdot 10080^*) / [(\pi \cdot r^2) \cdot t] \text{ Eq. 1}$$

Onde:

**r** = raio da placa de Petri, em cm;

**π** = 3,141516;

**t** = tempo de exposição das placas de Petri;

**e\*** = minutos por uma semana.<sup>4</sup>

Quanto à análise das condições microbiológicas das superfícies de preparo (bancada e utensílios), foi utilizada a técnica de *swab* adaptada a *American Public Health Association* (APHA)<sup>9</sup>. Em cada superfície de bancada foram feitas coletas em três áreas de 50 cm<sup>2</sup>, após o procedimento de higienização usado na rotina de produção do estabelecimento. Para superfície de tábua de corte e vasilhames foi realizada uma coleta de uma área de 25 cm<sup>2</sup>. Para as superfícies de utensílios (faca), foi realizada a coleta sobre toda área que entra em contato com o alimento.

As análises microbiológicas compreenderam contagem de micro-organismos mesófilos aeróbios em ágar padrão para contagem (Acumedia<sup>®</sup>), após a incubação por 24 a 48 h a 37 °C; contagem de fungos filamentosos e leveduras realizada em ágar batata dextrose (Acumedia<sup>®</sup>) com incubação a 25 °C por 5 a 7 dias e contagem de bactérias entéricas Gram negativas realizada em ágar Maconkey (Acumedia<sup>®</sup>) sendo as placas incubadas a 37 °C por 48 h. As amostras foram coletadas em duplicata para cada grupo microbiano.

Os dados obtidos na avaliação das condições higiênicossanitárias por meio da lista de verificação foram armazenados em planilhas do Microsoft Excel e analisados de forma descritiva. Para a análise dos resultados obtidos da avaliação da microbiota contaminante do ar e em superfícies de preparo dos restaurantes foram consideradas as recomendações da APHA<sup>9</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Caracterização e adequação dos restaurantes comerciais

Dos oito restaurantes pesquisados, em 75 % (n=6) o atendimento era do tipo *self-service* e os demais (n=2) à *La carte*. Todos os estabelecimentos avaliados eram de pequeno porte, e serviam de 120 a 400 refeições/dia.

O percentual de adequação aos itens avaliados nos restaurantes variou de 39,59 % a 83,61 %. Do total de restaurantes avaliados (n=8), três apresentaram classificação no Grupo 1, quatro no Grupo 2 e um no Grupo 3. Uma vez que as Boas Práticas estão diretamente relacionadas com a garantia da qualidade final da preparação, é importante que os restaurantes atendam a legislação vigente no intuito de oferecer alimentos seguros nos aspectos químicos, físicos e biológicos.

Os valores mínimos e máximos dos percentuais de adequação de cada bloco nos restaurantes comerciais estão apresentados na **Tabela 1**. Em relação ao item de 'edificações, instalações, móveis e utensílios', 50 % (n=4) dos restaurantes apresentavam-se no Grupo 1, 37,5 % (n=3) no Grupo 2 e 12,5 % (n=1) no Grupo 3. Dentre as não conformidades encontradas, destacam-se condições precárias de paredes, tetos, materiais de difícil limpeza, pisos em estado de conservação ruim, e portas de fechamento não automático.

Quanto ao item de 'higienização de instalações, equipamentos, móveis e utensílios', dentre as não conformidades observadas destacam-se as más condições de conservação e higiene de equipamentos, uso de produtos odorizantes e produtos sem registro no Ministério da Saúde e não uso de uniforme adequado por manipulador responsável pela higienização.

Dentre as não conformidades observadas no bloco 'Controle de vetores e pragas' destacam-se ausência de ações eficazes no controle de pragas e vetores sendo que durante a visita em alguns estabelecimentos foi observada a presença de moscas.

Em relação ao 'Abastecimento de água', todos os restaurantes realizavam regularmente a higienização do reservatório de água. Resultado diferente do observado por Silva e Oliveira<sup>10</sup> ao avaliarem as

**Tabela 1.** Percentual de adequação, por bloco, de restaurantes comerciais de Vitória, ES, 2015

Blocos avaliados	Percentual de Adequação (%)							
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
Edificações, instalações, móveis e utensílios	76,47	17,64	70,58	100,00	64,00	88,23	94,11	70,58
Higienização de instalações	55,55	33,33	66,66	100,00	77,77	66,66	66,66	88,88
Controle vetores e pragas	100,00	33,33	100,00	66,66	100,00	66,00	100,00	100,00
Abastecimento de água	75,00	50,00	100,00	75,00	75,00	75,00	100,00	75,00
Manejo de resíduos	100,00	100,00	66,66	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Manipuladores	66,66	66,66	44,44	66,66	88,88	88,88	77,77	77,77
Matéria-prima, ingredientes e embalagens	83,33	100,00	33,33	100,00	83,33	83,33	66,66	66,66
Preparação do alimento	75,00	35,00	90,00	75,00	55,00	55,00	85,00	70,00
Armazenamento	0,00	0,00	66,66	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Exposição ao consumo	28,57	57,14	100,00	57,00	42,50	42,85	100,00	71,42
Documentação e registro	100,00	0,00	100,00	100,00	87,50	87,50	87,50	100,00
Responsabilidade	100,00	50,00	50,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

Boas Práticas em restaurantes de Porto Alegre, onde 30 % não souberam informar a periodicidade da higienização e 10 % não apresentavam reservatório.

No bloco de 'Manejo de resíduos', foi observado alto percentual de adequação nos restaurantes, porém algumas inconformidades foram verificadas como a ausência de lixeiras com acionamento não manual. O lixo é uma fonte de contaminação a ser controlada devido ao fato de que restos de alimentos podem favorecer o aparecimento de vetores e pragas. De acordo com a RDC 216/2004, os resíduos devem ser frequentemente coletados e estocados em local fechado e isolado da área de preparação dos alimentos<sup>6</sup>.

Quanto ao item 'Manipuladores' foram registradas não conformidades como ausência de cartazes para instruir quanto à correta lavagem e antisepsia das mãos, manipuladores que conversavam durante o preparo dos alimentos e não havia capacitação periódica quanto a higiene pessoal e manipulação de alimentos.

As principais não conformidades registradas no bloco 'Materias-primas, ingredientes e embalagens' foram a conexão do setor de recebimento de matéria-prima com o salão de distribuição; matéria-prima, ingredientes e embalagens sem identificação e

quando presentes nas prateleiras não respeitavam o espaço mínimo que é exigido e o material da prateleira era de madeira. Estas não conformidades estavam presentes em 54,54 % (n=6) dos restaurantes.

Dentre as não conformidades registradas no bloco de 'Preparação do alimento', citam a utilização de óleos que apresentavam alterações evidentes das características físico-químicas ou sensoriais, a não realização o controle do tratamento térmico, sobras de alimentos sem identificação adequada e o descongelamento inadequado.

As não conformidades observadas no bloco 'Armazenamento', foram relacionadas principalmente a falta de identificação do produto armazenado e armazenamento em temperatura inadequada.

Em relação à 'exposição ao consumo', apenas dois restaurantes de caráter *self-service* apresentaram conformidade total por aplicarem esta modalidade. A ausência de controle de temperatura das preparações expostas ao consumo foi uma das não conformidades observadas.

Quanto ao bloco de 'responsabilidade' foram observadas a ausência de registro e de comprovação de realização de curso de capacitação sobre manipulação de alimentos pelos responsáveis dos restaurantes.

## Avaliação da contaminação ambiental nos restaurantes

Pode-se observar que as contagens médias para mesófilos aeróbios em todos os ambientes estavam acima de 30 UFC/cm<sup>2</sup>/semana, ou seja, acima da recomendação indicada pela APHA<sup>9</sup> para ambientes nos quais é exigida qualidade microbiológica do ar para execução de atividades. As contagens de mesófilos aeróbios no ar do setor de preparo de vegetais dos restaurantes foram superiores aos resultados obtidos por Ribeiro et al<sup>11</sup>, que em avaliação da qualidade do ar de restaurante, encontraram valores médios de 89 UFC/cm<sup>2</sup>/semana, na área de preparo de salada. Andrade et al<sup>12</sup> recomendaram valores de até 100 UFC/cm<sup>2</sup>/semana em ambientes de produção e manipulação de alimentos e, apesar desta recomendação, todos os restaurantes avaliados apresentaram contaminação superior.

Para fungos filamentosos e leveduras, o R3 apresentou maior contaminação (4,1 x 10<sup>2</sup> UFC/cm<sup>2</sup>/semana) em relação aos outros restaurantes avaliados. Os processos de filtragem de ar e aplicação de sanitizantes são medidas de controle da qualidade do ar<sup>4</sup>. Não foi detectada, com a técnica utilizada, a presença de enterobactérias no ar ambiente dos restaurantes avaliados.

Com relação às superfícies de preparo, foram

observadas contagens elevadas em superfícies de bancadas e utensílios (**Tabela 2**). Ao comparar com recomendações da APHA, que preconiza contagens de até 2 UFC/cm<sup>2</sup> para superfícies de bancadas e 100 UFC/utensílios ou área amostrada de equipamentos<sup>10</sup>, constatou-se que em todos os restaurantes haviam superfícies de preparo que apresentaram contagens superiores ao limite máximo estipulado.

No R3, as bancadas do setor de pré-preparo de carnes e de hortaliças eram feitas de mármore e a tábua de manipulação era de polietileno de alta densidade, em péssimo estado de conservação. No caso das tábuas, nos demais restaurantes, esses utensílios eram do mesmo material. Em relação às facas, todas apresentavam superfície cortante de aço inoxidável. Em relação ao vasilhame utilizado para a condicionar os alimentos, no R1 e R2 eram de polietileno de alta densidade, e no R3 o vasilhame era de polipropileno. Kochanski et al<sup>13</sup> observaram menores contagens para estes mesmos tipos de utensílios e justificaram a baixa contagem ao fato destas serem mais facilmente higienizadas. Utensílios e equipamentos devem apresentar superfície lisa e de material que dificulte a contaminação dos alimentos. O desgaste destes utensílios e equipamentos pode contribuir para a permanência de micro-organismos na superfície

**Tabela 2.** Contagem de mesófilos aeróbios, fungos filamentosos e leveduras e enterobactérias em superfícies de bancadas (UFC/cm<sup>2</sup>) e utensílios (UFC) em restaurantes comerciais de Vitória, ES, 2015

Superfície	Mesófilos aeróbios			Fungos filamentosos e leveduras			Enterobactérias		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Bancada do setor de preparo de vegetais	5 x 10 <sup>3</sup>	2,4 x 10 <sup>2</sup>	5 x 10 <sup>3</sup>	5 x 10 <sup>3</sup>	2,4 x 10 <sup>2</sup>	5 x 10 <sup>4</sup>	5 x 10 <sup>3</sup>	1,4 x 10 <sup>3</sup>	1,2 x 10 <sup>6</sup>
Bancada do setor de pré-preparo de carnes	7,5 x 10 <sup>3</sup>	-*	4,6 x 10 <sup>4</sup>	3,6 x 10 <sup>4</sup>	-*	4,6 x 10 <sup>4</sup>	3,6 x 10 <sup>4</sup>	-*	7,2 x 10 <sup>4</sup>
Vasilhame	5,6 x 10 <sup>2</sup>	1,6 x 10 <sup>2</sup>	2,2 x 10 <sup>5</sup>	**ND	1,6 x 10 <sup>2</sup>	2,2 x 10 <sup>5</sup>	**ND	5 x 10 <sup>4</sup>	2,2 x 10 <sup>5</sup>
Faca de manipulação	5,1 x 10 <sup>3</sup>	6,4 x 10 <sup>5</sup>	3,1 x 10 <sup>4</sup>	**ND	6,4 x 10 <sup>3</sup>	ND	4 x 10 <sup>3</sup>	4 x 10 <sup>2</sup>	5,2 x 10 <sup>3</sup>
Tábua de corte	6,9 x 10 <sup>3</sup>	1,1 x 10 <sup>3</sup>	9,1 x 10 <sup>4</sup>	4 x 10 <sup>3</sup>	1,1 x 10 <sup>3</sup>	9,1 x 10 <sup>4</sup>	**ND	1,2 x 10 <sup>4</sup>	1,4 x 10 <sup>5</sup>

\*Restaurante possuía apenas um setor para realização de pré-preparo de vegetais e de carnes. \*\*ND = não detectado

e favorecer a multiplicação da população microbiana. Os utensílios e equipamentos, além de serem de material impermeável, devem apresentar também manutenção adequada e bom estado de conservação<sup>6</sup>. A escolha de superfícies com as características mais adequadas é crucial para controlar o processo de adesão e a formação de biofilme. O controle efetivo de procedimentos de limpeza e sanitização podem, possivelmente, evitar ou minimizar a deterioração dos alimentos e surtos de doenças ocasionados por patógenos veiculados por alimentos. Todas as superfícies de contato com alimentos podem reter resíduos de matéria orgânica e deste modo facilitar a sobrevivência de micro-organismos patogênicos de origem alimentar. Deste modo, cabe ao responsável técnico adotar a escolha adequada dos materiais que serão empregados na rotina de trabalho ao montar o ambiente de preparo dos alimentos, com bancadas, equipamentos e utensílios.

As contagens de mesófilos aeróbios no setor de pré-preparo de vegetais variaram  $2,4 \times 10^2$  a  $5 \times 10^4$  UFC/cm<sup>2</sup>. Esse resultado é alarmante, pois os alimentos preparados no setor podem entrar em contato com a superfície com elevada contaminação e, se não passarem em seguida por um processo de eliminação de micro-organismos, podem ter sua qualidade prejudicada e culminar em risco aos comensais. A exposição a patógenos em superfícies pode ocorrer por contato direto com materiais contaminados ou indiretamente através da microbiota no ar<sup>14</sup>.

As contagens obtidas nas facas e tábuas de corte foram altas. Kochanski et al<sup>13</sup> observaram menores contagens para estes mesmos tipos de utensílios e justificaram a baixa contagem ao fato destas serem mais facilmente higienizadas. Assim como Andrade et al<sup>12</sup>, os pesquisadores observaram que 18,6 % dos equipamentos e utensílios utilizados no preparo de alimentos apresentaram contagem de aeróbios mesófilos de até 2 UFC/cm<sup>2</sup> de superfície.

A presença de enterobactérias nas superfícies analisadas é preocupante, pois indica que os procedimentos de manipulação dos alimentos não estão sendo realizados de forma adequada. Membros da família *Enterobacteriaceae* são encontrados no trato gastrintestinal de animais,

mas muitos vivem livremente no solo, na água e no ambiente. Estes micro-organismos estão envolvidos em processos de deterioração de alimentos e são utilizados como indicadores de qualidade higienicossanitárias, sendo alguns, patogênicos<sup>4</sup>.

Apesar de não atender a recomendação proposta em relação as contagens em superfícies de bancadas e utensílios, o resultado observado foi melhor do que obtido em estudo realizado por Coelho et al<sup>1</sup>, no qual a contagem de mesófilos em utensílios atingiu valor na ordem de  $10^8$  e em equipamentos, contagem de  $10^7$ .

Ressalta-se que há necessidade de regulamentação no Brasil quanto aos padrões microbiológicos para ar e superfícies de preparo com intuito de contribuir para segurança dos alimentos oferecidos aos consumidores.

A contaminação microbiológica registrada nos ambientes de produção possivelmente está relacionada ao não atendimento à legislação de Boas Práticas em algum dos itens analisados. Por exemplo, itens avaliados na lista de verificação relacionados a higienização de superfícies, como condições de higiene e conservação de utensílios/equipamentos, estavam inadequados nos restaurantes comerciais avaliados e apresentaram altas contagens bacterianas. Após a realização desta pesquisa foi elaborado e distribuído material sobre Boas Práticas para instruir os responsáveis pelos estabelecimentos quanto aos pontos que necessitam de melhorias.

## CONCLUSÃO

Considerando que os restaurantes comerciais exigem controle higiênicossanitário no processo de manipulação de alimentos, do ambiente e de utensílios em geral, os restaurantes avaliados não alcançaram um nível satisfatório para os parâmetros avaliados. Há necessidade de maior fiscalização dos órgãos competentes, principalmente pelo fato de que foram registradas várias falhas principalmente nos blocos de armazenamento dos alimentos, documentação e responsabilidade. Cabe ainda a conscientização dos responsáveis pelos estabelecimentos para a aplicação das Boas Práticas e medidas de controle para permitir a oferta de refeições seguras aos clientes.

## REFERÊNCIAS

1. Coelho AI, Milagres RC, Martins JF, Azeredo RM, Santana AM. Contaminação microbiológica de ambientes e de superfícies em restaurantes comerciais. *Cien Saude Colet*. 2010; 15(1): 1597-606. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-81232010000700071>].
2. São José JF. Contaminação microbiológica em serviços de alimentação. *Nutrire Rev Soc Bras Aliment Nutr*. 2012;37(1):78-92. [DOI: <http://dx.doi.org/10.4322/nutrire.2012.007>].
3. Afifi HS, Abushelaibi AA. Assessment of personal hygiene knowledge, and practices in Al Ain, United Arab Emirates. *Food Control*. 2012;25(1):249-53. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.10.040>].
4. Andrade NJ. Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos. São Paulo: Varela; 2008.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004. Dispõe sobre o 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.25-8.
6. Doménech-Sánchez A, Laso E, Pérez MJ, Berrocal CI. Microbiological levels of randomly selected food contact surfaces in hotels located in Spain during 2007-2009. *Foodborne Pathog Dis*. 2011;8(9):1025-9. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2011.0856>].
7. Byrne B, Lyng J, Dunne G, Bolton DJ. An assessment of the microbial quality of the air within a pork processing plant. *Food Control*. 2008;19(9):915-20. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.08.016>].
8. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 275, de 21 de outubro de 2002. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. *Diário Oficial [da] União*. Brasília, DF, 23, out. 2002. Seção 1, nº 206. p.126-30.
9. American Public Health Association - APHA. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 3<sup>rd</sup> ed. Washington: APHA; 2001.
10. Silva CB, Oliveira AB. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária em restaurantes indicados por guia de estabelecimentos da cidade de Porto Alegre. *Nutrire Rev Soc Bras Aliment Nutr*. 2009;34(3):109-23.
11. Ribeiro LL, Carvalho EL, Pilon L. Análise de perigos e pontos críticos de controle no preparo de pratos à base de creme de maionese caseiro em restaurante, *self-service*. *Hig Aliment*. 2000;14(68-69):93-100.
12. Andrade NJ, Silva RM, Brabes KC. Avaliação das condições microbiológicas em unidades de alimentação e nutrição. *Ciênc agrotec*. 2003;27(3):590-6. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542003000300014>].
13. Kochanski S, Pierozan MK, Mossi AJ, Treichel H, Cansian RL, Ghisleni CP et al. Avaliação das condições microbiológicas de unidade de alimentação e nutrição. *Alim Nutr [Internet]*. 2009;20(4):663-8. Disponível em: [<http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/viewFile/1264/873>].
14. Di Ciccio P, Vergara A, Festino AR, Paludi D, Zanardi E, Ghidini S et al. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: relationship with temperature and cell surface hydrophobicity. *Food Control*. 2015;50(1):930-6. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.10.048>].



# Adaptação do Ecomapa proposto no Modelo Calgary para avaliação socioambiental de parasitoses intestinais em crianças de creches filantrópicas

## Adapting the Ecomap proposed in the Calgary Model for the socio-environmental evaluation of intestinal parasites in children at philanthropic day care centers

RIALA6/1723

Guilherme Sgobbi ZAGUI, Brisa Maria FREGONESI, Thaís Vilela SILVA, Carolina Sampaio MACHADO, Gabriel Pinheiro MACHADO, Fabiana Cristina JULIÃO, Karina Aparecida de Abreu TONANI, Susana Inés SEGURA-MUÑOZ\*

\*Endereço para correspondência: Laboratório de Ecotoxicologia e Parasitologia Ambiental, Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Avenida Bandeirantes, 3900, Monte Alegre, Ribeirão Preto, SP, Brasil, CEP: 14040-902. Tel: 16 3315 0530. E-mail: susis@eerp.usp.br

Recebido: 05.05.2017 - Aceito para publicação: 07.08.2017

### RESUMO

Os objetivos do estudo foram avaliar a frequência de enteroparasitos em crianças de creches filantrópicas e adaptar um diagrama de Ecomapa para avaliar as condições socioambientais envolvidas. Um total de 151 amostras de fezes, coletadas de 66 crianças de dois a seis anos de idade foram analisadas por meio de técnicas de Hoffman, Pons e Janer (HPJ), e de Faust e colaboradores. Um questionário estruturado foi aplicado aos responsáveis pelas crianças, e um Ecomapa foi adaptado para avaliar as interações entre as crianças parasitadas e os condicionantes socioambientais. Enteroparasitos patogênicos (*Ascaris lumbricoides*, *Balantidium coli*, *Giardia lamblia* e *Strongyloides stercoralis*) e não patogênicos (*Chilomastix mesnili*, *Endolimax nana*, *Entamoeba coli* e *Iodamoeba butschilii*) foram identificados, acometendo 37,9 % das crianças. Com o Ecomapa observaram-se fortes correlações dos parâmetros avaliados (renda familiar, higiene alimentar e pessoal, escolaridade dos responsáveis, contato com animais domésticos e interpessoal) com as crianças parasitadas. O parasito *Giardia lamblia* foi o de maior frequência e a adaptação do Ecomapa permitiu efetuar a avaliação dos principais condicionantes envolvidos. Diante do exposto é necessário implementar o programa de educação em saúde no ambiente escolar que estimulem os hábitos de higiene alimentar e pessoal, como atividades de prevenção e controle de parasitos.

**Palavras-chave.** doenças parasitárias, criança, creches, modelos epidemiológicos, indicadores.

### ABSTRACT

This study evaluated the enteroparasites frequency in children at philanthropic daycare centers, and the adaptation of an Ecomap diagram to evaluate the socio-environmental conditions. The 151 faeces samples collected from 66 children aged two to six years old were analyzed, by using the techniques of Hoffman, Pons and Janer (HPJ) and Faust et col. A structured questionnaire was applied to those responsible for children, and an Ecomap was adapted for evaluating the interactions between parasitized children and socio-environmental conditions. Pathogenic enteroparasites (*Ascaris lumbricoides*, *Balantidium coli*, *Giardia lamblia* e *Strongyloides stercoralis*) and non-pathogenic ones (*Chilomastix mesnili*, *Endolimax nana*, *Entamoeba coli* e *Iodamoeba butschilii*) were identified, and affecting 37.9 % of children. The Ecomap indicated the strong relationships of the evaluated parameters (family income, personal and food hygiene, schooling of the responsible, contact with domestic animals and interpersonal) with the parasitized children. *Giardia lamblia* was the parasite showing the highest frequency, and the adaptation of the Ecomap allowed to evaluate the main conditioning factors involved. In view of these findings, it is needed to implement the health education program in the school environment for stimulating the food and personal hygiene habits, as the activities for parasites prevention and control.

**Keywords.** parasitic diseases, children, daycare center, epidemiologic models, indicators.



## INTRODUÇÃO

As enteroparasitoses representam um problema mundial de saúde pública especialmente em regiões aonde o grande adensamento populacional não vem sendo acompanhado de melhorias nas condições de vida<sup>1</sup>. Essas infecções merecem atenção especial principalmente em países em desenvolvimento, posto que estão intimamente associadas às condições precárias de saneamento<sup>2</sup>.

No Brasil, os enteroparasitos possuem ampla distribuição geográfica<sup>1,2,3</sup>. A infecção e o desenvolvimento das doenças parasitárias são comuns em crianças de todas as idades. Crianças que frequentam creches estão mais suscetíveis às infecções pelo protozoário *Giardia lamblia* e outros enteroparasitos que são transmitidos principalmente por água e alimentos contaminados com fezes e por contato interpessoal, causadores de diarreia, vômitos, náuseas e má absorção de nutrientes, podendo levar a complicações como déficits físicos e mentais<sup>4</sup>.

Evidências científicas mostram que fatores, tais como baixo nível de escolaridade dos responsáveis, condição socioeconômica das famílias e falta de instrução relacionada à higiene pessoal e alimentar, podem facilitar a transmissão de parasitos, elevando consequentemente a incidência em crianças<sup>5</sup>. Ainda, o alto número de crianças atendidas em creches, a falta de capacitação dos manipuladores de alimentos e precariedade em educação e promoção de saúde são condicionantes que favorecem as infecções por enteroparasitos na faixa etária de zero a seis anos de idade<sup>6</sup>.

Devido a maior inserção da mulher no mercado de trabalho nos últimos anos, as creches tornaram-se um dos primeiros ambientes externos ao residencial que as crianças frequentam. No Brasil, as creches podem ser de ordem pública, privadas ou conveniadas com Secretarias de Educação (filantrópicas e comunitárias). Dentre as instituições municipais conveniadas, as creches filantrópicas caracterizam-se como instituições educacionais e/ou assistenciais sem fins lucrativos, que atendem a população mais carente da sociedade a fim de compensar a falta da universalização do acesso à educação infantil, preconizados no estatuto pleno da cidadania<sup>7</sup>.

Nas escolas infantis existem diferentes formas de avaliação da saúde das crianças. Na avaliação da incidência de parasitoses na infância não basta fazer os exames coproparasitológicos se os resultados obtidos não são acompanhados das condições socioambientais e as informações repassadas para equipe escolar. O Ecomapa proposto no Modelo Calgary de Avaliação Familiar (MCAF) é um instrumento de avaliação familiar passível de adaptações, utilizado para verificar as relações de uma família índice com o ambiente externo<sup>8</sup>, podendo ser aplicado como ferramenta avaliativa dos condicionantes socioambientais envolvidos em doenças de transmissão hídrica, vetorial, alimentar e por contato interpessoal.

Neste contexto, os objetivos do presente estudo foram avaliar a frequência de enteroparasitos em crianças institucionalizadas em creches filantrópicas e adaptar um diagrama de Ecomapa para o contexto escolar que permita a avaliação qualitativa das interações dos condicionantes socioambientais envolvidos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Local de estudo

O município de Ribeirão Preto está localizado na região nordeste do Estado de São Paulo, e possui, ao total, 41 creches municipais de educação infantil, 141 privadas e 19 conveniadas (filantrópicas/comunitárias) com a Secretaria Municipal da Educação de Ribeirão Preto<sup>9,10</sup>. A amostragem das creches filantrópicas foi por conveniência, bem como por atenderem populações de baixo nível socioeconômico e em situações de vulnerabilidade social. O critério de seleção baseou-se na manifestação de interesse e adesão ao estudo por parte dos responsáveis pelas instituições. Trata-se de uma pesquisa de corte transversal, de abordagem quali-quantitativa, realizada no ano de 2015 em duas creches filantrópicas do município de Ribeirão Preto, SP, Brasil.

### População de estudo, coleta e análises parasitológicas

O estudo incluiu crianças de dois a seis anos de idade atendidas em creches filantrópicas que não

tivessem feito uso de medicamento antiparasitário no período de seis meses anteriores ao estudo. Após autorização para o desenvolvimento da pesquisa, o estudo foi apresentado aos responsáveis legais das crianças que aceitaram ou não a participação, por meio da assinatura no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Os participantes receberam três coletores universais previamente identificados e sem conservantes, juntamente com uma carta contendo orientações para a coleta de fezes, em dias alternados, a fim de evitar resultados falso-negativos. Dessa forma, participaram 66 crianças, sendo 33 do sexo feminino e 33 do sexo masculino. Foram coletadas 151 amostras de fezes, sendo que 32 crianças entregaram três amostras para realização das análises, 21 crianças entregaram duas amostras e 13 crianças entregaram apenas uma amostra.

As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Ecotoxicologia e Parasitologia Ambiental da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, dentro de um período máximo de 24h para realização das análises. Para a identificação parasitária foram utilizadas as técnicas de Hoffman, Pons e Janer (HPJ) e de Faust e cols<sup>11,12</sup>.

### Coleta de dados das condições socioambientais e adaptação de Ecomapa

Para a coleta de dados das condições socioambientais foi aplicado um questionário estruturado como instrumento de avaliação familiar que abordava aspectos relacionados à renda familiar, saneamento, hábitos de higiene pessoal e alimentar, escolaridade dos responsáveis e contato com animais.

A partir dos resultados obtidos no questionário, foi elaborado um diagrama de Ecomapa proposto no MCAF<sup>8</sup> reformulado para o conjunto das crianças participantes considerando como unidade de nucleação as duas creches filantrópicas. Esta adaptação do Ecomapa consolidou as enteroparasitoses frequentes nas crianças e suas interações com as condições socioambientais. A força ou fragilidade das relações (sem comprovação estatística) entre as variáveis incluídas foi representada pela largura dos traços que estabelecem a junção dos

componentes (relação forte, moderada e fraca), de forma qualitativa.

### Aspectos Éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CAAE: número 36301614.0.0000.5393).

## RESULTADOS

Apesar da determinação de parasitoses em crianças ser de fácil execução, a adesão ao estudo pelos responsáveis representou um obstáculo, principalmente quando é solicitado a coleta seriada de amostras, uma vez que, a produção de cistos, ovos ou larvas é intermitente. Solicitaram-se 198 amostras das 66 crianças, no entanto foram recebidas 151 amostras de fezes, representando perda de 23,7 %.

As Tabelas 1 e 2 apresentam, respectivamente, a distribuição do grau de enteroparasitismo segundo o sexo e as espécies identificadas de acordo com a idade das crianças.

Pode-se observar que 37,9 % das crianças (n=25) encontravam-se parasitadas. As crianças do sexo feminino foram as mais acometidas pelos enteroparasitos (56 %) e houve igualdade de biparasitismo em ambos os sexos (Tabela 1). Nos casos de biparasitismo foram identificados concomitantemente: *Balantidium coli* e *Entamoeba coli* (1 ocorrência), *Chilomastix mesnili* e *Giardia lamblia* (1 ocorrência), *Endolimax nana* e *Giardia lamblia* (1 ocorrência), *Entamoeba coli* e *Giardia lamblia* (2 ocorrências) e *Iodamoeba butschilii* e *Entamoeba coli* (1 ocorrência).

**Tabela 1.** Distribuição do grau de enteroparasitismo segundo sexo das crianças (n=66) provenientes de duas creches filantrópicas. Ribeirão Preto, SP, Brasil. 2015

Parasitismo	Feminino	Masculino	Total
Ausência	19 (28,7%)	22 (33,4%)	41 (62,1%)
Monoparasitismo	11(16,6%)	8 (12,1%)	19 (28,7%)
Biparasitismo	3 (4,6%)	3 (4,6%)	6 (9,2%)
<b>Total</b>	<b>33 (50,0%)</b>	<b>33 (50,0%)</b>	<b>66 (100,0%)</b>

**Tabela 2.** Distribuição dos enteroparasitos identificados de acordo com a idade das crianças de duas creches filantrópicas (n=25). Ribeirão Preto, SP, Brasil. 2015

Parasitos	Idade (anos)					Total <sup>a</sup> n(%)
	2	3	4	5	6	
<b>Patogênicos</b>						
<i>Giardia lamblia</i>	2	2	3	5	2	14 (21,2 %)
<i>Ascaris lumbricoides</i>	-	1	1	-	-	2 (3,0 %)
<i>Strongyloides stercoralis</i>	-	1	-	-	-	1 (1,5 %)
<i>Balantidium coli</i>						
<b>Não patogênicos</b>						
<i>Entamoeba coli</i>	-	1	1	4	2	8 (12,1 %)
<i>Iodamoeba butschilii</i>	1	1	-	-	-	2 (3,0 %)
<i>Endolimax nana</i>	-	-	-	1	1	2 (3,0 %)
<i>Chilomastix mesnili</i>	-	-	1	-	-	1 (1,4 %)
<b>Total<sup>b</sup></b>	3	6	7	10	5	

<sup>a</sup>Frequência sobre 66 crianças, considerando os casos de biparasitismo

<sup>b</sup>Total de crianças parasitadas por idade

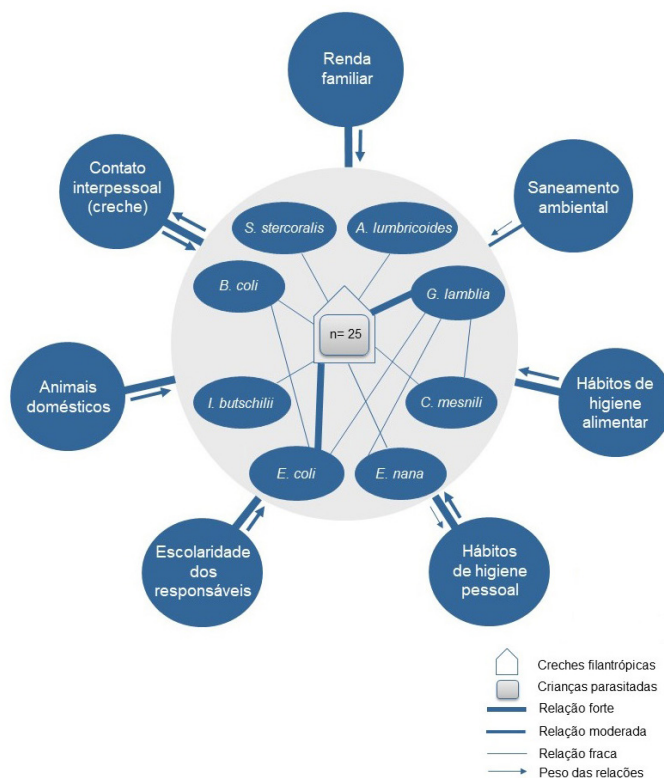
O enteroparasito de maior frequência foi *Giardia lamblia* (21,2 %), seguido de *Entamoeba coli* (12,1 %). As crianças de quatro e cinco anos foram as mais acometidas pelos parasitos. Ainda na população de crianças com idade de cinco anos, o protozoário *Giardia lamblia* foi o agente responsável por 50 % das infecções (Tabela 2).

Por meio do questionário, observou-se que: todas as famílias afirmaram possuir abastecimento de água; 97 % das famílias possuíam em suas casas serviços de esgotamento sanitário; a renda da maioria das famílias das crianças participantes (82,3 %) consistiu em até três salários mínimos (salário mínimo: R\$788,00 no ano de 2015<sup>13</sup>); 76,5 % dos responsáveis não faziam a higienização de hortaliças e frutas com água em combinação com solução de cloro e/ou vinagre; 46,3 % das crianças não costumavam lavar as mãos antes das refeições ou após utilizar o banheiro principalmente no domicílio (47,1 %); 52,9 % das mães possuíam ensino médio incompleto e apenas 11,8 % ensino superior completo; 76 % das crianças mantinham contato com algum animal doméstico (cachorro e/ou gato).

Considerando as respostas obtidas no questionário aplicado foi possível definir quais seriam os parâmetros socioambientais relacionadas às parasitoses e as forças das interações para

adaptação do Ecomapa. Na Figura é apresentado o Ecomapa adaptado utilizando como unidade de nucleação as crianças parasitadas nas duas creches filantrópicas, os parasitos identificados e as relações de biparasitismo encontradas diagramando as forças das interações com as condições socioambientais.

A partir da adaptação do Ecomapa, verificamos que os vínculos estabelecidos entre as condições socioambientais e os parasitos indicaram relações fortes com a renda familiar, hábitos de higiene alimentar e pessoal, escolaridade dos responsáveis, contato com animais domésticos e relações interpessoais nas creches. De acordo com a Figura, relação moderada foi observada com o saneamento ambiental, uma vez que a cobertura dos serviços de saneamento municipal (abastecimento de água e coleta de esgoto) abrangia as creches e as residências das crianças, não significando, portanto, a principal fonte de transmissão das parasitoses.



**Figura.** Diagrama de Ecomapa adaptado para representar os condicionantes socioambientais das infecções parasitárias de crianças institucionalizadas em duas creches filantrópicas do município de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto, SP. 2015

## DISCUSSÃO

Na **Tabela 1** é apresentada a prevalência parasitária encontrada na população em estudo (37,9 %), que reflete alguns fatores que favorecem a disseminação parasitária no ambiente escolar, tais como facilidade de transmissão interpessoal dos enteroparasitos devido a aglomeração, contato muito próximo entre as crianças, hábitos de levar as mãos e objetos a boca e desconhecimento dos princípios básicos de higiene na faixa etária avaliada<sup>4,14</sup>. Sabe-se ainda que a imaturidade do sistema imune em crianças de até cinco anos é um fator determinante para instalação das infecções parasitárias, podendo não apresentar capacidade de cura parasitológica<sup>15</sup>.

As crianças de cinco anos foram as mais acometidas pelos parasitos, especialmente por *Giardia lamblia* (**Tabela 2**). Assim como identificado por outros autores<sup>12,16</sup>, no presente estudo o parasitismo foi crescente até atingir um pico etário (cinco anos), havendo declínio posteriormente. Tal fato pode estar associado ao processo de amadurecimento do sistema imunológico adquirido e conhecimento de hábitos adequados de higiene pessoal e alimentar.

Os casos que envolveram biparasitismo no presente estudo ocorreram entre parasitos patogênicos e não patogênicos (**Figura**). Os agentes etiológicos não patogênicos, *Chilomastix mesnili*, *Endolimax nana*, *Entamoeba coli* e *Iodamoeba butschilii* (**Tabela 2**) são considerados indicadores da presença de outros parasitos no ambiente e das condições sanitárias as quais os indivíduos estão expostos, uma vez que possuem o mesmo mecanismo de transmissão de outros parasitos patogênicos<sup>17</sup>, sendo relevante sua notificação em exames coproparasitológicos.

As taxas de infecção por enteroparasitos patogênicos (27,2 %) (**Tabela 2**) foram preocupantes, uma vez que as infecções crônicas em crianças, ainda que sejam assintomáticas podem levar à complicações severas, incluindo desidratação, desnutrição e retardo físico e cognitivo<sup>4</sup>. No Brasil, a frequência de *Giardia lamblia* na população depende da área de estudo, condições sanitárias e faixa etária, predominando em crianças de até seis anos<sup>18</sup>. Estudos realizados com crianças

que frequentavam creches nas cidades de Itapuranga, GO<sup>6</sup> e Janiópolis, PR<sup>11</sup> apresentaram menores prevalências para giardiase de 11,1 % e 5 %, respectivamente, em comparação ao presente estudo (21,2 %) (**Tabela 2**). Em contrapartida, Santos et al.<sup>16</sup> verificaram alta prevalência de giardiase (51 %) em crianças de creches em Araguari, MG, cidade que não possuía Estação de Tratamento de Esgoto na época do estudo (2012).

No presente estudo, a prevalência de ascaridíase (3 %) (**Tabela 2**) foi relativamente baixa em comparação com o estudo de Vasconcelos et al<sup>12</sup> que identificaram prevalência de 21,9 % em crianças na cidade de Crato, CE. Neste contexto, a higiene inadequada de alimentos é considerada como um fator facilitador da infecção por esse parasito, uma vez que as características morfológicas dos ovos permitem a adesão nos alimentos. Ainda, a morfologia confere ampla resistência aos fatores externos e sobrevivida, facilitando sua disseminação<sup>19</sup>. O parasito *Balantidium coli* é comumente encontrado em suínos e transmitido no local onde os animais são criados. A identificação desse protozoário pode estar relacionada com o contato da criança com matéria fecal de humanos ou animais infectados (suínos) por meio de alimentos ou água contaminada<sup>20</sup>.

As larvas do parasito patogênico *Strongyloides stercoralis* podem estar presentes em solos contaminados e ocorre principalmente em populações que mantém contato íntimo com o solo. Embora sua prevalência mundial não seja conhecida, especialistas estimam que existam entre 30 a 100 milhões de pessoas infectadas em todo mundo<sup>21</sup>. No Brasil, evidências científicas mostram baixas frequências (média de 5,5 % entre 1990 e 2009)<sup>22</sup> concordando com os achados do presente estudo (1,5 %) (**Tabela 2**). A não aplicação de técnicas específicas de termotropismo para o diagnóstico preciso de estrogiloidíase, como as técnicas de Rugai e cols. e Baermann modificado por Moraes, pode contribuir para subestimação da prevalência<sup>22</sup>.

Quanto ao emprego das técnicas para detecção parasitária, a técnica de HPJ permitiu a identificação de *Ascaris lumbricoides*, *Strongyloides stercoralis* e, em uma das amostras, *Giardia lamblia*.

No entanto, com a técnica de Faust e cols foi possível a identificação dos outros parasitos e especialmente *Giardia lamblia*, demonstrando maior sensibilidade para a detecção de protozoários em relação à técnica de sedimentação espontânea, como relatado por Ananias et al<sup>23</sup>. Reitera-se a importância do emprego de técnicas adequadas para o diagnóstico das parasitoses, uma vez que baixas frequências de determinados parasitos podem estar associadas às técnicas inadequadas de identificação.

No Ecomapa (**Figura**) foram verificadas relações moderadas entre o saneamento ambiental (água e esgoto) e as crianças acometidas pelos parasitos. No que diz respeito à água de abastecimento público, o município de Ribeirão Preto é totalmente abastecido pelo Sistema Aquífero Guarani, sendo que suas águas são potáveis e de ótima qualidade microbiológica<sup>24</sup>. Todas as famílias relataram possuir água encanada em suas residências. Embora o nível de abrangência dos serviços de abastecimento de água ser em toda a cidade, cabe salientar que no ano em que foi realizado o estudo (2015), reportagens veiculadas pela mídia local apresentaram desabastecimento em diversos bairros do município<sup>25</sup>, o que implica na busca por fontes alternativas de água e piora nas medidas de higiene pessoal e alimentar, que são facilitadores no processo de transmissão parasitária. Apesar desta informação não ter sido questionada aos familiares e funcionários das creches participantes, sabe-se que a falta de água tem sido frequente em Ribeirão Preto, atingindo especialmente bairros periféricos, onde as creches e as residências das crianças estão localizadas.

Ainda sobre o saneamento, o município coleta e trata 98 % do esgoto gerado, índice comparável aos países desenvolvidos, o que contribui para a melhoria da qualidade de vida da população<sup>24,26</sup>. No presente estudo, 97 % das famílias responderam que dispõem do serviço de coleta de esgoto em suas residências. Entretanto, 3 % relataram que em sua residência existe latrina (precárias instalações sanitárias) de uso familiar no quintal, como alternativa ao banheiro, onde são realizadas as necessidades fisiológicas. Esse fato é preocupante, visto que pode comprometer as medidas de higiene pessoal e favorecer

a contaminação do ambiente, contribuindo, portanto, para disseminação parasitária.

A baixa renda mostrou forte relação para o aparecimento de infecções parasitárias (**Figura**), uma vez que a renda de 82,3 % das famílias era de até três salários mínimos. Pedraza et al<sup>4</sup>, em um estudo de revisão sobre doenças infecciosas em crianças assistidas em creches, verificaram que as pessoas de baixa renda podem ser mais acometidas por enteroparasitos em função de precárias condições ambientais e falta de conhecimento de hábitos de higiene.

Com relação aos hábitos de higiene alimentar, observou-se forte relação deste aspecto com as parasitoses, uma vez que 76,5 % dos responsáveis pelas crianças não faziam uso de solução de cloro e/ou vinagre na higienização de verduras e frutas. Observou-se que o percentual de indivíduos que não utiliza qualquer produto saneante nas residências é considerável. Estudos conduzidos na cidade de Ribeirão Preto, SP, Brasil, constataram a contaminação parasitária de verduras provenientes de hortas irrigadas com água de córregos, com efluente tratado e clorado bem como àquelas comercializadas em feiras livres<sup>27,28</sup>. Dessa forma, se não houver uma lavagem eficiente de verduras e frutas em concentrações adequadas de cloro (200-250 ppm) e tempo de exposição ao desinfetante de 15 a 30 minutos<sup>29</sup>, estas podem ser uma potencial fonte de contaminação parasitária, tanto na residência quanto nas creches. Ainda neste sentido, há relatos de resistência dos cistos de *Giardia lamblia* ao cloro<sup>30</sup> e de protozoários e formas evolutivas de helmintos ao vinagre<sup>31</sup>.

Com relação à higiene pessoal, 46,3 % das crianças não possuíam o costume de lavar as mãos antes das refeições ou após as necessidades fisiológicas, o que pode contribuir para a infecção e disseminação parasitária, especialmente no ambiente escolar e familiar. Isso se deve à facilidade de transmissão de enteroparasitos ocasionadas pelo contato muito próximo entre as crianças e outros membros da escola e família e aos hábitos de levar as mãos sujas e objetos à boca<sup>4</sup>.

No que diz respeito ao nível educacional materno, foi verificado que a maior parcela das

mães das crianças (52,9 %) não completou o ensino médio, apresentando forte relação com as crianças parasitadas (**Figura**). No mesmo sentido, Pedraza et al.<sup>4</sup> mostraram que a escolaridade materna esteve entre as principais variáveis associadas ao desenvolvimento de enteroparasitoses em crianças institucionalizadas em creches brasileiras. O grau de instrução das mães ou responsáveis pelas crianças constitui um aspecto relevante no combate às doenças infectocontagiosas.

Dos parasitos patogênicos encontrados no presente estudo, *Giardia lamblia* é capaz de estabelecer infecções em humanos e na maioria dos mamíferos, como cães e gatos, podendo ser considerada, portanto, uma doença zoonótica<sup>32</sup>. Do total de crianças, 76 % tinham animais de estimação em casa (cães e/ou gatos), apresentando forte relação com as crianças parasitadas (**Figura**). Ferreira et al.<sup>33</sup> avaliaram amostras fecais de cães e gatos em Londrina, PR, e verificaram que *Giardia* sp. esteve entre os mais frequentes, representando riscos para a saúde humana. Sabe-se ainda que os cistos de *Giardia* sp. são eliminados nas fezes em sua forma infectante, mantendo-se viáveis no ambiente por vários meses em decorrência de condições favoráveis, como umidade e clima tropical. Tal fator pode favorecer a viabilidade dos cistos de *Giardia* sp. nas fezes de animais, representando riscos de infecção à população exposta. Desta forma é relevante recolher as fezes dos animais e higienizar o local de defecação peridomiciliar para evitar o contato e infecção das crianças. Além disso, deve-se proceder a administração de antiparasitários nos animais domésticos com o acompanhamento de um médico veterinário. Ressalta-se a importância do uso de ferramentas de tipagem molecular e a integração com estudos epidemiológicos a fim de verificar a relação entre os casos de giardíase zoonótica e humana, visto que há evidências científicas entre os diferentes genótipos de *Giardia* sp. causadores de infecções em humanos e animais<sup>32</sup>.

O vínculo entre o contato interpessoal das crianças institucionalizadas e o quadro de parasitismo, foi observado uma forte relação (**Figura**). Rodrigues et al.<sup>34</sup> verificaram a incidência

de enteroparasitoses em crianças de zero a seis anos frequentadoras de Centros de Educação Infantil Municipal e Filantrópicos de Paranavaí (PR), e descreveram *Giardia lamblia* (23,6 %) como o parasito mais prevalente seguido por *Entamoeba coli* (9,5 %), corroborando com os achados do presente estudo. Nas creches, as crianças ocupam o mesmo ambiente de recreação estabelecendo contato pessoa-pessoa, além de compartilhar brinquedos e objetos, o que pode contribuir para a alta infecção parasitária, sendo necessárias medidas de educação em saúde para crianças e cuidadores.

## CONCLUSÃO

Os resultados apontaram para a presença de múltiplos determinantes associados à enteroparasitoses em crianças institucionalizadas em creches filantrópicas. Embora as informações emitidas pelas instituições responsáveis pelo saneamento ambiental do município de Ribeirão Preto indiquem boas condições, o desabastecimento de água acontece de forma frequente levando a busca de fontes não confiáveis quanto aos parâmetros de potabilidade. Com relação ao esgotamento sanitário há ainda uma parcela de famílias que não são atendidas por esses serviços, representando uma potencial fonte de transmissão de parasitoses. Outras condições socioambientais, como baixa renda familiar, inadequados hábitos de higiene pessoal e alimentar, escolaridade dos responsáveis e cuidadores, e contato com outras pessoas e/ou animais foram destacados como importantes condicionantes na ocorrência dessas enteroparasitoses, representando fortes relações.

Pese as limitações relacionadas ao número amostral no presente estudo de creches e crianças, os resultados obtidos ofereceram subsídios para a adaptação do Ecomapa que revelou os principais condicionantes socioambientais relacionados com as infecções parasitárias. A adaptação do Ecomapa como instrumento de avaliação qualitativa das condições socioambientais demonstrou-se de fácil interpretação, o que possibilita futuras reformulações para estudos em diversos cenários no âmbito educacional e social. O uso de

dados qualitativos facilita a compreensão pela comunidade, posto que estudos com dados estatísticos são de difícil interpretação. Portanto, reitera-se a importância de métodos qualitativos complementares, como o Ecomapa proposto no MCAF, especialmente na avaliação de condicionantes socioambientais e as interfaces com a saúde pública.

Diante do exposto é relevante a sensibilização dos envolvidos quanto às medidas de prevenção e controle das parasitoses intestinais, além de promover atividades que estimulem a adoção de hábitos saudáveis de higiene pessoal e alimentar, tanto das crianças, quanto dos familiares e funcionários envolvidos na educação infantil.

**Financiamento:** Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Processo nº 2014/20196-0).

## REFERÊNCIAS

1. Santos AA, Gurgel-Gonçalves R, Machado ER. Factors associated with the occurrence of intestinal parasites in children living in the Federal District of Brazil. *Rev Patol Trop*. 2014;43:89-7. [DOI: <https://dx.doi.org/10.5216/rpt.v43i1.29374>].
2. Gil FF, Busatti HG, Cruz VL, Santos JF, Gomes MA. High prevalence of enteroparasitosis in urban slums of Belo Horizonte-Brazil. Presence of enteroparasites as a risk factor in the family group. *Pathog Glob Health*. 2013;107(6):320-4. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1179/2047773213Y.0000000107>].
3. Silva MT, Santana JV, Bragagnoli G, Marinho AM, Malangueño E. Prevalence of *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* in the city of Campina Grande, in Northeastern Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2014;56(5):451-4. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652014000500015>].
4. Pedraza DF, Queiroz D, Sales MC. Doenças infecciosas em crianças pré-escolares brasileiras assistidas em creches. *Cien Saude Colet*. 2014;19(2):511-28. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1590/1413-81232014192.09592012>].
5. Fregonesi BM, Suzuki MN, Machado CS, Tonani KA, Fernandes AP, Monroe AA, et al. Emergent and re-emergent parasites in HIV-infected children: immunological and socio-environmental conditions that are involved in the transmission of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48(6):753-8. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0119-2015>].
6. Silva A, Cunha C, Martins W, Silva L, Silva G, Fernandes CK. Epidemiologia e prevenção de parasitoses intestinais em crianças das creches municipais de Itapuranga – GO. *Rev Fac Montes Belos*. 2015;8(1):e1-17.
7. Cury CR. A educação escolar e a rede privada: Concessão e Autorização. *Movimento Revista de Educação*. 2016;3(5):108-40.
8. Cecilio HP, Santos KS, Marcon SS. Modelo Calgary de avaliação da família: experiência em um projeto de extensão. *Cogitare Enferm*. 2014;19(3):536-44. [DOI: <http://dx.doi.org/10.5380/ce.v19i3.32729>].
9. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. [acesso 2017 Fev 24]. Disponível em: [<http://cidades.ibge.gov.br/xtras/temas.php?codmun=354340&idtema=117>].
10. Prefeitura de Ribeirão Preto. [acesso 2017 Fev 24]. Disponível em: [<https://www.ribeiraopreto.sp.gov.br/scidadania/equipamentos/i27entidades.php>].
11. Abreu LK, Braga LS, Navasconi TR, Ribas-Silva C. Prevalência e aspectos sócio-epidemiológicos de enteroparasitoses em crianças do centro municipal de educação infantil em Janiópolis-PR. *SaBios: Rev Saúde Biol*. 2014;9(3):76-84.
12. Vasconcelos IA, Oliveira JW, Cabral FR, Coutinho HD, Menezes IR. Prevalência de parasitoses intestinais entre crianças de 4-12 anos no Crato, Estado do Ceará: um problema recorrente de saúde pública. *Acta Sci Health Sci*. 2011;33(1):35-41. [DOI: <http://dx.doi.org/10.4025/actascihealthsci.v33i1.8539>].
13. Brasil. Decreto nº 8.381, de 29 de dezembro de 2014. Regulamenta a Lei nº 12.382, de 25 de fevereiro de 2011, que dispõe sobre o valor do salário mínimo e a sua política de valorização de longo prazo. [acesso 2017 Mar 08]. Disponível em: [[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2011-2014/2014/decreto/d8381.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2014/decreto/d8381.htm)].

14. Magalhães RF, Amaroa PF, Soares EB, Lopesa LA, Mafrab RS, Albertibc LR. Ocorrência de Enteroparasitoses em Crianças de Creches na Região do Vale do Aço – MG, Brasil. *UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde*. 2013;15(3):187-91.
15. Frighetto M, Barremaker V, Dambros B. Ocorrência de parasitos em chupetas de crianças em um centro municipal de educação infantil do município de Videira, SC. *Unoesc Ciênc ACBS*. 2013;4(2):177-86.
16. Santos CK, Grama DF, Limongi JE, Costa FC, Couto TR, Soares RM, et al. Epidemiological, parasitological and molecular aspects of *Giardia duodenalis* infection in children attending public daycare centers in southeastern Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2012;106(8):473-9. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2012.05.011>].
17. Gonçalves AL, Belizário TL, Pimentel JB, Penatti MP, Pedroso RS. Prevalence of intestinal parasites in preschool children in the region of Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011;44(2):191-3. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822011005000022>].
18. Silva, FS. Infecção por *Giardia lamblia* em crianças de 0 a 10 anos no município de Chapadinha, Maranhão, Brasil. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2009;68(2):309-13.
19. Silva SR, Maldonade IR, Ginani VC, Lima SA, Mendes VS, Azevedo ML, et al. Detection of intestinal parasites on field-grown strawberries in the Federal District of Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2014;47(6):801-15. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0044-2014>].
20. Barbosa AS, Bastos OM, Uchôa CM, Dib LV, Amendoeira MR. Avaliação da frequência de *Balantidium coli* em suínos, tratadores de suínos e primatas não humanos no estado do Rio de Janeiro. *Rev Patol Trop*. 2016;45(3):285-93. [DOI: <http://dx.doi.org/10.5216/rpt.v45i3.43505>].
21. Center for Disease Control and Prevention – CDC. [acesso 2017 Jun 23]. Disponível em: [ <https://www.cdc.gov/parasites/strongyloides/epi.html>].
22. Paula FM, Costa-Cruz JM. Epidemiological aspects of strongyloidiasis in Brazil. *Parasitology*. 2011;138(11):1331-40. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/S003118201100120X>].
23. Ananias FL, Ferraz RR, Pires AB, Zamboni A, Aranda KRS, Nigro CA, et al. Evaluation of the sensitivity of Faust method and spontaneous sedimentation for the diagnosis of giardiasis. *Rev Cub Med Trop*. 2016;68(2):157-64.
24. Departamento de Água e Esgoto de Ribeirão Preto - DAERP. [acesso 2017 Mar 02]. Disponível em: [ <http://www.ribeiraopreto.sp.gov.br/daerp/i04principal.php>].
25. Jornal o Globo - GLOBO. [acesso 2017 Mar 10]. Disponível em: [ <http://g1.globo.com/sp/ribeiraopreto-franca/noticia/2015/10/daerp-confirma-falta-dagua-em-sete-bairros-e-culpa-aumento-do-consumo.html>].
26. Ambient. [2017 Mar 10]. Disponível em: [ <http://www.ambient.com.br/pt-br/pagina/tecnologia-servico-do-meio-ambiente/>].
27. Takayanagui OM, Capuano DM, Oliveira CA, Bergamini AM, Okino MH, Castro e Silva AA, et al. Avaliação da contaminação de hortas produtoras de verduras após a implantação do sistema de fiscalização em Ribeirão Preto, SP. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007;40(2):239-41. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822007000200020>].
28. Nikaido M, Tonani KA, Julião FC, Trevilato TM, Takayanagui AM, Sanches SM, et al. Analysis of bacteria, parasites, and heavy metals in lettuce (*Lactuca sativa*) and rocket salad (*Eruca sativa L.*) irrigated with treated effluente from a biological wastewater treatment plant. *Biol Trace Elem Res*. 2010;134(3):342-51. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12011-009-8477-8>].
29. São Paulo. Centro de Vigilância Sanitária da Secretaria de Estado da Saúde. Portaria CVS-6/99, de 10 de Março de 1999. Regulamento técnico sobre os parâmetros e critérios para o controle higiênico-sanitário em estabelecimentos de alimentos. [acesso 2017 Jun 23]. Disponível em: [ [http://www.cvs.saude.sp.gov.br/zip/E\\_PT-CVS-06\\_100399.pdf](http://www.cvs.saude.sp.gov.br/zip/E_PT-CVS-06_100399.pdf)].
30. El Zawawy LA, El-Said D, Ali SM, Fathy FM. Disinfection efficacy of sodium dichloroisocyanurate (NADCC) against common food-borne intestinal protozoa. *J Egypt Soc Parasitol*. 2010;40(1):165-85.



31. Nascimento ED, Alencar FL. Eficiência antimicrobiana e antiparasitária de desinfetantes na higienização de hortaliças na cidade de Natal – RN. *Ciênc Nat*. 2014;36(2):92-106. [DOI: <http://dx.doi.org/10.5902/2179460X12755>].
32. Feng Y, Xiao L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clin Microbiol Rev*. 2011;24(1):110-40. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00033-10>].
33. Ferreira FP, Dias RC, Martins TA, Constantino C, Pasquali AK, Vidotto O, et al. Frequência de parasitas gastrointestinais em cães e gatos do município de Londrina, PR, com enfoque em saúde pública. *Semin Ciênc Agrár*. 2013;34(2):3851-8. [DOI: <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2013v34n6Supl2p3851>].
34. Rodrigues R, Hirano MM, Larentes TS. Verificação do parasitismo em centros de educação infantil de Paranaíba (PR): envolvendo ações sanitárias primárias desenvolvidas nessa comunidade. *Saúde e Pesquisa (Online)*. 2014;7(3):409-21.



# Utilização de ingredientes sucedâneos ao trigo na elaboração de bolos sem glúten

## Substitutes ingredients of wheat for making gluten-free cakes

[RIALA6/1724](#)

Laiz Aparecida Azevedo SILVA<sup>1</sup>, Flávia Vitorino FREITAS<sup>2</sup>, Tamires dos Santos VIEIRA<sup>1</sup>, Wagner Miranda BARBOSA<sup>2</sup>, Erika Madeira Moreira da SILVA<sup>3\*</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Avenida Marechal Campos, 1468, Maruípe, Vitória, ES, Brasil, CEP: 29043-900. Tel: 27 3335 7017. E-mail: erika.alimentos@gmail.com

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES

<sup>2</sup>Departamento de Farmácia e Nutrição, Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES

Recebido: 27.06.2016 - Aceito para publicação: 07.07.2017

### RESUMO

Apesar do aumento da oferta de produtos sem glúten, observa-se ainda a limitação de opções no mercado de panificados. O objetivo deste estudo foi determinar as características físico-químicas e sensoriais de bolos formulados com farinhas substitutivas ao trigo. Duas formulações contendo farinhas mistas substitutivas ao trigo (amaranto, quinoa, soja e fécula de mandioca) e uma controle (contendo trigo) foram analisadas quanto às medições e composição centesimal. Coliformes totais, pH e acidez total titulável (ATT) foram determinados no 1º e 4º dias de armazenamento. Aceitação e preferência foram avaliadas por meio de testes sensoriais. Os dados foram submetidos à análise de variância, seguida de testes paramétricos e não-paramétricos a 5% de probabilidade. Os bolos apresentaram características físicas de medições similares à formulação controle. A formulação com maior teor de soja apresentou maior teor de lipídios quando comparada com o controle. Os bolos com farinhas mistas obtiveram aceitação e preferência semelhantes entre si, porém inferiores à amostra controle. As amostras mantiveram-se estáveis quanto ao pH e ATT durante os quatro dias de armazenamento, não havendo crescimento de coliformes totais. Conclui-se que há viabilidade na formulação destes produtos com boa aceitação e valor nutricional agregado.

**Palavras-chave.** panificados, glúten, amaranto, quinoa, soja.

### ABSTRACT

Despite the increase in the supply of gluten-free products, an option limitation in the bread-making market is still observed. The objective of this study was to determine the physicochemical and sensorial characteristics of the cakes formulated with the wheat substitute flours. Two formulations containing mixed wheat substitutes (amaranth, quinoa, soybean and cassava starch) and a control sample (containing wheat) were analyzed on the measurements and proximate composition. Total coliforms, pH and titratable total acidity (TTA) were determined at the 1st and 4th days of storage. Acceptance and preference were assessed by means of sensory tests. The data were evaluated by the variance analysis, followed by parametric and non-parametric tests at 5% probability. The cakes presented physical characteristics of measurements similar to the control formulation. The formulation containing the highest soybean contents showed the major lipid contents when compared to the control. The mixed-flour cakes had similar acceptance and preference, but lower than the control sample. The samples pH and TTA were stable during the four days of storage, and no growth of total coliforms occurred. Therefore, it is viable the formulation of these products with good acceptance and nutritional value.

**Keywords.** bakery, gluten, amaranth, quinoa, soy.

## INTRODUÇÃO

A doença celíaca (DC) consiste em uma permanente intolerância ao glúten, caracterizada pela atrofia subtotal ou total da mucosa do intestino delgado proximal e desencadeia uma inadequada absorção de nutrientes, em indivíduos geneticamente predispostos<sup>1</sup>. O tratamento para a DC é basicamente dietético, ou seja, a exclusão dos alimentos que contenham glúten da dieta do indivíduo<sup>2</sup>.

Apesar da crescente oferta de biscoitos sem glúten, observam-se poucas opções no mercado de pães e bolos isentos de glúten, tornando a alimentação para estes consumidores monótona. Além disso, o valor comercial destes produtos ainda é um desafio para os mercados mais competitivos, tornando a prática de formulação caseira uma opção financeiramente mais atrativa. Ainda, é possível agregar misturas de diferentes ingredientes contendo maiores teores de fibras, vitaminas, minerais e compostos bioativos.

No desenvolvimento de produtos panificados, as proteínas do glúten apresentam um papel essencial na determinação da qualidade de cozimento, proporcionando características como capacidade de absorção de água, coesividade, viscosidade e elasticidade da massa<sup>3</sup>. Dessa forma, a substituição de ingredientes que contenham glúten na elaboração de pães e bolos se torna um desafio para a indústria, podendo originar produtos com menor volume e maior massa, afetando negativamente as características sensoriais do produto final.

A utilização de matérias-primas não convencionais possibilita originar produtos com qualidade, mas para isto é necessário o emprego de tecnologias que utilizem as propriedades funcionais de cada componente dos ingredientes, como o amido, ou a adição de farinhas ricas em proteínas que são capazes de formar estrutura semelhante à do glúten<sup>4</sup>.

A exigência primordial para que a massa seja formada de maneira adequada, dependendo do tipo de bolo, é que a mistura apresente uma quantidade suficiente de proteínas, possibilitando que, durante o forneamento, a estrutura proteica formada se espalhe sobre os constituintes da massa. A formação de uma fraca estrutura proteica diminuirá a retenção de gás na massa e favorecerá a formação de estrutura compacta e de baixo volume<sup>5</sup>.

Nos últimos anos, pesquisas utilizando farinhas mistas vêm sendo realizadas, visando à produção de alimentos com melhor qualidade nutricional, tornando uma alternativa para a elaboração de alimentos isentos de glúten<sup>2,4,6</sup>.

Dentre os produtos que possibilitam a utilização de farinhas mistas pode-se destacar o bolo. A qualidade do bolo é determinada por características essenciais, como: miolos homogêneos; textura macia, que deve ser mantida sem alterações ao longo da vida útil do produto; uniformidade da superfície; adequação do volume; sabor e palatabilidade agradáveis<sup>7</sup>.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e determinar características físico-químicas e sensoriais de bolos utilizando misturas de matérias-primas substitutivas ao trigo. Além disso, avaliar a estabilidade destes produtos durante o armazenamento, no que diz respeito ao pH, acidez total titulável (ATT) e coliformes totais.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Matéria-prima e formulação dos bolos

A escolha das matérias-primas sucedâneas ao trigo levou em consideração o teor de proteínas, bem como o de amido, para a obtenção de misturas capazes de promover condições desejáveis para a formulação dos bolos. Desta forma, as matérias-primas utilizadas foram: amaranto (*Amaranthus* L.) (16,2% de proteína), fécula de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) (82,5% de carboidrato), quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) (62,3% de carboidrato) e soja (*Glycine max* L.) (54,5% de proteína)<sup>6</sup>. A quinoa e o amaranto foram adquiridos na forma de flocos e processados no processador doméstico para a obtenção da farinha. A farinha de soja foi adquirida previamente processada. Os demais ingredientes foram adquiridos no comércio local da cidade de Alegre, Espírito Santo, Brasil. Para a formulação dos bolos foi utilizada uma técnica modificada, do estudo de Gutkoski et al<sup>8</sup>. Para a massa, os ingredientes utilizados para todas as formulações foram: margarina (35 g), açúcar (107 g), leite integral (70 mL), ovo (50 g), fermento em pó (3 g) e farinha de trigo ou farinha mista (130 g). Foram elaborados bolos controle (F1; com trigo – *Triticum aestivum* L.) e as formulações contendo

farinhas mistas substitutivas ao trigo (F2 e F3). As proporções das farinhas substitutivas foram definidas por meio de testes preliminares. Assim, foi estabelecido para a formulação F2: 30 g de amaranto, 10 g de quinoa, 40 g de soja, 20 g de fécula de mandioca para 100 g de formulação. Para a formulação F3: 35 g de amaranto, 10 g de quinoa, 30 g de soja, 25 g de fécula de mandioca para 100 g de formulação.

Inicialmente, as claras foram batidas na batedeira até o ponto de neve e reservadas. À parte, foram misturadas as gemas, juntamente com a margarina e o açúcar, sendo processados na batedeira por 3 minutos. Em seguida, acrescentou-se o leite e a farinha de trigo (no caso da formulação controle - F1) em pequenas quantidades, sem interromper o processo de batida, até a formação de uma massa homogênea, por aproximadamente 5 minutos. Finalmente, foram adicionados: claras em neve e fermento, sendo levemente misturados por 1 minuto. A massa foi transferida para formas de papel para bolo tipo *cupcake* (7,20 cm de diâmetro por 3,10 cm de altura) e, em seguida, para uma forma de alumínio (8,5 cm de diâmetro por 3,0 cm de altura), sendo assados no forno pré-aquecido a 220 °C, por 25 minutos. O mesmo procedimento foi conduzido para os bolos elaborados com as farinhas mistas, em substituição do trigo.

### **Determinação das características físicas (medições dos bolos)**

Para a avaliação das medidas dos bolos, doze preparações de cada formulação, oriundas de uma mesma fornada, foram selecionadas ao acaso. A razão entre os valores de massa (g) pós-cocção e pré-cocção foi utilizada para calcular o rendimento das formulações. Altura (cm) e diâmetro (cm) dos bolos foram aferidos sendo suas razões calculadas por meio das medições realizadas nos momentos pós-cocção e pré-cocção. A altura e o diâmetro dos bolos foram medidos por meio de um paquímetro Vernier Caliper®, 150 x 0,05 mm.

O método de deslocamento de sementes de painço foi utilizado para aferição do volume aparente pós-cocção, com o auxílio de uma proveta graduada de capacidade máxima de 500 mL. Foi adicionado um volume conhecido (500 mL) de sementes de painço à proveta e, posteriormente,

a adição do bolo à proveta deslocou as sementes utilizadas, possibilitando a determinação do volume aparente pós-cocção (mL). Desta forma, o volume específico ( $\text{mL.g}^{-1}$ ) foi determinado por meio a razão entre o volume aparente e a massa do bolo<sup>8</sup>.

O fator de expansão foi calculado pela razão entre o diâmetro (cm) e a espessura (cm) dos bolos. A densidade ( $\text{g.mL}^{-1}$ ) foi calculada pela razão entre a massa e o volume aparente pós-cocção. Todas as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente por 30 minutos antes da execução das medições.

### **Determinação das características químicas**

Os bolos das três diferentes formulações foram caracterizados quimicamente pós-cocção, em triplicata, quanto ao teor de: cinzas (por incineração na mufla), umidade (pelo método de secagem na estufa a 105 °C), proteínas (pelo método de *Kjeldahl*); lipídios (pelo método de Soxhlet), carboidratos totais (estimados por diferença), pH (por potenciometria) e ATT (%) (por titulação utilizando NaOH 0,1M)<sup>9</sup>.

### **Análise sensorial**

Foram recrutados, de maneira aleatória, cinquenta e dois avaliadores que aceitaram participar voluntariamente. Os critérios de exclusão utilizados para a análise sensorial foram: idade inferior a dezoito anos, indivíduos celíacos (em especial, devido à oferta da preparação contendo trigo) ou com algum tipo de alergia ou intolerância aos ingredientes utilizados nas preparações.

Aproximadamente 30 g de cada amostra foi ofertada aos avaliadores de maneira monádica, codificada com três dígitos, sob iluminação branca e acompanhada de água mineral. Para a análise da aceitação foram avaliados os atributos aroma, sabor, aparência, textura e avaliação global, utilizando uma escala hedônica de nove pontos, em que o valor 1 correspondeu a “desgostei muitíssimo” e o valor 9 a “gostei muitíssimo”<sup>10</sup>. Além dos atributos supracitados, foi também avaliada a intenção de compra, em que os avaliadores foram questionados se comprariam ou não o produto final. Por fim, os avaliadores realizaram o teste de ordenação-preferência das amostras degustadas.

## Avaliação dos bolos elaborados durante o armazenamento

As análises foram realizadas no 1º e 4º dias, por meio da pesquisa de coliformes totais<sup>11</sup>, determinação de pH e ATT<sup>9</sup>. Os bolos foram armazenados à temperatura ambiente dentro de formas de alumínio, cobertos com filme flexível, durante o período de armazenamento.

## Análise estatística

Os dados foram agrupados por parâmetro avaliado e tabulados no Microsoft Office®, versão 2007. Inicialmente, foi realizado o teste de *Kolmogorov-Smirnov*, para avaliação da distribuição dos dados. Para os dados que seguiam uma distribuição normal foi realizada análise de variância (ANOVA), seguida do teste de *Tukey*. Para os dados que não apresentavam uma distribuição normal foi realizado o teste de *Kruskal-Wallis*. Para os resultados dos testes durante o armazenamento, foi aplicado também o teste *t* para comparar os resultados obtidos no 1º e 4º dia. Todas as análises estatísticas utilizaram a probabilidade de 5% e foram executadas no programa ASSISTAT® versão 7.7. Com relação ao teste de ordenação-preferência, os dados foram tabulados na tabela de dupla entrada e foram obtidas as somas de ordens para cada tratamento. Os resultados foram comparados pelo teste de *Friedman* a 5% de probabilidade.

## Cuidados éticos

Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde, parecer 45955 (nº CAAE: 04258512.0.0000.5060), da Universidade Federal do Espírito Santo (CCS/UFES) em cumprimento à Resolução nº 466, 12 dez. 2012 do Conselho Nacional de Saúde. Ao concordarem em participar da pesquisa (análise sensorial), os voluntários assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido afirmando estarem cientes sobre os procedimentos ao qual foram submetidos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Caracterização física dos bolos (medições)

Observou-se que as três formulações não

diferiram entre si ( $p > 0,05$ ) em relação ao volume específico, razão altura e diâmetro, densidade e índice de expansão (**Tabela 1**). Estes resultados foram considerados satisfatórios uma vez que as formulações de bolos sem glúten apresentaram características físicas semelhantes aos bolos elaborados com trigo.

Um dos fatores que auxiliou o ganho de volume nos bolos foi a ação mecânica exercida sobre a massa, por meio do uso de batedeiras, conferindo aspecto de aeração ao produto. O ar incorporado à massa, durante a batida, é fundamental para o desenvolvimento de bolos de boa qualidade, com volume adequado e estrutura de miolo homogênea<sup>2</sup>.

A presença de glúten na massa confere certas propriedades tecnológicas, tais como elasticidade, coesividade e hidratação, aumentando o rendimento e a retenção de ar na massa. Neste contexto, é importante ressaltar que o bolo elaborado com farinha mista substitutiva ao trigo (F2) apresentou um rendimento significativamente maior que o bolo controle (F1) ( $p < 0,05$ ). Ressalta-se que esta formulação contém maior teor de soja (40%), quando comparada com a formulação 3 (30%). A absorção de água por produtos de panificação depende do conteúdo de proteína e de fibras. É sabido que o conteúdo de proteína absorve sua massa em água, ao passo que as fibras podem absorver água em até um terço de sua massa total. O teor de proteínas entre as formulações foi semelhante, entretanto tal fato pode estar atribuído ao conteúdo de fibras (dados não analisados) oriundos do maior teor de soja na formulação 2.

Schamne et al<sup>12</sup> desenvolveram bolos e pães isentos de glúten, utilizando farinha de arroz, amido de milho e amido de mandioca. Os volumes específicos observados pelos autores nas formulações foram menores aos obtidos neste estudo.

### Caracterização química das preparações

Apesar da utilização de matérias-primas com maior conteúdo proteico como a soja, nota-se que nenhum dos tratamentos diferiu entre si ( $p > 0,05$ ) em relação ao teor de proteínas. O mesmo pôde ser observado para os teores de carboidratos, cinzas e umidade das amostras (**Tabela 1**). A farinha de soja, por exemplo, contém

aproximadamente 23% de lipídios<sup>6</sup>, sendo que na formulação F2 esta matéria-prima encontrou-se em maior concentração. Entretanto, destaca-se que as formulações contendo farinhas sucedâneas apresentaram teores de lipídios estatisticamente semelhantes, sendo a formulação F3 (35% amaranto, 10% quinoa, 30% soja e 25% fécula de mandioca) semelhante à formulação controle. A margarina empregada na formulação dos bolos foi utilizada como fonte de lipídios para as preparações. Tal escolha se deve ao fato de que este ingrediente é amplamente utilizado tanto em preparações caseiras como em produtos comerciais, conferindo características tecnológicas fundamentais para produtos alimentícios de maior aceitação. Em relação ao tipo de lipídio, a margarina escolhida

apresenta em sua composição óleos vegetais interesterificados, não apresentando valores significativos de ácidos graxos *trans* (dados obtidos da rotulagem e lista de ingredientes do produto).

A formulação F2 (com maior teor de soja) apresentou menor valor de pH e ATT (analisados no primeiro dia pós-formulação). Durante o processamento, grãos como a soja, o amaranto e a quinoa são submetidos à elevadas temperaturas, ainda que por um intervalo de tempo curto, o que pode desencadear a formação de produtos, devido a oxidação de lipídios<sup>13</sup>, tais como álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres e outros hidrocarbonetos, provocando reduções nos valores de pH das amostras que contém estes ingredientes.

**Tabela 1.** Caracterização físico-química dos bolos controle (F1) e com farinhas substitutivas ao trigo (F2 e F3)

Determinação analítica	Formulações		
	F1	F2	F3
Volume específico (mL.g <sup>-1</sup> )	2,59 <sup>a</sup> ± 0,32	2,34 <sup>a</sup> ± 0,26	2,45 <sup>a</sup> ± 0,23
Rendimento (g)*	0,81 <sup>b</sup> ± 0,01	0,84 <sup>a</sup> ± 0,02	0,80 <sup>b</sup> ± 0,01
Altura (cm)*	2,02 <sup>a</sup> ± 0,43	1,88 <sup>a</sup> ± 0,22	1,95 <sup>a</sup> ± 0,19
Diâmetro (cm)*	0,82 <sup>a</sup> ± 0,02	0,82 <sup>a</sup> ± 0,02	0,82 <sup>a</sup> ± 0,02
Densidade (g.mL <sup>-1</sup> )	0,39 <sup>a</sup> ± 0,04	0,43 <sup>a</sup> ± 0,05	0,41 <sup>a</sup> ± 0,04
Índice de expansão	6,03 <sup>a</sup> ± 1,12	6,36 <sup>a</sup> ± 0,86	6,16 <sup>a</sup> ± 1,05
Proteínas (g.100g <sup>-1</sup> )	12,50 <sup>a</sup> ± 2,90	14,86 <sup>a</sup> ± 0,94	14,07 <sup>a</sup> ± 0,30
Carboidratos (g.100g <sup>-1</sup> )	52,73 <sup>a</sup> ± 8,44	53,73 <sup>a</sup> ± 2,71	55,23 <sup>a</sup> ± 3,73
Umidade (g.100g <sup>-1</sup> )	23,73 <sup>a</sup> ± 5,66	18,00 <sup>a</sup> ± 2,18	18,67 <sup>a</sup> ± 2,46
Cinzas (g.100g <sup>-1</sup> )**	1,08 <sup>a</sup> ± 0,17	1,80 <sup>a</sup> ± 0,08	1,81 <sup>a</sup> ± 0,09
Lipídios (g.100g <sup>-1</sup> )	8,87 <sup>b</sup> ± 0,65	12,13 <sup>a</sup> ± 0,21	10,09 <sup>ab</sup> ± 1,56
pH – 1º dia***	8,29 <sup>a</sup> ± 0,40	5,80 <sup>c</sup> ± 0,95	7,85 <sup>ab</sup> ± 0,26
pH – 4º dia***	7,14 <sup>a</sup> ± 0,06	6,33 <sup>a</sup> ± 0,38	6,28 <sup>a</sup> ± 0,16
Acidez total titulável (%) – 1º dia***	4,03 <sup>a</sup> ± 0,28	2,05 <sup>b</sup> ± 0,32	3,76 <sup>ab</sup> ± 0,26
Acidez total titulável (%) – 4º dia***	4,35 <sup>a</sup> ± 0,29	2,63 <sup>a</sup> ± 0,30	3,35 <sup>a</sup> ± 0,20
Coliformes totais (NMP.g <sup>-1</sup> ) – 1º dia	Ausente	Ausente	Ausente
Coliformes totais (NMP.g <sup>-1</sup> ) – 4º dia	Ausente	Ausente	Ausente

Dados apresentados como média±desvio padrão. F1: bolo controle com farinha de trigo; F2: bolo com farinha formulada (30% amaranto, 10% quinoa, 40% soja e 20% fécula de mandioca); F3: bolo com farinha formulada (35% amaranto, 10% quinoa, 30% soja e 25% fécula de mandioca); letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si pelo teste de *tukey* a 5% de probabilidade; \*valores obtidos da razão entre os parâmetros pós e pré-cocção de 12 amostras; \*\*teste de *Kruskal-Wallis*; \*\*\*resultados do armazenamento: analisados por meio do teste *Tukey* para avaliar possíveis diferenças entre as amostras e foram identificados por meio de letras. O teste t foi aplicado para os dois dias (1º e 4º dia) e não foram encontradas diferenças significativas ( $p>0,05$ )

De acordo com os resultados de pH evidenciados, estas preparações podem ser classificadas como de baixa acidez, visto que apresentam valores de pH maiores que 4,5. Os valores de pH apresentados podem ser propícios para o desenvolvimento de fungos (bolores e leveduras), que se multiplicam em uma faixa ampla de pH: 2,5 a 9,5<sup>14</sup>. Por isso, a importância do controle desses produtos durante o armazenamento.

### **Análise sensorial dos bolos**

As formulações isentas de trigo (F2 e F3) apresentaram características físicas (dimensões) semelhantes à formulação controle. Porém, na avaliação sensorial, a formulação contendo trigo (F1) apresentou melhor avaliação para todos os atributos (**Tabela 2**). As formulações F2 e F3 obtiveram resultados semelhantes entre si para todos os itens avaliados. Entretanto, no índice de aceitação, observou-se que, dentre as formulações isentas de trigo, a F2 foi que apresentou melhor avaliação, em especial para os atributos aroma, sabor e avaliação global (aceitação geral).

Em geral, produtos elaborados sem glúten podem apresentar comprometimento na textura. A formação da rede de glúten no bolo tradicional possibilita uma maior retenção de gás durante a fermentação e melhor estrutura de miolo, bem como uma maior elasticidade da massa associada à presença de glutenina<sup>12</sup>. Desta forma, observa-se que, para as duas formulações F2 e F3, este atributo obteve menor aceitação.

A quinoa é um pseudocereal que contém um acúmulo de saponinas, compostos responsáveis por conferir ao grão um gosto amargo, o que dificulta a sua inserção ao sistema de produção. Já a soja apresenta um sabor característico de feijão cru, conhecido como *beany flavor*, associado à presença de lipoxigenases, que são enzimas relacionadas com a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados existentes no grão, em especial o ácido linoleico, conferindo um sabor residual<sup>4</sup>.

Em relação ao teste de ordenação-preferência, observou-se que a amostra controle (F1) foi a preferida dentre as demais formulações (F2 e F3), que não diferiram entre si. Quanto à intenção de compra, pode-se destacar a formulação controle (F1), com 78,80% da intenção de compra. Ainda, 55,70%

dos avaliadores demonstraram intenção de compra para F3 e 51,90% para F2.

### **Avaliação dos bolos elaborados durante o armazenamento**

O pH e a ATT de um produto são fatores que podem influenciar no crescimento, sobrevivência ou destruição dos micro-organismos que estiverem nele presentes. Possíveis alterações nos valores de pH e ATT podem ocorrer devido à redução de ácidos orgânicos no produto que liberam íons hidrogênio e de seus sais, o que faz com que ocorra a redução no pH e o aumento na ATT. Oscilações na ATT podem estar associadas à ocorrência de reações metabólicas de enzimas presentes nas farinhas (em especial àquelas não processadas), visto que o aumento da ATT é proporcional a concentração de enzimas. Alterações na ATT durante a etapa de armazenamento do produto podem oscilar com o grau de ácidos orgânicos presentes e com a temperatura de armazenamento<sup>15</sup>. Entretanto, neste estudo, durante o armazenamento não foram observadas alterações significativas tanto do pH quanto da ATT, entre o 1º e o 4º dia ( $p > 0,05$ ), para as três formulações.

Durante armazenamento dos bolos, não foi observado crescimento de coliformes totais (a 45 °C). Estes resultados estão em conformidade com a RDC nº 12, onde está prescrito que o limite máximo de coliformes a 45 °C em bolos é  $10^2$  NMP.g<sup>-1</sup><sup>11</sup>.

A presença de coliformes nos alimentos é de grande relevância para indicar a contaminação durante ou após o processamento. Os micro-organismos indicadores são espécies ou grupos que, quando encontrados em um alimento, podem fornecer informações em relação à ocorrência de contaminação fecal, provável presença de patógenos ou quanto à deterioração potencial de um alimento, além do indicativo de condições sanitárias insatisfatórias durante o processamento, produção ou armazenamento<sup>14</sup>.

Nos alimentos processados, a constatação de coliformes totais a 45 °C e *Escherichia coli* são consideradas evidências de contaminação nas etapas posteriores ao processamento ou sanitização, indicando a implantação inadequada das boas práticas de fabricação, o que não foi observado no presente estudo.

**Tabela 2.** Avaliação sensorial (média±desvio-padrão, M±DP) e índice de aceitação (IA, %) para as formulações de bolo controle (F1) e com farinhas substitutivas ao trigo (F2 e F3)

Atributos	Formulações		
	F1	F2	F3
	M±DP (IA%)	M±DP (IA%)	M±DP (IA%)
Aroma	6,91 <sup>a</sup> ± 1,80 (76,22)	6,13 <sup>b</sup> ± 1,49 (76,37)	6,03 <sup>b</sup> ± 1,89 (66,67)
Sabor	7,13 <sup>a</sup> ± 1,77 (78,89)	5,64 <sup>b</sup> ± 1,87 (70,37)	5,82 <sup>b</sup> ± 2,11 (64,78)
Aparência	7,24 <sup>a</sup> ± 1,59 (80,33)	6,21 <sup>b</sup> ± 1,85 (68,56)	6,35 <sup>b</sup> ± 1,75 (70,00)
Textura	7,26 <sup>a</sup> ± 1,65 (80,56)	5,95 <sup>b</sup> ± 1,91 (64,22)	5,91 <sup>b</sup> ± 2,12 (64,22)
Aceitação global	7,29 <sup>a</sup> ± 1,61 (80,56)	5,83 <sup>b</sup> ± 1,86 (72,62)	6,24 <sup>b</sup> ± 2,00 (68,55)

F1: bolo controle com farinha de trigo; F2: bolo com farinha formulada (30% amaranto, 10% quinoa, 40% soja e 20% fécula de mandioca); F3: bolo com farinha formulada (35% amaranto, 10% quinoa, 30% soja e 25% fécula de mandioca); letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si pelo teste de *Tukey* a 5% de probabilidade; \*índice de boa aceitação  $\geq 70\%$ <sup>2</sup>

## CONCLUSÃO

A utilização de ingredientes sucedâneos do trigo para elaboração de bolos sem glúten constitui um desafio tecnológico, uma vez que as proteínas do glúten apresentam um papel essencial na determinação da qualidade do cozimento e, conseqüentemente, na qualidade do produto final.

As substituições, em sua maioria, afetam as características sensoriais influenciando diretamente na aceitação do produto. Entretanto, as formulações preparadas neste estudo apresentaram dimensões físicas similares ao bolo tradicional (contendo trigo).

Não foram evidenciadas diferenças em relação a aceitação e a preferência entre as duas formulações com farinhas mistas sucedâneas ao trigo. Estas amostras apresentaram mesmo conteúdo de cinzas e proteínas, sendo que aquela com maior conteúdo de soja apresentou maior teor de lipídios, menor pH e ATT, em relação à formulação controle. A estabilidade das formulações pode ser estimada em mais de quatro dias, considerando as condições de armazenamento e a utilização de embalagens e atmosfera apropriadas.

## REFERÊNCIAS

1. Araújo HM, Araújo WM, Botelho RB, Zandonadi RP. Doença celíaca, hábitos e práticas alimentares e qualidade de vida. *Rev Nutr*. 2010;23(3):467-74. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1590/S1415-52732010000300014>].
2. Ramos NC, Piemolini-Barreto LT, Sandri IG. Elaboração de pré-mistura para bolo sem glúten. *Alim Nutr*. 2012;23(1):33-8.
3. Wieser H. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiol*. 2007;24(2):115-9. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2006.07.004>].
4. Kirinus P, Copetti C, Oliveira VR. Utilização de farinha de soja (*Glycine max*) e de quinoa (*Chenopodium quinoa*) no preparo de macarrão caseiro sem glúten. *Alim Nutr*. 2010;21(4):555-61.
5. Morr CV, Hoffmann W, Buchheim W. Use of applied air pressure to improve the baking properties of whey protein isolates in angel food cakes. *LWT-Food Sci Technol*. 2003;36(1):83-90. [DOI: [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(02\)00187-1](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(02)00187-1)].
6. Vieira TS, Freitas FV, Silva LAA, Barbosa WM, Silva EMM. Efeito da substituição da farinha de trigo no desenvolvimento de biscoitos sem glúten. *Braz J Food Technol*. 2015;18(4):285-92. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1590/1981-6723.1815>].
7. Osawa CC, Fontes LCB, Miranda EHW, Chang YK, Steel CJ. Avaliação físico-química de bolo de chocolate com coberturas comestíveis à base de gelatina, ácido esteárico, amido modificado ou cera de carnaúba. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2009;29(1):92-9. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612009000100015>].



8. Gutkoski LC, Teixeira DMF, Durigon A, Ganzer AG, Bertolin TE, Colla LM. Influência dos teores de aveia e de gordura nas características tecnológicas e funcionais de bolo. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2009;29(2):254-61. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612009000200003>].
9. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - Brasil). Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4ª ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz; 2008.
10. Minim VPR. Análise Sensorial: Estudos com consumidores. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 2006. 225p.
11. 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.
12. Schamne C, Dutcosky SD, Demiate IM. Obtention and characterization of gluten-free baked products. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2010;30(3):741-50. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612010000300027>].
13. Rodas B, Bressani R. Contenido de aceite, ácidos grasos y escualeno en variedades crudas y procesadas de grano de amaranto. *Arch Latinoam Nutr*. 2009;59(1):82-7.
14. Franco BDGM, Landgraf M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Atheneu; 2003.
15. Borges AM, Pereira J, Silva Júnior A, Lucena EM, Sales JC. Estabilidade da pré-mistura de bolos elaborados com 60% de farinha de banana verde. *Ciênc Agrotec*. 2010;34(1):173-81. DOI: [<https://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542010000100022>].



# Pertussis characterization in the central-west region of São Paulo state, Brazil

## Caracterização da coqueluche na região centro-oeste do Estado de São Paulo, Brasil

RIALA6/1725

André MARTINS<sup>1\*</sup>, Salete França PÔRTO<sup>1</sup>, Claudia Regina DELAFIORI<sup>1</sup>, Luciano Moura MARTINS<sup>2</sup>, Carlos Henrique CAMARGO<sup>2</sup>, Daniela LEITE<sup>2</sup>

\*Correspondence to: <sup>1</sup>Núcleo de Ciências Biomédicas, Centro de Laboratório Regional de Marília, Instituto Adolfo Lutz, Marília, SP, Brasil. Address: 1630 Lima e Costa St., Marília, SP, Brazil. Zip code: 17506-210. E-mail: andre.martins01@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Núcleo de Doenças Entéricas e Infecções por Patógenos Especiais, Centro de Bacteriologia, Instituto Adolfo Lutz, SP, Brasil.

Recebido: 03.05.2017 - Aceito para publicação: 09.11.2017

### ABSTRACT

Pertussis is a highly contagious respiratory disease caused by *Bordetella pertussis*. This study aimed at characterizing the *B. pertussis* laboratory positivity and the isolated strains in municipalities of the Central-West Region of São Paulo State, Brazil from 2010 to 2014. A total of 597 nasopharyngeal swabs samples were collected from suspected patients and contacts, and analyzed by *in vitro* culture and Real-Time PCR (qPCR). Culture-positive *B. pertussis* strains were characterized by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis. Considering culture and/or qPCR, the positivity rate was of 19.6%. Out of 117 samples with *B. pertussis*, 23 were detected by both methods, 89 by qPCR only and five by culture only. Strains presenting FIM3 (40%), FIM2,3 (32%) and FIM2 (28%) serotypes were found. Five pulsotypes were detected by PFGE, 48% of which identified as BP.Xba.0039, being the predominant type in this study. Among the positive strains, 50% were isolated from <2 months old-children and 17% were isolated from three to six months old patients. Non-vaccinated children or with incomplete vaccination schedule were at the major risk of complications and death, highlighting the importance of a continuous monitoring of this infection for the future control strategies.

**Keywords.** *Bordetella pertussis*, whooping cough, pulsed field gel electrophoresis, real-time PCR.

### RESUMO

A coqueluche é uma doença respiratória altamente contagiosa causada por *Bordetella pertussis*. Este estudo caracterizou a positividade de *B. pertussis* e as cepas isoladas em municípios da Região Centro-Oeste do Estado de São Paulo de 2010 a 2014. Foram coletados 597 esfregaços nasofaríngeos de pacientes e contatos suspeitos de coqueluche, e analisados por cultura e Real-Time PCR (qPCR). Os isolados de *B. pertussis* obtidos de cultura foram caracterizados por sorotipagem e eletroforese em gel de campo pulsado. Considerando-se a cultura e/ou qPCR, verificou-se taxa de positividade de 19,6%. Das 117 amostras positivas para *B. pertussis*, 23 foram detectadas por ambos os métodos, 89 apenas por qPCR e cinco apenas na cultura. Foram detectadas cepas de sorotipos FIM3 (40%), FIM2,3 (32%) e FIM2 (28%). Cinco pulsotipos foram detectados pela PFGE, e 48% identificados como BP.Xba.0039, o tipo predominante neste estudo. Entre as cepas positivas, 50% foram isoladas de crianças menores de dois meses e 17% isoladas da faixa etária de três a seis meses. Crianças não vacinadas ou com esquema de vacinação incompleta têm maior risco de complicações e óbito, o que ressalta a importância do monitoramento contínuo desta infecção para futuras estratégias de controle.

**Palavras-chave.** *Bordetella pertussis*; coqueluche, eletroforese em gel de campo pulsado, PCR em tempo real.

## INTRODUCTION

Whooping cough or pertussis is an acute infectious disease which harms the human upper respiratory tract caused by *Bordetella pertussis*<sup>1,2</sup>. There are ten genetically distinct species in the genus *Bordetella*, including *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. holmesii* and *B. bronchiseptica* as the most commonly associated with human respiratory infections<sup>3</sup>. *B. bronchiseptica* rarely infects the healthy individuals and *B. holmesii* is likely to cause disease mainly in adults<sup>4,5</sup>, although there are reports on this bacterium circulating among infant populations<sup>6</sup>.

Vaccination constitutes the main form for controlling and preventing pertussis. The heat-inactivated *B. pertussis* organisms and the acellular vaccine are composed of highly purified selected components<sup>7</sup>.

Despite the high vaccination coverage, *B. pertussis* continues to circulate in both developed and developing countries, and causing outbreaks in every age groups, with epidemic cycles every 3-5 years<sup>8,9</sup>. In Brazil the reemergence of pertussis occurred from 2011 to 2014 and high number of cases were reported, including outbreaks descriptions in Distrito Federal in 2012 and 2014<sup>10</sup>. In 2015, 10,487 suspected cases were reported and 28.2 % were confirmed. The incidence rate was 1.5 cases per 100,000 inhabitants. The Brazilian states with the highest number of reported cases in that year were São Paulo (4,170), Paraná (883) and Pernambuco (710)<sup>11</sup>.

Many hypotheses have been suggested to explain the reemergence of pertussis in various countries, including Brazil, such as, the use of better laboratory diagnostic tools, the improvement in epidemiological surveillance, the reduction in the vaccine efficacy and the pathogen adaptation or genetic changes due to the selective pressure caused by acellular vaccines<sup>12,13</sup>. Furthermore, the reemergence of the disease could be the consequence of progressive loss of immunity, rendering the individuals susceptible over the years. These groups are prone to act as bacteria reservoirs and as infection sources for lactating children younger than six months old, who are still incompletely vaccinated<sup>14,15,16</sup>.

The clinical pertussis case definitions require the occurrence of respiratory symptoms, such as paroxysmal cough for at least two weeks, the inspiratory whoop and the post-tussive emesis. However, the specificity of case definitions is negatively influenced by the time from infection to diagnosis, by the previous vaccination or infection, and by increasing the age of patients<sup>17</sup>. Clinical symptoms are not pathognomic, therefore the laboratory diagnosis is recommended whenever is possible<sup>18</sup>.

The laboratory diagnosis of pertussis can be confirmed by microbiological, immunological and molecular methods, as *in vitro* culture of nasopharyngeal secretions, detection of anti-*Bordetella* antibodies and Real-Time PCR (qPCR), respectively<sup>2,19</sup>. The use of molecular techniques has improved the sensitivity of the pertussis laboratorial detection. However, the culture has still been considered as the gold standard method for diagnosing, and it should be maintained in the laboratory routine<sup>20</sup>.

Studies using the molecular typing techniques as Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE), Multilocus Sequence Typing (MLST) and Multilocus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) show the changes occurred in the *B. pertussis* circulating in the world. The continuous monitoring of these strains is needed for controlling and preventing the strategies of the disease<sup>21,22</sup>.

The present study aimed at evaluating the laboratory pertussis positivity in the Central-West municipalities of São Paulo State, Brazil during the period from 2010 to 2014, characterizing the cultured strains by serotyping and PFGE techniques.

## MATERIAL AND METHODS

### Samples

From January 2010 to December 2014, 597 nasopharyngeal swabs samples were analyzed in the Regional Laboratory of Marília (CLR/IAL – Marília, SP). These samples were collected from the pertussis-suspected patients and their contacts (age range being from four days to 65 years old), in accordance with the definition of suspected case recommended by the Ministry of Health of Brazil<sup>23,24</sup>.

The samples came from hospitals (n = 441) and outpatient health units (n = 156). Two hundred and fifty-seven samples were collected from patients, seven from communicants and in 333 no information was available. These patients were treated in 47 hospitals settled in 15 municipalities in the region of Marília city, located in the center-west area of São Paulo State. Patients presenting incomplete data (no report on the date of symptom onset and/or no registration on the dates of sample collection) were excluded from this study. The analyzed variables were age, sex and calendar year of isolation.

### Isolation and Identification of *B. pertussis*

Samples were collected by using the flexible, sterile alginate swabs and then transported to the CLR/IAL-Marília in semi-solid charcoal agar (Regan-Lowe - RL) supplemented with 10 % sheep blood and 40 µg/mL cephalexin<sup>25</sup>. The nasopharyngeal swabs samples were cultured in the same collection day on RL agar; and they were incubated at 35 °C- 37 °C up to ten days, under an air ambient with high humidity. Colonies suspected of belonging to the genus *Bordetella* were confirmed by Gram staining, and the species were identified by biochemical tests previously described<sup>26</sup>. Serotyping was used to detect the O-antigen and the fimbrial antigens FIM2 and FIM3 from the *B. pertussis* strains by slide agglutination, following Gonçalves et al<sup>26</sup>. Anti-serum O1 and fimbrial antibodies FIM2 and FIM3 were produced in the National Reference Laboratory for Pertussis - Instituto Adolfo Lutz (IAL), São Paulo-SP, Brazil.

### Real Time PCR (qPCR)

After culturing, the swabs were placed into dry, sterile tubes and stored at -20 °C until they were shipped to IAL- São Paulo for performing the DNA and qPCR. DNA extraction was carried out by following the manufacturer recommendations using a MagNA Pure LC instrument with MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I (Roche Applied Science, Indianapolis, IN).

The qPCR methodology used in the present study was proposed by Leite et al<sup>27</sup>. The reaction was carried out in a LightCycler<sup>®</sup>480 Software release 1.5.0 SP3 - Roche<sup>®</sup> thermal cycler, including the primers and the probes specific for detecting the *ptxS1* toxin

gene (GenBank n° AJ920066) and the *IS481* insertion element (GenBank n° M22031), present in various copies in the *B. pertussis* chromosome.

### Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

The strains of *B. pertussis* were analyzed by means of the PFGE technique proposed by Advaniet al<sup>28</sup> using the restriction enzyme *Xba*I, with few modifications as follows. PFGE was carried out at 6V/cm, 14 °C, in two blocks, with a 5-second initial pulse and a 6-second final pulse for 11 hours (block 1), and 8-second initial pulse and 35-second final pulse for 13 hours (block 2). The band pattern was analyzed using the BioNumerics software package (ver. 7.1; Applied Maths, Inc.), and the similarity index was determined by the Dice similarity coefficient and Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages grouping.

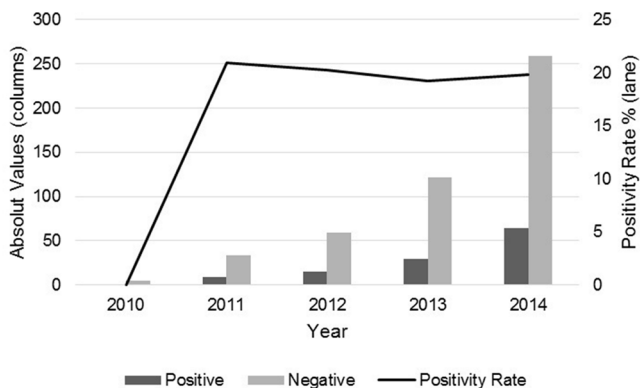
### Ethical Aspects

This study followed the recommendations provided by Resolution no. 466 of 2012 – National Health Council for Clinical Research in Humans; and it was approved by the Ethics Committee and being registered at the *Plataforma Brasil* under ID number CAAE: 49836815.0.0000.0059.

## RESULTS

During the period from 2010 to 2014 a significant increase in the number of laboratorial analyses was noticed (5, 43, 74, 152, and 323 samples in 2010, 2011, 2012, 2013 and 2014, respectively), indicating an expansion in the laboratory surveillance of pertussis in the region. However, in spite of improving the surveillance and analyzing higher number of samples, the positivity rates have remained consistent (approximately 20 %) since the introduction of the qPCR methodology in 2010 (**Figure 1**).

Of 597 analyzed samples, 117 (19.6 %) were positive for *B. pertussis* by culture and/or qPCR; qPCR detected 89 (76 %) samples, culture 5 (4 %) and qPCR and culture simultaneously detected 23 (20 %) positive samples. Among the culture-positive samples, 25 were serotyped and characterized by PFGE (three strains were unviable after performing several attempts of recovery).

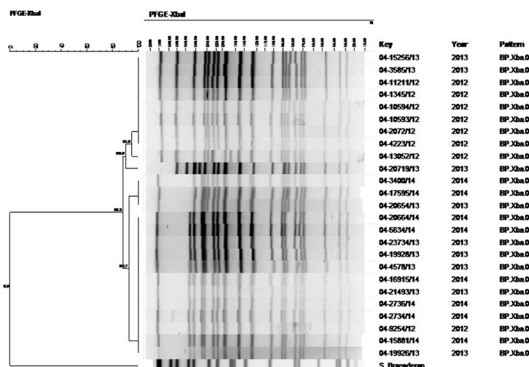


**Figure 1.** Sample number and positivity rate of *Bordetella pertussis* in nasopharyngeal swabs of suspected patients from the Central-West Region of São Paulo State, from 2010 to 2014

The age group presenting the highest number of positive results and also with the highest number of collected samples was that from children under two months (56/159, 35 %) followed by the group of children aging from three to six months (34/121, 28 %). Regarding to gender, 58 % were collected from female and 42 % from male with positivity rate of 10 % and 9 %, respectively.

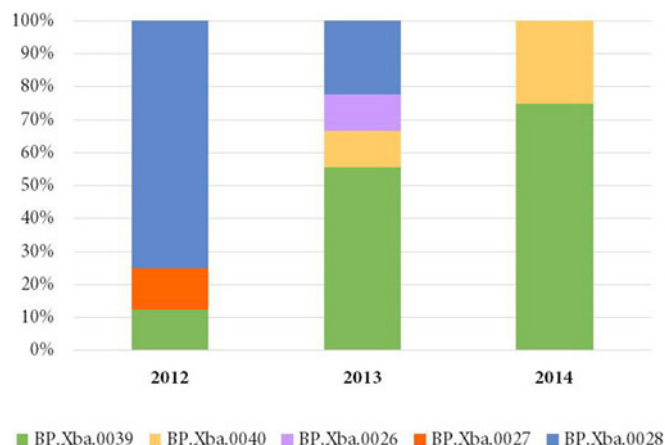
According to the serotype, this study showed a predominance of serotype FIM3 strains (10 strains; 40 %) followed by serotype FIM2,3 (8 strains; 32 %) and FIM2 (7 strains; 28 %).

Analysis by PFGE showed five different restriction profiles (pulsotypes) which were identified by the restriction of genomic DNA by the enzyme XbaI (Figure 2), and a similarity of 88.3 % was found among the isolates. The most frequent profile was BP.Xba.0039 (12/25 isolates), distributed in the years 2012, 2013 and 2014.



**Figure 2.** Restriction patterns and dendrogram of *Bordetella pertussis* isolates from the Central-West Region of São Paulo State, from 2012 to 2014

The BP.Xba.0028 profile (8/25 isolates) was also prevalent, but it was isolated in 2012 and 2013 only. The other profiles were BP.Xba.0026 (n = 1 in 2013), BP.Xba.0027 (n = 1 in 2012) and BP.Xba.0040 (n = 3, in 2013 and 2014) (Figure 3).



**Figure 3.** Temporal distribution of the *Bordetella pertussis* pulsotypes from the Central-West Region of São Paulo State, from 2012 to 2014, determined by pulsed-field gel electrophoresis

## DISCUSSION

Whooping cough is one of the most common diseases affecting neonates, children and adults, and in the recent years an increase in the cases number has been detected. And this disease has been a meaningful cause of morbidity and mortality worldwide<sup>3</sup>. Among the vaccine-preventable diseases, pertussis is the fifth leading cause of death in children under five years old, and according to WHO estimates in 2013, approximately 63,000 deaths occurred among patients of this age group<sup>8</sup>.

In the present study, the qPCR showed higher positivity rate when compared to *B. pertussis* culture. Among the laboratory diagnosis techniques, the molecular assays show highest sensitivity and rapid diagnosis, which positively impact the surveillance of this disease. And they contribute to the higher agility to the prevention actions. Although the pertussis diagnosis might be performed following the clinical and the clinical-epidemiological criteria, according to Zouari et al<sup>18</sup>, the pertussis clinical signs are not pathognomonic, which enhances the laboratory diagnostic significance.

This study showed higher positivity in the pertussis laboratory diagnosis in children under two months of age and in children under six months of age, who were not vaccinated or received an incomplete vaccination schedule. These circumstances put them mostly to the risk of complications and death, corroborating the previous studies which showed the correlation between the high rates of positivity and the death in these groups<sup>9,27,29,30</sup>.

Several studies have shown the resurgence of pertussis in many countries in the last 10 years<sup>22,31</sup>. One of the hypotheses for this reemergence would be the substitution of the whole cell vaccine by the acellular vaccine in many developed countries. This vaccine presents a restrict immunogenic protein variety, which could have caused a selection within the circulating clones of *B. pertussis*; and in consequence the patient numbers rise up<sup>22</sup>. In Brazil, the whole-cell vaccine has still being used for immunizing against this disease<sup>32</sup>. Thus, it could explain the results found in the present study, in which a proportional increase in the pertussis laboratory positivity has not observed over the years in the analyzed region, but the positivity rate is remaining stable. On the other hand, in other Brazilian locations, an increase in the number of cases was observed, which could be correlated with other factors beyond the vaccine, according to Torres et al<sup>29</sup>.

The results detected in this study by serotyping showed the predominance of serotype Fim3 corroborating the data from the previous studies. Thus, it is suggested that this serotype has been prevalent in Brazil and in other countries for decades<sup>14,22,26,27,33</sup>.

According to the temporal distribution of the pulsotypes, it was observed the replacement of the pulsotype BP.Xba.0028, predominant in 2012, by the BP.Xba.0039 and BP.Xba.0040 types. This study showed the predominance of the pattern BP.Xba.0039, which gradually increased from 2012 (12.5 %, 1/8 strains) to 2013 (55.6 %, 5/9) and 2014 (75 %; 6/8). It is interesting to note the homogeneity of two pulsotypes only in 2014, BP.Xba.0039 and BP.Xba.0040, presenting a similarity value of 92.7 %.

Similar data were reported in the USA<sup>34</sup>, and the predominance of one clone circulating from 2000 to 2012 was described. In England, a decrease in genetic diversity along with the predominance of few clones was observed, which started with the introduction of acellular vaccine<sup>35</sup>. The predominance of one clone could be associated with the antigenic selection promoted by vaccination or mutations, which increase the virulence and persistence of such clone in patients and infected individuals<sup>36</sup>.

## CONCLUSION

The present study has shown that the rates of laboratory positivity for pertussis have remained constant in the last years in the Central-West Region of São Paulo State. The predominance of the same serotype is reported, however with the substitution of the circulating clones during the years of the study. Children aged less than two months of age and from three to six months were the most affected group, because they were not vaccinated yet or they received incomplete immunization schedule. Strategies for preventing and controlling the disease as the suspected cases notification, the continued laboratory monitoring and the prevention measures as maternal vaccination recommended by the Brazilian Ministry of Health are fundamental tools for protecting the newborns and the babies.

## REFERENCES

1. Liphaut BL, Gonçalves MIC, Carvalhanas TRMP. Coqueluche: epidemiologia e controle. BEPA, Bol Epidemiol Paul [Internet]. 2008;5(53):3-8. Disponível em: [<http://periodicos.ses.sp.bvs.br/pdf/bepa/v5n53/v5n53a01.pdf>].
2. World Health Organization. Laboratory Manual for the Diagnosis of Whooping Cough caused by *Bordetella pertussis*/*Bordetella parapertussis*. Geneva, Switzerland; 2014 [acesso 2017 Jan 24]. Disponível em: [[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/127891/1/WHO\\_IVB\\_14.03\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/127891/1/WHO_IVB_14.03_eng.pdf)].

3. Kilgore PE, Salim AM, Zervos MJ, Schmitt HJ. Pertussis: Microbiology, Disease, Treatment, and Prevention. *Clin Microbiol Rev*. 2016;29(3):449-86. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00083-15>].
4. Kamiya H, Otsuka N, Ando Y, Odaira F, Yoshino S, Kawano K et al. Transmission of *Bordetella holmesii* during pertussis outbreak, Japan. *Emerg Infect Dis*. 2012;18(7):1166-9. [DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid1807.120130>].
5. Rodgers L, Martin SW, Cohn A, Budd J, Marcon M, Terranella A et al. Epidemiologic and Laboratory Features of a Large Outbreak of Pertussis-Like Illnesses Associated With Cocirculating *Bordetella holmesii* and *Bordetella pertussis*—Ohio, 2010–2011. *Clin Infect Dis*. 2013;56(3):322-31. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cis888>].
6. Miranda C, Wozniak A, Castillo C, Geoffroy E, Zumarán C, Porte L et al. Presence of *Bordetella holmesii* in an outbreak of pertussis in Chile. *Rev Chilena Infectol*. 2013;30:237-43. [DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182013000300001>].
7. Cherry JD. Pertussis: Challenges Today and for the Future. *PLoS Pathog*. 2013;9(7):e1003418. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003418>].
8. World Health Organization. Pertussis vaccines: WHO position paper. *Weekly Epidemiol Rec*. 2015;90(35):433-60. [acesso 2017 Jan 24]. Disponível em: [ <http://www.who.int/wer/2015/wer9035/en/>].
9. Fathima S, Ferrato C, Lee BE, Simmonds K, Yan L, Mukhi SN et al. *Bordetella pertussis* in sporadic and outbreak settings in Alberta, Canada, July 2004-December 2012. *BMC Infect Dis*. 2014;14:48. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-14-48>].
10. Rocha EL, Leite D, Camargo CH, Martins LM, Silva RSN, Martins VP et al. The characterization of *Bordetella pertussis* strains isolated in the Central-Western region of Brazil suggests the selection of a specific genetic profile during 2012-2014 outbreaks. *Epidemiol Infect*. 2017;145(7):1392-7. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/S0950268816003332>].
11. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação epidemiológica da coqueluche, Brasil, 2015. *Boletim Epidemiológico* 2016; 47(32):1-9. [acesso 2017 Jun 12]. Disponível em: [ <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/setembro/15/2016-025---Coqueluche-publica---o.pdf>].
12. Souder E, Long SS. Pertussis in the Era of New Strains of *Bordetella pertussis*. *Infect Dis Clin North Am*. 2015;29(4):699–713. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.idc.2015.07.005>].
13. Safadi MA. Control of pertussis in infants: time has finally come? *Expert Rev Vaccines*. 2015;14(6):781–3. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1586/14760584.2015.1043274>].
14. Leite D, Martins LM, Fiório CE, Blanco RM, Moraes JC, Berezin EN et al. Laboratory detection of *Bordetella pertussis*: are the household contacts a major sources of infection for infants? *SM VaccineVaccin*. 2015;1(3):1012.
15. Almeida AZCA, Marques DF, Alves EC, Silva PM, Leite D. Coqueluche: avaliação de 10 anos de diagnóstico laboratorial na região Noroeste do Estado de São Paulo, 2001-2011. *BEPA, Bol Epidemiol Paul* [Internet]. 2011; 90(8):16-23.
16. Martins DS. Detecção de *Bordetella pertussis* e *Bordetella parapertussis* através da técnica da reação em cadeia da polimerase e análise de prevalência no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2006. [dissertação de mestrado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2006.
17. van der Zee A, Schellekens JF, Mooi FR. Laboratory Diagnosis of Pertussis. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28(4):1005-26. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00031-15>].
18. Zouari A, Smaoui H, Kechrid A. The diagnosis of pertussis: which method to choose? *Crit Rev Microbiol*. 2012;38(2):111-21. [DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/1040841X.2011.622715>].
19. Centers for Disease Control and Prevention - CDC. Pertussis (Whooping Cough) - Diagnosis Confirmation. [acesso 2017 Jan 24]. Disponível em: [ <http://www.cdc.gov/pertussis/clinical/diagnostic-testing/diagnosis-confirmation.html>].
20. Faulkner A, Skoff T, Martin S, Cassidy P, Tondella ML, Liang J . Pertussis. In: Roush SW, Baldy LM editors. Manual for the surveillance of vaccine preventable diseases. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention National Center for Immunization and Respiratory Diseases; 2015. p. 1-12 [acesso 2017 Jan 24]. Disponível em: [ <https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/surv-manual/chpt10-pertussis.html>].

21. Leite D, Cassiday PK, Tatti KM, Vaz TM, Tondella ML. Serotypes and genetic profiles of *Bordetella pertussis* strains isolated in the city of São Paulo, 2006-2008. *J Pediatr (Rio J)*. 2012;88(4):357-60. [DOI: <http://dx.doi.org/10.2223/JPED.2186>].
22. van Gent M, Heuvelman CJ, van der Heide HG, Hallander HO, Advani A, Guiso N et al. Analysis of *Bordetella pertussis* clinical isolates circulating in European countries during the period 1998-2012. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015; 34(4):821-30. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-014-2297-2>].
23. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. 7<sup>a</sup> ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2009. p 1-19.
24. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância em Saúde. ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2014. p 87-104.
25. Regan J, Lowe F. Enrichment medium for the isolation of *Bordetella*. *J Clin Microbiol*. 1977;6(3):303-9.
26. Gonçalves CR, Vaz TMI, Medeiros MIC, Castro MTP, Rocha MMM, Melles CEA et al. Phenotypical and genotypical characterization of *Bordetella pertussis* strains isolated in São Paulo, Brazil, 1988-2002. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2007; 49(2):123-5. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652007000200012>].
27. Leite D, Blanco RM, Melo LC, Fiorio CE, Martins LM, Vaz TMI et al. Implementation and assessment of the use of Real-Time PCR in routine diagnosis for *Bordetella pertussis* detection in Brazil. *Arch Pediatr Infect Dis*. 2013;1(5):196-202. [DOI: <http://dx.doi.org/10.5812/pedinfect.12505>].
28. Advani A, Donnelly D, Hallander H. Reference system for characterization of *Bordetella pertussis* pulsed-field gel electrophoresis profiles. *J Clin Microbiol*. 2004;42(7):2890-7. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.42.7.2890-2897.2004>].
29. Torres RS, Santos TZ, Torres RA, Pereira VV, Fávero LAF, M Filho OR et al. Resurgence of pertussis at the age of vaccination: clinical, epidemiological, and molecular aspects. *J Pediatr (Rio J)*. 2015;91(4):333-8. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpmed.2014.09.004>].
30. Clark TA. Changing pertussis epidemiology: everything old is new again. *J Infect Dis*. 2014;209(7):978-81. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiu001>].
31. Sealey KL, Belcher T, Preston A. *Bordetella pertussis* epidemiology and evolution in the light of pertussis resurgence. *Infect Genet Evol*. 2016;40:136-43. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2016.02.032>].
32. Brasil. Ministério da Saúde. Calendário Nacional de Vacinação [acesso 2017 Jan 24]. Disponível em: [<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/197-secretaria-svs/13600-calendario-nacional-de-vacinacao>].
33. Benamrouche N, Tali Maamar H, Lazri M, Hasnaoui S, Radoui A, Lafer O et al. Pertussis in north-central and northwestern regions of Algeria. *J Infect Dev Ctries*. 2016;10(11):1191-9. [DOI: <http://dx.doi.org/10.3855/jidc.7262>].
34. Cassiday PK, Skoff TH, Jawahir S, Tondella ML. Changes in predominance of pulsed-field gel electrophoresis profiles of *Bordetella pertussis* isolates, United States, 2000-2012. *Emerg Infect Dis*. 2016;22(3):442-8. [DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2203.151136>].
35. Litt DJ, Neal SE, Fry NK. Changes in genetic diversity of the *Bordetella pertussis* population in the United Kingdom between 1920 and 2006 reflect vaccination coverage and emergence of a single dominant clonal type. *J Clin Microbiol*. 2009;47(3):680-8. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01838-08>].
36. Octavia S, Maharjan RP, Sintchenko V, Stevenson G, Reeves PR, Gilbert GL et al. Insight into evolution of *Bordetella pertussis* from comparative genomic analysis: evidence of vaccine-driven selection. *Mol Biol Evol*. 2011;28(1):707-15. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msq245>].





## Prevalência e fatores de risco associados às parasitoses intestinais em cães e gatos de Hospital Veterinário e de cães do Programa de Controle de Leishmaniose

Prevalence and risk factors associated with intestinal parasitosis in dogs and cats attended in Veterinary Hospital and dogs from Leishmaniasis Control Program

RIALA6/1726

Souza PMC. **Prevalência e fatores de risco associados às parasitoses intestinais em cães e gatos de Hospital Veterinário e de cães do Programa de Controle de Leishmaniose.** São Paulo, SP. 2016. [Dissertação de Mestrado – Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública, Programa de Pós Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo]. Orientador: Pedro Luiz Silva Pinto.

Parasitoses intestinais são relevantes na saúde de cães e gatos e podem assumir importância em saúde pública quando esses animais são considerados reservatórios para os humanos. Variáveis ambientais, demográficas, de manejo e status imune estão relacionadas à ocorrência dessas parasitoses. A associação dos fatores com a presença de parasitos é de grande importância para a elaboração de estratégias de prevenção e controle pelos profissionais de saúde. Amostras de fezes de cães (n=203) e gatos (n=34) atendidos em Hospital Veterinário e de cães (n=25) com Leishmaniose, foram analisadas para a presença de parasitos e a positividade geral encontrada foi de 17,2%. Ancilostomídeos e *Giardia* spp. foram os mais frequentes (6,1% e 5,0%). Infecções monoparasitárias prevaleceram (73,3%) em relação às poliparasitárias. Em cães, infecções por protozoários apresentaram associação com cinomose e, infecções por ancilostomídeo com leishmaniose. Animais menores de um ano de idade apresentaram associação com infecção por protozoários e *Toxocara* spp. Animais com doença imunossupressora prévia apresentaram associação com infecção por ancilostomídeo. Houve associação entre imunização desatualizada e infecções por *Cystoisospora* spp. e *Toxocara* spp.

Os dados relativos a frequência dos parasitos intestinais e das infecções monoparasitárias expressam uma característica da população estudada. Cães jovens com imunização desatualizada e com doença imunossupressora de base estão mais propensos, nessa população, a adquirirem infecções parasitárias.

**Palavras-chave.** cães, gatos, parasitos intestinais, zoonoses, fatores de risco.

Dissertação disponível em: <http://pesquisa.bvsalud.org/tes/resouce/pt/tes-35949>  
E-mail: [patricia.cunhasouza@gmail.com](mailto:patricia.cunhasouza@gmail.com)



# Desempenho da cultura líquida MGIT após implementação em uma rede de laboratórios públicos do estado de São Paulo

## Performance of liquid culture MGIT after implementation in a network of public laboratories of Sao Paulo state

RIALA6/1727

Heloisa da Silveira Paro PEDRO<sup>1</sup>, Andrea Gobetti Vieira COELHO<sup>2</sup>, Susilene Maria Tonelli NARDI<sup>1</sup>, Gleize VILELA<sup>3</sup>, Jaqueline Otero SILVA<sup>4</sup>, Ana Carolina Chiou NASCIMENTO<sup>2</sup>, Leonilda Chiare GALLE<sup>5</sup>, Dalva Cristina Girello AILY<sup>6</sup>, Regina Ruivo FERRO E SILVA<sup>7</sup>, Maria de Lourdes Matsuura SHIKAMA<sup>8</sup>, Andréa Resende LEITE<sup>9</sup>, Mara Aparecida Garnica SUAIDEN<sup>10</sup>, Lucilaine FERRAZOLI<sup>11\*</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>11</sup>Núcleo de Tuberculose e Micobacterioses, Centro de Bacteriologia, Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Central, São Paulo, Avenida Dr. Arnaldo 351, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 01246-000. Tel: 11 3068 2986. E-mail: lferrazoli@ial.sp.gov.br

Centro de Laboratórios Regionais - Instituto Adolfo Lutz: <sup>1</sup>São José do Rio Preto; <sup>2</sup>Santos; <sup>3</sup>Campinas; <sup>4</sup>Ribeirão Preto; <sup>5</sup>Presidente Prudente; <sup>6</sup>Rio Claro; <sup>7</sup>Santo André; <sup>8</sup>Sorocaba; <sup>9</sup>Taubaté; <sup>10</sup>Bauru

Recebido: 09.05.2017 - Aceito para publicação: 18.10.2017

### RESUMO

A OMS, em 2007, recomendou a implementação da cultura líquida para o diagnóstico da tuberculose (TB) e teste de sensibilidade para países de baixa e média renda. Neste estudo foi avaliado o desempenho da cultura líquida MGIT em condição de rotina após dois anos de implantação em uma rede de laboratórios públicos. Foi efetuada análise retrospectiva de dados da cultura líquida, realizadas em dez laboratórios regionais do Instituto Adolfo Lutz, de janeiro a março de 2010. Foram incluídas amostras submetidas a baciloscopia, cultura líquida MGIT automatizada ou manual e identificação presuntiva do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB). Foram detectadas 1.159 culturas positivas. Destas, 113 (9,7%) contaminaram, e 1.046 foram analisadas, sendo 850 (81,3%) CMTB, 116 (11,1%) micobactérias não tuberculosas e 6 (0,6%) *Nocardia sp.* A taxa de contaminação foi de 2,2% e o acréscimo da cultura para o diagnóstico da TB foi de 29,9%. A média do tempo de detecção da cultura foi de 14,7 dias (DP+/- 11,7 dias). A acurácia da identificação presuntiva foi de 91,3%. A cultura líquida MGIT demonstrou ser excelente alternativa para efetuar diagnóstico da TB e das micobacterioses, em razão da rapidez possibilitando uma intervenção rápida e eficaz no tratamento.

**Palavras-chave.** tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*, cultura líquida, MGIT, fator corda.

### ABSTRACT

In 2007, WHO recommended the implementation of liquid culture for tuberculosis (TB) diagnosis and drug-susceptibility test in low and middle-income countries. This study evaluated the performance of MGIT culture in routine condition after two years of its implementation in a public laboratories network. This is a retrospective study, which analyzed the data on the liquid culture performed in ten regional laboratories of the Institute Adolfo Lutz, from January to March 2010. The data included clinical samples submitted to microscopy, automated or manual MGIT culture and presumptive *M. tuberculosis* complex (MTBC) identification by analyzing the cord formation. Culture was positive in 1,159 samples. Of these, 113 (9.7%) contaminated, and 1,046 were analyzed, of which 850 (81.3%) were identified as MTBC, 116 (11.1%) as non-tuberculous mycobacteria and 6 (0.6%) as *Nocardia sp.* Contamination rate was 2.2% and the contribution of culture to the TB diagnosis was 29.9%. The detection mean time was 14.7 days (SD+/-11.7 days). The accuracy of the presumptive identification of MTBC was 91.3%. MGIT liquid culture demonstrated to be an excellent alternative for diagnosing TB and mycobacterioses, because of the rapidity of diagnosis, thus allowing an immediate and effective treatment.

**Keywords.** tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, liquid culture, MGIT, cord factor.

## INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB), uma das enfermidades infecciosas mais antigas na história da humanidade, dispõe de terapêutica eficaz há mais de meio século e ainda permanece como um desafio à saúde pública em todo o mundo, destacando-se na agenda de prioridades dos países com alta carga da doença<sup>1</sup>.

O Programa de Controle da Tuberculose (PCT) tem enfrentado desafios como o diagnóstico precoce da TB e das micobacterioses, principalmente pelos surtos ocasionados por cepas multirresistentes e aumento da incidência de infecções causadas por micobactérias não tuberculosas (MNT).

A confirmação bacteriológica da TB é feita pelos exames de baciloscopia, Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) e cultura. A baciloscopia de escarro apresenta baixa sensibilidade (34-80%), principalmente em amostras com poucos bacilos, mas ainda é muito utilizada em razão de sua rapidez e baixo custo<sup>2</sup>.

O teste Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF implantado no Brasil em 2014, detecta simultaneamente a presença do *M. tuberculosis* e a resistência a rifampicina. É um método eficaz e mais sensível que a baciloscopia. No entanto, este teste não identifica a resistência aos demais fármacos de primeira linha (isoniazida, estreptomicina e etambutol) utilizados no tratamento da TB<sup>3</sup>.

A cultura apresenta maior sensibilidade do que a baciloscopia e o teste Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF, e propicia o isolamento do bacilo para posterior identificação da espécie e o teste de suscetibilidade aos fármacos (TS) utilizados no tratamento da TB. A especificidade da cultura é maior do que 99% e pode acrescentar até 30% ao diagnóstico bacteriológico da doença<sup>4-6</sup>. A cultura em meio sólido como o Löwestein-Jensen (LJ) ou Ogawa-Kudoh apresenta como grande desvantagem a detecção tardia da micobactéria, e uma taxa de isolamento inferior àquela obtida com a utilização de meios líquidos<sup>6-8</sup>.

No final da década de 90, o sistema de cultura líquida, MGIT960<sup>™</sup> – Mycobacteria Growth Indicator Tube (Becton & Dickinson, Sparks, MD,

USA) passou a ser utilizado para o isolamento, para a detecção de resistência aos fármacos de primeira linha e, posteriormente, aos fármacos de segunda linha (amicacina, capreomicina, kanamicina e levofloxacina)<sup>9</sup>. Ambos os testes têm aprovação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. O sistema MGIT960<sup>™</sup> é um método de fácil execução, com sensibilidade elevada na detecção da micobactéria diretamente do espécime clínico, em um período de até três semanas<sup>5,6,8</sup>.

Em 2007, a OMS e o Grupo Técnico Consultivo em TB recomendaram a implementação da cultura líquida para o diagnóstico e TS aos fármacos utilizados no tratamento da TB para os países de baixa e média renda (OMS 2007)<sup>10</sup>.

Em 2008 os Centros de Laboratórios Regionais do Instituto Adolfo Lutz (CLR-IAL) passaram a utilizar a cultura líquida do sistema MGIT, de leitura tanto manual como automatizada para o diagnóstico da TB, TB resistente e micobacterioses. Desde sua implantação, a cultura líquida tem sido realizada especialmente para as populações como: prisional, indígena, em situação de rua, imigrantes, usuários de drogas ilícitas ou de bebidas alcoólicas, institucionalizados, portadores de HIV ou com outra condição imunossupressora, pacientes em retratamento, e com persistência de baciloscopia positiva no segundo mês de tratamento<sup>4</sup>.

O objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho da cultura líquida MGIT em condição de rotina, após dois anos de sua implantação em uma rede de laboratórios públicos do estado de São Paulo.

## MATERIAL E MÉTODO

O estudo obedeceu aos princípios básicos de trabalho retrospectivo de análise de dados laboratoriais e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IAL sob o número 041/2011.

Profissionais responsáveis pelo laboratório de TB dos doze CLR-IAL foram convidados a participar da pesquisa, dos quais dez enviaram seus dados para inclusão neste estudo. Foram analisados os resultados dos exames realizados em amostras biológicas de pacientes com indicação de

cultura para micobactérias, processadas nos dez CLR-IAL, no período de janeiro a março de 2010. No período do estudo foram incluídas as amostras submetidas aos exames de baciloscopia, cultura em meio líquido GIT do sistema automatizado ou manual, identificação presuntiva do complexo *M. tuberculosis* e identificação da espécie isolada. A baciloscopia, a cultura e a identificação presuntiva do complexo *M. tuberculosis* foram realizadas pelos CLR-IAL, a determinação da espécie foi feita pelo IAL Central<sup>4</sup>.

Para efetuar a baciloscopia, os esfregaços em lâminas de vidro foram corados pelo método de Ziehl-Neelsen. No caso de lâminas positivas realizou-se a contagem bacilar semi-quantitativa conforme recomendado pelo Ministério da Saúde (MS)<sup>4</sup>.

Para a cultura, as amostras foram tratadas pelo método de Petroff modificado. Resumidamente, um volume aproximado de 2 ml da amostra foi tratado com igual volume de solução de NaOH 1N, contendo indicador vermelho de fenol (40 g de NaOH, 0,04 g de vermelho de fenol, 1.000 ml de água destilada estéril). Os tubos contendo as amostras foram homogeneizados e colocados em estufa bacteriológica a 36 °C +/- 1 °C por 15 min e, então, centrifugados a 3.000g durante 15 min. Ao sedimento acrescentou-se HCl 1N até viragem para a cor amarela. Em seguida, adicionou-se a solução neutralizante estéril (4 g de NaOH, 0,004 g de vermelho de fenol, 0,2 g de sulfato de alumínio e potássio, 1.000 ml de água destilada) até a viragem para cor rosa<sup>8</sup>. Após a descontaminação, uma alíquota de 0,5 ml foi semeada em meio líquido MGIT contendo 800 µl de solução de enriquecimento e antibióticos – PANTA (Becton & Dickinson, Sparks, MD, USA). Os tubos foram incubados no sistema automatizado BACTEC MGIT 960 TB system ou incubados a 37 °C em estufa bacteriológica por até 42 dias. As leituras das culturas foram frequentes, utilizando-se a luz ultravioleta, a partir do segundo dia de incubação. Registrou-se o tempo de obtenção dos resultados positivos e a presença de contaminação visível<sup>4,11</sup>.

Três CLR-IAL utilizaram o sistema manual de incubação e de leitura no período estudado.

Sete CLR-IAL utilizaram o sistema automatizado, que consiste em uma estufa bacteriológica a 37 °C, com monitoramento a cada 60 min, por até 42 dias. As culturas positivas detectadas, tanto pelo sistema manual quanto automatizado, foram confirmadas quanto à presença de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), por meio de observação em esfregaços de amostras corados pelo método Ziehl-Neelsen<sup>4,11</sup>.

A identificação presuntiva do complexo *M. tuberculosis* dos isolados foi realizada nos CLR-IAL pela análise microscópica de uma amostra da cultura, em que foram avaliadas: a pureza da cultura, a presença de BAAR e a formação de corda. A presença da formação de corda é o teste presuntivo utilizado para diferenciar as espécies do complexo *M. tuberculosis* e MNT<sup>12,13</sup>. Em seguida, os isolados foram encaminhados ao IAL Central para efetuar a identificação da espécie pelo método PRA-hsp65 e testes fenotípicos<sup>4,14</sup>.

Os dados laboratoriais foram coletados em planilha de Excel desenhada para o estudo, baseando-se nas anotações contidas no livro de registro dos CLR-IAL e no Sistema de Informação e Gestão Hospitalar (SIGH) - Laboratórios de Micobactérias dos CLR-IAL.

A análise dos dados foi realizada utilizando-se os softwares estatísticos Epi-Info 7.1.2.0 (Atlanta, Geórgia, EUA)<sup>15</sup>, sendo utilizado o teste do qui-quadrado de Pearson<sup>16</sup> e o exato de Fisher para as análises comparativas e a distribuição de frequências<sup>17</sup>. Foi considerado o valor  $p \leq 0,05$  como o limite para significância estatística.

## RESULTADOS

No período avaliado foram detectadas 1.159 culturas positivas por meio de equipamento BACTEC 960 ou leitura manual utilizando-se lâmpada ultravioleta. Do total analisado, 948 (81,8%) amostras foram para fins diagnósticos e 211 (18,2%) para seguimento do tratamento da TB.

Das 1.159 culturas positivas, 113 (9,7%) apresentaram contaminação evidenciada nos esfregaços em lâminas de amostras da cultura corados pela técnica de Ziehl-Neelsen. Do total de

1.046 culturas que apresentaram crescimento, 973 (93,0%) foram identificadas, sendo 966 (99,3%) caracterizadas como pertencentes ao gênero *Mycobacterium* e 6 (0,6%) pertencentes ao gênero *Nocardia*. Uma cultura (0,1%) apresentou mistura de espécies de micobactérias (complexo *M. tuberculosis* e MNT). Das 966 culturas classificadas no gênero *Mycobacterium*, 850 (88,0%) foram identificadas como complexo *M. tuberculosis*, 116 (12,0%) como MNT (76 espécies de crescimento lento e 40 espécies de crescimento rápido).

A taxa média de contaminação calculada para seis laboratórios foi de 2,2%. A menor taxa foi de 0,6% e a maior de 5,7%.

Das 948 amostras recebidas para efetuar o diagnóstico, 703 (74,2%) foram identificadas como complexo *M. tuberculosis*, 78 (8,2%) como MNT e 6 (0,6%) como *Nocardia sp.* As demais 161 (17,0%) amostras tiveram as culturas contaminadas ou não foram identificadas. O acréscimo da cultura líquida em relação à baciloscopia para realizar o diagnóstico da TB foi de 29,9%. Por outro lado, a cultura líquida proporcionou o acréscimo de 71,9% no isolamento de MNT em relação à baciloscopia.

Ao avaliar o tempo de detecção do crescimento na cultura, excluindo-se as que apresentaram contaminação, foi observado que 70,0% das amostras (733/1.046) foram detectadas em até 15 dias (média = 14,7 dias DP+/-11,7 dias), independentemente da metodologia utilizada, manual ou automatizada. Ao comparar os dois métodos, a mediana de tempo de detecção foi maior no procedimento manual, isto é 17 dias no manual e 10 dias no automatizado (**Tabela**). No método manual, 40,3% das culturas identificadas como complexo *M. tuberculosis* foram detectadas em 25 dias. No automatizado, somente 5,8% das culturas identificadas como complexo *M. tuberculosis* foram detectadas após este período (**Tabela**).

As MNT de crescimento rápido são assim definidas por crescerem em até sete dias em sub-cultivos. Contudo, no isolamento primário, seja pelo método manual, seja pelo automatizado, 26 (65,0%) isolados cresceram após sete dias (**Tabela**).

O tempo de positividade da cultura em relação às espécies de micobactérias isoladas (complexo *M. tuberculosis* e MNT) e a carga bacilar no exame de baciloscopia variaram nos dois métodos estudados. No método manual, a mediana do tempo de crescimento do complexo *M. tuberculosis* com resultado de baciloscopia negativa foi de 25 dias. Para as espécies de MNT de crescimento lento foi de 15,5 dias e para as MNT de crescimento rápido foi de 6,5 dias. Por outro lado, no método automatizado a mediana do tempo de crescimento do complexo *M. tuberculosis* com resultado de baciloscopia negativa foi 15 dias; para as espécies de MNT de crescimento lento foi de 14 dias e para as MNT de crescimento rápido foi de 11,5 dias. Como esperado, observa-se que a mediana de tempo de detecção é inversamente proporcional ao número de cruces detectado na baciloscopia, independentemente da espécie ser do complexo *M. tuberculosis* ou MNT, ou seja, quanto maior o número de cruces, menor é o tempo de detecção (**Tabela**).

A positividade da baciloscopia foi maior nas espécies do complexo *M. tuberculosis*, isto é, 512 (67,8%) em comparação ao das MNT que foi de 29 (26,9%) ( $p < 0,0001$ ). A frequência de baciloscopias negativas foi maior entre as MNT de crescimento rápido [30 (81,0%)] do que entre as MNT de crescimento lento [49 (69,0%)], porém o resultado obtido não foi significativo ( $p = 0,13$ ).

A identificação presuntiva do complexo *M. tuberculosis* pela análise microscópica da formação de corda foi realizada em 98,8% (1.033/1.046) das culturas positivas. Dos 1.033 isolados analisados, 964 (93,3%) foram identificados, dos quais 808 (83,8%), classificados como pertencentes ao complexo *M. tuberculosis*, apresentaram formação de corda, correspondendo à sensibilidade de 95,2%. Dos 116 isolados identificados como MNT, 73 (62,9%) apresentaram resultado de formação de corda negativo, correspondendo à especificidade de 63,5%. A acurácia do teste de formação de corda foi de 91,3%.

**Tabela.** Tempo de detecção e relação com a baciloscopia e identificação presuntiva dos isolamentos obtidos pelos métodos, manual e automatizado em dez Centros de Laboratórios Regionais do Instituto Adolfo Lutz. SP

	N (%) Total (n= 1.046)	N (%) complexo <i>M. tuberculosis</i> (n= 850)	N (%) MNT Crescimento lento (n= 76)	N (%) MNT Crescimento rápido (n= 40)
<b>Método Manual*</b>	<b>213 (20,4)</b>	<b>176 (20,7)</b>	<b>12 (15,8)</b>	<b>8 (20,0)</b>
Tempo de detecção/dias				
1-6	27 (12,7)	17 (9,7)	3 (25,0)	4 (50,0)
7-15	67 (31,4)	55 (31,3)	4 (33,3)	3 (37,5)
16-24	37 (17,4)	33 (18,7)	3 (25,0)	-
≥25	82 (38,5)	71 (40,3)	2 (16,7)	1 (12,5)
<b>Mediana de tempo de detecção/dias **</b>	<b>17</b>	<b>20</b>	<b>14</b>	<b>6,5</b>
Baciloscopia negativa	23	25	15,5	6,5
Baciloscopia positiva 1-9 bacilos	4	-	-	4
Baciloscopia positiva +	18,5	21	3	8
Baciloscopia positiva ++	17	17	-	-
Baciloscopia positiva +++	9	9	-	-
<b>Método Automatizado***</b>	<b>833 (79,6)</b>	<b>674 (79,3)</b>	<b>64 (84,2)</b>	<b>32 (80,0)</b>
Tempo de detecção/dias				
1-6	155 (18,6)	115 (17,1)	13 (20,3)	10 (31,2)
7-15	484 (58,1)	408 (60,5)	32 (50,0)	13 (40,6)
16-24	143 (17,2)	112 (16,6)	14 (21,9)	6 (18,8)
≥25	51 (6,1)	39 (5,8)	5 (7,8)	3 (9,4)
<b>Mediana de tempo de detecção/dias ****</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>11</b>
Baciloscopia negativa	15	15	14	11,5
Baciloscopia positiva 1-9 bacilos	11	12	7,5	5
Baciloscopia positiva +	10	10	10	-
Baciloscopia positiva ++	9	9	8	4
Baciloscopia positiva +++	7	7	5	-
<b>Manual + automatizado</b>				
Baciloscopia negativa	360 (34,4)	243 (28,6)	49(64,5)	30 (75,0)
Baciloscopia positiva	577 (55,2)	512 (60,2)	22 (28,9)	7 (17,5)
Baciloscopia não realizada	109 (10,4)	95 (11,2)	5 (6,6)	3 (7,5)
<b>Identificação presuntiva</b>				
Formação de corda positiva	897 (85,8)	808 (95,1)	27 (35,5)	14 (35,0)
Formação de corda negativa	136 (13,0)	42 (4,9)	47 (61,9)	26 (65,0)
Não realizada	13 (1,2)	-	2 (2,6)	-

\*17 isolados não foram identificados; \*\* 48 amostras não tiveram baciloscopia realizada; \*\*\* 56 isolados não foram identificados, seis isolados foram identificados como *Nocardia sp*, uma cultura apresentou crescimento misto de duas espécies; \*\*\*\* 69 amostras não tiveram a baciloscopia realizada

## DISCUSSÃO

Neste estudo foi descrito o desempenho da cultura líquida MGIT em condição de rotina após dois anos de sua implantação em dez laboratórios públicos do estado de São Paulo. Embora os dados deste estudo tenham sido coletados no ano de 2010, a cultura líquida MGIT continua sendo utilizada nas mesmas condições de sua implantação. Inicialmente, a cultura automatizada foi implantada em sete CLR-IAL e no terceiro ano foi estendida para os três CLR-IAL que utilizavam a técnica manual.

Na implantação, optou-se por manter o método Petroff modificado para realizar a descontaminação das amostras, uma vez que esta técnica tem sido utilizada há mais de 30 anos pelos CLR-IAL, para efetuar o tratamento de amostras clínicas de origem pulmonar e extrapulmonar<sup>8</sup>. No presente estudo, foi observada a taxa de contaminação das culturas de 2,2%, sendo a menor de 0,6% e a maior de 5,7%. Esta taxa está de acordo com aquela aceitável de 6,0% para cultura líquida<sup>4</sup>. Aily et al<sup>18</sup>, em 2003, observaram a taxa de contaminação de 27,3% em meio LJ e de 24% em culturas líquidas do sistema MB/Bact<sup>TM</sup>. Nesse estudo os autores utilizaram a técnica de descontaminação N-acetil-L-cisteína NaOH, considerada menos drástica do que a de Petroff, porém ocasiona taxas de contaminação mais elevadas. A opção em manter o método de Petroff no presente trabalho foi pelo fato dos CLR-IAL receberem material clínico de outros municípios da região, muitas vezes em dia subsequente ao da coleta, o que pode aumentar a proliferação de contaminantes na amostra.

Entre as culturas positivas, houve a predominância de isolamento do complexo *M. tuberculosis* (88,0%) seguido pelas MNTs de crescimento lento (7,9%) e rápido (4,1%). Neste período, foram também isoladas espécies do gênero *Nocardia* (0,6%). Muricy et al<sup>19</sup> detectaram taxa um pouco maior de isolamento de nocardias (0,12%). Esta diferença pode ter ocorrido pelo fato de terem sido analisados os isolados obtidos de culturas de diferentes espécimes clínicos em meios sólidos e meios líquidos. O crescimento de espécies do gênero *Nocardia* em

meios de cultura para isolamento de micobactérias, como também a álcool-ácido resistência observada na coloração pela técnica de Ziehl-Neelsen são as características que exigem maior percepção do profissional<sup>19</sup>.

A comparação entre os exames de baciloscopia negativa e cultura positiva para MNT mostrou a taxa de acréscimo de 71,9% no isolamento de MNT em relação à baciloscopia. O MGIT é um meio rico em nutrientes, composto de meio Middlebrook 7H9 acrescido de solução de enriquecimento (ácido oleico, albumina, dextrose e catalase-OADC) e mistura liofilizada de antibióticos PANTA. Este meio favorece o isolamento de MNTs, como também de espécies de nocardias<sup>11</sup>. Muyoyeta et al<sup>5</sup>, em estudo comparativo de quatro sistemas de cultura para isolamento de micobactérias, obtiveram maiores taxas de isolamento de MNT em meio MGIT quando comparado com os meios LJ<sup>5</sup>. No estado de São Paulo, os pesquisadores do Instituto Adolfo Lutz observaram um aumento do isolamento e da diversidade das espécies de MNT após a implantação da cultura líquida<sup>14,20</sup>.

O acréscimo da cultura líquida em relação à baciloscopia para o diagnóstico da TB foi de 29,9%. Por outro lado, a cultura líquida proporcionou o acréscimo de 71,9% no isolamento de MNT em relação à baciloscopia. Estes dados indicam a melhoria no diagnóstico da TB e das micobacterioses. Outros estudos que avaliaram o desempenho da cultura líquida encontraram valores um pouco maiores de acréscimo desta metodologia no diagnóstico da TB. Em geral, esses estudos têm utilizado o método de descontaminação N-acetil-L-cisteína (NAC), considerado menos drástico, porém com maiores riscos de contaminação<sup>6,21</sup>. Outro fator que pode ter influenciado neste resultado, foi a possível perda da viabilidade dos bacilos em decorrência do transporte das amostras coletadas em municípios próximos aos CLR-IAL. Novos estudos são necessários para confirmar estes dados.

Outra vantagem da cultura líquida MGIT é o tempo de detecção do crescimento bacteriano. Nas amostras analisadas, o tempo médio para crescimento bacteriano foi de 14,4 dias, similar aos demais estudos<sup>6,21-23</sup>.

A cultura líquida MGIT 960 automatizada apresentou melhor desempenho em comparação com MGIT manual. Comparando-se a mediana dos tempos de detecção de crescimento entre os métodos MGIT manual e automatizado, foi observada uma diferença significativa de 20 e 10 dias, respectivamente. Isto pode ser explicado pelo fato do sistema automatizado apresentar monitoramento contínuo, a cada 60 minutos, e sinalizar como positivo com base em algoritmos de crescimento específicos. Este sistema faz notificação imediata de amostras positivas, bem como oferece uma mínima intervenção e manuseio por parte do usuário<sup>11</sup>. Outro aspecto importante a ser destacado quanto à mediana de tempo de crescimento é a redução pela metade (de 15 para 7 dias), ao analisar as amostras com baciloscopias negativa e positiva três cruces, respectivamente. Considerando-es as amostras com baciloscopias positivas, o tempo de detecção de positividade foi inversamente proporcional à carga bacilar e a positividade da baciloscopia foi maior para o complexo *M. tuberculosis* do que para as MNTs.

Os dados deste estudo concordam com os da literatura quanto à rapidez na detecção do crescimento e ao aumento de isolamento das espécies do complexo *M. tuberculosis*, como também das MNTs. Por outro lado, a cultura líquida requer maior percepção por parte do laboratorista, pois as características das colônias são mais evidenciadas em meio sólido. Portanto, há a necessidade de efetuar a identificação rápida do micro-organismo isolado, pois a liberação de resultado de cultura positiva para BAAR pode levar ao diagnóstico equivocado de TB<sup>24</sup>.

Por esta razão, juntamente com a implantação da cultura líquida nos CLR-IAL, foi implementada a identificação presuntiva das espécies do complexo *M. tuberculosis*, que consiste na observação microscópica em esfregaços de crescimento bacteriano quanto à formação de corda. Neste estudo, foi observada a acurácia de 91,3%, sensibilidade de 95,2% e especificidade de 63,5% para a identificação presuntiva do complexo *M. tuberculosis*. Outros estudos obtiveram índices de especificidade mais elevados. No entanto, esses estudos foram realizados, em sua maioria, analisando-se cultura

em meio sólido e a leitura realizada por observadores de um único laboratório<sup>25,26</sup>. No presente estudo, a leitura foi realizada por técnicos de dez diferentes laboratórios. Outro fato que merece destaque é que a cultura líquida favorece o crescimento de muitas espécies MNTs em corda, com o aspecto um pouco diferente da corda formada por espécies do complexo *M. tuberculosis*. Esta diferença pode confundir o observador com pouca experiência. O teste de formação de corda é ainda utilizado por muitos laboratórios para efetuar a identificação presuntiva, mas atualmente estão disponíveis comercialmente os testes imunocromatográficos, baseados na detecção do antígeno MPT64 que possibilitam realizar a identificação rápida a partir do crescimento bacteriano<sup>27</sup>.

O presente estudo apresenta algumas limitações, porque as taxas de contaminação das culturas foram calculadas apenas para seis laboratórios; ademais, não foram avaliados os casos que apresentaram resultados de baciloscopias positivas e culturas negativas.

Em conclusão, a cultura líquida MGIT implantada na rede de laboratórios públicos demonstrou ser excelente alternativa para realizar o diagnóstico da TB e das micobacterioses, em razão da rapidez na detecção do crescimento bacteriano. Esta rapidez possibilita uma intervenção rápida e eficaz no tratamento, com benefícios para os pacientes e para o controle da doença.

## AGRADECIMENTOS

À Erica Chimara, Fernanda Cristina dos Santos Simeão e Romilda Aparecida Lemes pela realização das identificações das espécies de micobactérias isoladas.

## REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2016. Geneva: World Health Organization. [acesso 2017 Mai 5]. Disponível em: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/250441/1/9789241565394-eng.pdf?ua=1].
2. Mathew P, Kuo YH, Vazirani B, Eng RH, Weinstein MP. Are three sputum acid fast bacillus smears necessary for discontinuing tuberculosis isolation? *J Clin Microbiol*. 2002;40(9):3482-4. [DOI: http://dx.doi.org/10.1128/JCM.40.9.3482-3484.2002].



3. World Health Organization. Automated Real-Time Nucleic Acid Amplification Technology for Rapid and Simultaneous Detection of Tuberculosis and Rifampicin Resistance: Xpert MTB/RIF Assay for the Diagnosis of Pulmonary and Extrapulmonary TB in Adults and Children. 2013.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias. Brasília: Ministério da Saúde, 2008. 436p.
5. Muyoyeta M, Schaap JA, De Haas P, Mwanza W, Muvwimi MW, Godfrey-Faussett P, et al. Comparison of four culture systems for *Mycobacterium tuberculosis* in the Zambian National Reference Laboratory. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2009;13(4):460-5.
6. Brum CB, Ramos DF, Abilleira FS, Silva AB, von Groll A, Silva PE. The BACTEC MGIT™ 320 system as a laboratory tool to diagnose tuberculosis in a Brazilian hospital with a high prevalence of HIV infection. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016;49(1):112-4. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0125-2015>].
7. Coelho AGV, Zamarioli LA, Reis CMPV, Figueiredo TRA. Estudo comparativo entre técnicas de Löwenstein-Jensen e do sistema MB/BacT™ no isolamento de micobactérias. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2005; 64(1):132-6.
8. Pedro HS, Nardi, SM, Arroyo MG, Ferreira MI, Goloni MR, Ferrazoli L. Avaliação do desempenho dos meios de cultura Ogawa-Kudoh e MGIT™ para isolamento de micobactérias. *BEPA*. 2011;8(91):5-13.
9. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde, 2011. 284p.
10. World Health Organization. Use of liquid TB culture and drug susceptibility testing (DST) in low and medium-income settings. Summary report of the Expert Group Meeting on the use of Liquid Culture Media. Geneva, 26 March 2007. Geneva, Switzerland.
11. Becton Dickinson & Co. BBL MGIT BD BACTEC MGIT 960 system user's manual. Document Number MA-0117 Revision: E. USA: 2004/06.
12. Collins CH, Grange JM, Yates MD. Identification of species. In: *Tuberculosis bacteriology: organization and practice*. 2ª ed. Butterworth-Heinemann, Oxford, 1997.
13. Coelho AGV, Zamarioli LA, Reis CMPV, Duca BLF. Avaliação do crescimento em cordas na identificação presumida do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bras Pneumol*. 2007;33(6):707-11. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-37132007000600015>].
14. Chimara E, Ferrazoli L, Ueki 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 Microbiology*. 2008; 20(8):48. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-8-48>].
15. EPI Info™ 7 [internet]. Version 7.1.2.0. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention; 2017 [acesso 2017 Fev 3]. Disponível em: [<http://www.cdc.gov/epiinfo>].
16. Souza AM. Departamento de Estatística - PPGEMQ/PPGEP – UFSM, 2009. Disponível em: [[www.ufsm.br/adriano/aulas/qq/pqq.pdf](http://www.ufsm.br/adriano/aulas/qq/pqq.pdf)].
17. Pimentel-Gomes F. Curso de Estatística Experimental. São Paulo: Nobel, 1987.
18. Aily DC, Sato DN, Martins MC, Telles MAS. Isolamento de micobactérias em espécimes clínicos utilizando o sistema automatizado MB/BacT™. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2003; 62(3):233-7.
19. Muricy EC, Lemes RA, Bombarda S, Ferrazoli L, Chimara E. Differentiation between *Nocardia* spp. and *Mycobacterium* spp.: Critical aspects for bacteriological diagnosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2014;56(5):397-401. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652014000500005>].
20. Ueki SYM, Martins MC, Telles MAS, Virgilio MC, Giampaglia CM, Chimara E, et al. Micobactérias não-tuberculosas: diversidade das espécies no estado de São Paulo. *J Bras Patol Med Lab*. 2005;41(1):1-8. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1676-24442005000100003>].

21. Chien HP, Yu MC, Wu MH, Lin TP, Luh KT. Comparison of the BACTEC MGIT 960 with Löwenstein-Jensen medium for recovery of mycobacteria from clinical specimens. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2000;4(9):866-70.
22. Rodrigues C, Shenai S, Sadani M, Sukhadia N, Jani M, Ajbani K, et al. Evaluation of the Bactec MGIT 960TB system for recovery and identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex in a high through put tertiary care centre. *Indian J Med Microbiol*. 2009; 27(3):217-21. [DOI: <http://dx.doi.org/10.4103/0255-0857.53203>].
23. Hanna BA, Ebrahimzadeh A, Elliott LB, Morgan MA, Novak SM, Rusch-Gerdes S et al. Multicenter evaluation of the BACTEC MGIT 960 system for recovery of mycobacteria. *J Clin Microbiol*. 1999;37(3):748-52.
24. Anthony RM, Cobelens FGJ, Gebhard A, Klatser PR, Lumb R, Rusch-Gerdes S et al. Liquid culture for *Mycobacterium tuberculosis*: proceed, but with caution. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2009;13(9):1051-3.
25. Simeão FC, Chimara E, Oliveira RS, Yamauchi JU, Latrilha FO, Telles MAS. Cord factor detection and macroscopic evaluation of mycobacterial colonies: an efficient combined screening test for the presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex on solid media. *J Bras Pneumol*. 2009;35(12):1212-6. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-37132009001200008>].
26. Monteiro PHT, Martins MC, Ueki SYM, Giampaglia CMS, Telles MAS. Cord formation and colony morphology for the presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Braz J Microbiol*. 2003;34(2):171-4. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822003000200016>].
27. Chikamatsu K, Aono A, Yamada H, Sugamoto T, Kato T, Kazumi Y et al. Comparative evaluation of three immunochromatographic identification tests for culture confirmation of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *BMC Infect Dis*. 2014;14:54. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-14-54>].



# Condições higienicossanitárias em serviços de nutrição hospitalar durante período de intervenção

## Hygienic-sanitary conditions in hospital nutrition services during intervention period

RIALA6/1728

Lize STANGARLIN-FIORI<sup>1,2\*</sup>, Laissa Benites MEDEIROS<sup>3</sup>, Ana Lúcia SERAFIM<sup>4</sup>, Vera Lucia PONCHEK<sup>2</sup>, Luisa Helena Rycheki HECKTHEUER<sup>5</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Alimentação e Nutrição, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. Av. Lothário Meissner, 632, Jardim Botânico, Curitiba, PR, Brasil, CEP: 80210-170. Tel: 41 3360 4001. E-mail: lizestangarlin@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidade Positivo, Curitiba, PR, Brasil

<sup>3</sup>Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, Brasil

<sup>4</sup>Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil

<sup>5</sup>Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil

Recebido: 20.06.2017 - Aceito para publicação: 03.11.2017

### RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar as condições higienicossanitárias de serviços de nutrição hospitalar, durante período de intervenção sistemática, baseado nos requisitos de higiene pessoal e ambiental. Foram avaliadas 15 unidades, por meio de lista de verificação e realizou-se análise microbiológica das mãos dos manipuladores e superfícies de apoio, antes e após intervenção. A intervenção foi elaborada e implementada nos serviços de nutrição hospitalar, durante um ano, por profissional terceirizado, sendo composto por três etapas: 1) aplicação da lista de verificação e plano de ação; 2) capacitações; 3) visitas mensais para motivação dos manipuladores e responsáveis técnicos, auxílio e acompanhamento na implementação dos requisitos de higiene pessoal e ambiental. Foram avaliados os microrganismos aeróbios mesófilos, *Staphylococcus aureus*, coliformes totais e termotolerantes. Constatou-se que os serviços de nutrição hospitalar melhoraram as condições de higiene pessoal e ambiental e diminuíram a contaminação nas mãos e superfícies, após intervenção. Conclui-se que a intervenção sistemática por profissional externo auxiliou na adequação das condições higienicossanitárias nos serviços de nutrição hospitalar e proporcionou mudanças positivas no comportamento dos manipuladores.

**Palavras-chave.** desinfecção das mãos, inspeção sanitária, indicadores de qualidade, capacitação profissional.

### ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate the hygienic-sanitary conditions in hospital nutrition services during of systematic intervention period based on requirements for personal and environmental hygiene. Fifteen hospital nutrition services were evaluated using a checklist and a microbiological analysis of the hands of food handlers and surfaces in contact with foods, before and after the intervention. The intervention was developed and conducted at the locations for one year by a third-party professional and included three stages: 1) application of checklist and action plan; 2) trainings; 3) monthly visits for motivation of handlers, supervisory technicians, and assistance and supervision in the implementation of the requirements regarding personal and environmental hygiene. The aerobic mesophilic microorganisms were studied as well as *Staphylococcus aureus*, total coliforms and thermotolerant coliforms. It was found that the personal hygiene and environmental conditions at the hospital nutrition services improved and there was decreased contamination of hands and surfaces after intervention. It was concluded that the systematic intervention by outside professional helped hygienic-sanitary conditions in hospital nutrition services meet the requirements and provide positive changes in the conduct of food handlers.

**Keywords.** hand disinfection, sanitary inspection, quality indicators, professional training.

## INTRODUÇÃO

Nos serviços de nutrição hospitalar, os alimentos são preparados para recuperar e manter a saúde das pessoas. Para alcançar esse objetivo, é essencial o fornecimento de refeições seguras, do ponto de vista higienicossanitário, com intuito de minimizar os riscos de doenças transmitidas por alimentos<sup>1,2</sup>, que podem gerar gastos desnecessários em tratamentos médicos, comprometer o funcionamento dos serviços de nutrição hospitalar e agravar a saúde dos pacientes<sup>3</sup>.

Entre esses requisitos higienicossanitários, a higiene pessoal e ambiental é considerada de elevado risco sanitário<sup>4</sup> e suas adequações no ambiente de manipulação, são essenciais para prevenir a contaminação cruzada, impedindo que as mãos dos manipuladores e as superfícies de apoio sejam veículo de contaminação<sup>2</sup>. Contudo, estudos revelam grande dificuldade enfrentada pelos serviços de nutrição hospitalar durante a aplicação desses procedimentos, atrelados principalmente a falta de investimento, precárias condições de estrutura física, baixos níveis de conhecimento e motivação dos manipuladores de alimentos<sup>1,3</sup>, assim como pelo costume dos responsáveis técnicos com as inconformidades existentes no ambiente de trabalho<sup>5</sup>.

Portanto, a utilização de estratégias de intervenção com auxílio de profissionais externos, visitas periódicas e avaliações constantes para orientar nas adequações dos requisitos higienicossanitários pode ser importante para evitar que vícios de rotina sejam perpetuados, tendo uma avaliação imparcial das inadequações encontradas no ambiente hospitalar<sup>1</sup>.

Sendo assim, o objetivo desse estudo foi avaliar as condições higienicossanitárias de serviços de nutrição hospitalar, durante um período de intervenção, baseado nos requisitos de higiene pessoal e ambiental, para sensibilizar as equipes e proteger os pacientes de qualquer tipo de contaminação a que eles estejam expostos. Além disso, por tratar-se de pesquisa que aborda a realidade de várias unidades hospitalares, pode contribuir no aperfeiçoamento de ações de educação sanitária, planejamento de políticas públicas e programas de capacitação, capazes de minimizar os riscos de contaminação dos alimentos nessas unidades, beneficiando um maior número de locais e indivíduos.

## MATERIAL E MÉTODOS

O estudo seguiu as diretrizes éticas, tendo sido submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil, sob número 187.120. A amostra do estudo foram os hospitais da 4ª Coordenação Regional de Saúde, região central do Rio Grande do Sul, RS. O estudo foi realizado de fevereiro de 2013 a abril de 2014 nos serviços de nutrição hospitalar. Os seguintes itens foram utilizados como critérios de inclusão: a presença de um responsável técnico pelo serviço hospitalar de nutrição e sua disponibilidade em participar do estudo mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Pesquisa da 4ª Coordenação Regional de Saúde mostrou que havia 26 hospitais em 20 cidades. Após os critérios de inclusão, a amostra foi constituída por 15 hospitais do Rio Grande do Sul, RS; do total avaliado, 5 eram públicos, 7 privados e 4 filantrópicos, sendo que 4 serviam cerca de 60 refeições por dia, 5 serviam entre 61 e 150 refeições por dia e 6 serviam mais de 151 refeições por dia. Vale ressaltar que nenhum dos locais avaliados tinha o programa de Boas Práticas implementado antes do estudo.

### Lista de verificação e análise microbiológica

Para avaliação dos requisitos de higiene pessoal e ambiental, elaborou-se uma lista de verificação com base nos critérios de Boas Práticas das legislações de nível federal e do estado do Rio Grande do Sul<sup>6,7</sup>, pelo fato dos hospitais estarem localizados neste estado.

A lista de verificação foi separada em higiene pessoal e higiene ambiental, sendo composta pelos seguintes requisitos: composição (material) e o estado de conservação das superfícies; presença de lavatório exclusivo para higienização das mãos; procedimentos adequados para a higienização das mãos e das superfícies de apoio (ou seja, realizar a limpeza, com sabonete líquido e inodoro, seguida de enxague com água potável; e secar com papel toalha descartável ou outro método seguro; após passar sanitizante/antisséptico, se o sabão não apresentar em sua composição); conduta e comportamento para manipuladores (ou seja, não estavam utilizando

adornos, e suas unhas estavam curtas, limpas e sem esmalte ou base); e a disponibilidade de produtos e utensílios adequados para a higienização (isto é, utilizavam produtos inodoros e específicos para áreas de preparação de alimentos; e os utensílios de limpeza estavam disponíveis em quantidade suficiente, estavam limpos, e em boas condições). A lista de verificação foi aplicada em cada serviço hospitalar de nutrição por profissional qualificado e com experiência na área de alimentos, sendo os requisitos avaliados em “Adequado” e “Inadequado”. As visitas foram planejadas através de contato telefônico com o responsável técnico e ocorreram durante o período em que os alimentos estavam sendo preparados.

Além disso, amostras para análise microbiológica foram coletadas em trinta mãos de manipuladores de alimentos, sendo dois de cada estabelecimento, em quinze superfícies de apoio, utilizando a técnica de *swab*, proposta pelo *Compendium Of Methods For The Microbiological Examination Of Foods*<sup>8</sup>. Os manipuladores de alimentos foram escolhidos aleatoriamente nas diversas áreas de manipulação e turnos de trabalho e, os que estavam disponíveis e que assinaram o TCLE fizeram parte do estudo. As superfícies de apoio escolhidas foram as mais utilizadas durante a manipulação de alimentos em cada serviço de nutrição hospitalar. Avaliou-se a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos, *Staphylococcus aureus* e coliformes totais e termotolerantes.

O método utilizado para análise microbiológica das mãos dos manipuladores de alimentos e superfícies de apoio foi o mesmo para todos os locais. As análises microbiológicas foram realizadas durante a rotina de trabalho, sendo as coletas realizadas após as mãos e bancadas terem sido consideradas higienizadas pelos manipuladores. O procedimento de higienização das mãos e das superfícies foi conduzido pelos manipuladores de alimentos sem interferência do pesquisador.

As análises dos *Staphylococcus aureus* e de coliformes totais e termotolerantes foram comparados com os padrões de Balzaretto e Marzano<sup>9</sup>, Henroid et al<sup>10</sup> e Sneed et al<sup>11</sup>. O limite aceitável de *Staphylococcus aureus* foi estabelecido como

1,0x10<sup>0</sup> UFC/mão para mãos de manipuladores de alimentos e 1,0x10<sup>0</sup> UFC/cm<sup>2</sup> para superfícies de apoio. O limite aceitável para coliformes totais e termotolerantes foi estabelecido como menor que 0,3x10<sup>0</sup> UFC/mão para mãos de manipuladores de alimentos e menor que 0,3x10<sup>0</sup> UFC/cm<sup>2</sup> para superfícies de apoio. Na contagem de microrganismos aeróbios mesófilos, o limite de 5,0x10<sup>1</sup> UFC/cm<sup>2</sup> foi considerado aceitável para superfícies em contato com o alimento<sup>5</sup> e 1,0x10<sup>2</sup> UFC/mão dos manipuladores de alimentos<sup>12</sup>.

### Programa de intervenção sistemático

A intervenção sistemática foi elaborada e implementada em todos os locais, durante um ano, por profissional terceirizado, capacitado, especialista em segurança dos alimentos, sendo composto por três etapas: 1) aplicação da lista de verificação e elaboração do plano de ação, para auxiliar os responsáveis técnicos no planejamento das não conformidades; 2) capacitações, com foco na melhoria do conhecimento dos requisitos de higiene pessoal e ambiental; 3) visitas mensais nos locais para motivação dos manipuladores de alimentos e responsáveis técnicos, acompanhamento e auxílio na implementação dos requisitos de higiene pessoal e ambiental.

A aplicação da lista de verificação e elaboração do plano de ação, em cada local, foi realizada pelos responsáveis técnicos com auxílio do profissional externo. A lista de verificação consistiu na identificação das não conformidades, e o plano de ação na determinação das ações corretivas, bem como definição dos responsáveis por solucionar as não conformidades, avaliação dos investimentos necessários e os prazos para adequação dos itens. Realizaram-se, em cada local, três capacitações, com carga horária de 2 horas teórico/práticas, no início, meio e final do período de intervenção. Estas capacitações ocorreram em salas de aula com, no máximo, vinte manipuladores e foram abordados os seguintes temas: doenças transmitidas por alimentos, contaminação cruzada, asseio pessoal, conduta e comportamento dos manipuladores de alimentos e higienização do ambiente. As visitas mensais foram realizadas pelo profissional externo e teve o objetivo de motivar os manipuladores de alimentos e responsáveis técnicos;

auxiliar na adequação das não conformidades encontradas; orientar na aquisição de materiais e acompanhar a implementação dos requisitos de higiene pessoal e ambiental. Após a estratégia de intervenção, aplicou-se novamente a lista de verificação e realizou-se a análise microbiológica das mãos dos mesmos manipuladores e superfícies de apoio da primeira coleta, utilizando a mesma metodologia descrita anteriormente.

Os resultados obtidos foram avaliados pelo programa *Statistical Analysis System* (SAS), versão 9.2, 2014<sup>13</sup>. Para verificar as diferenças entre as amostras, aplicou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis<sup>13</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Antes da intervenção, o requisito de higiene pessoal apresentou, na média geral, 73%  $\pm$  14 de adequação a higiene ambiental, 90%  $\pm$  11 de adequação. Em relação a higiene ambiental, verifica-se que, antes da intervenção, um dos locais apresentou todos os itens adequados, e sete apresentaram mais de 90% de adequação. Esses resultados demonstram que mesmo sem o programa de Boas Práticas implementado, os locais apresentaram resultados satisfatórios em

relação aos requisitos de higiene pessoal e ambiental.

Contudo, ao avaliar os critérios de maneira isolada, observa-se que, antes da intervenção, nenhum dos locais apresentou 100% de adequação ao cumprimento dos requisitos de higiene pessoal, no qual apresentavam falhas em requisitos básicos de higiene, como ausência de lavatório exclusivo para a higienização das mãos na área de manipulação (n=13); uso de produtos saneantes impróprios para a atividade (n=6); e asseio pessoal, conduta e comportamento inadequado por parte dos manipuladores (n=12), sendo observado o uso de adornos, unhas pintadas e compridas durante a manipulação de alimentos (**Tabela 1**).

Nos requisitos de higiene ambiental (**Tabela 1**), antes da intervenção, 87% (n=13) dos locais estavam em conformidade com a natureza da superfície a ser higienizada, pois eram de aço inoxidável. Em contrapartida, 93% (n=1) deles não realizavam adequadamente os procedimentos de higienização nas superfícies de apoio, sendo observadas falhas na etapa de sanificação, ou por ausência de produtos eficazes ou por realização inadequada do procedimento.

**Tabela 1.** Percentual de adequação dos 15 serviços hospitalares de Nutrição, em relação aos requisitos de higiene pessoal e ambiental que tiveram melhorias, antes e após a intervenção, Rio Grande do Sul, Brasil, 2013-2014

1. Higiene Pessoal	Antes		Após		p-valor
	AD (%)	n	AD (%)	n	
1.1 Lavatório para higienização das mãos	13	2	73	11	0,0003*
1.2 Procedimento de higienização das mãos	80	12	100	15	0,0679
1.3 Asseio pessoal, conduta e comportamento	20	3	93	14	0,0001*
1.4 Produtos saneantes	60	9	73	11	0,4386
2. Higiene ambiental	Antes		Após		p-valor
	AD (%)	n	AD (%)	n	
2.1 Natureza da superfície a ser higienizada	87	13	93	14	0,0574
2.2 Procedimento de higienização das superfícies	7	1	80	12	0,0001*
2.3 Produtos saneantes	67	10	80	12	0,4090
2.4 Utensílios de higienização	27	4	47	7	0,2557

Legenda: AD: adequação; %: Percentual; n.: amostra do estudo; p.: teste t para amostras independentes ( $p < 0,05$ ); \*: valores significativos

Após a intervenção, 73% (n=11) dos locais melhoraram em relação à higiene pessoal e 53% (n=8) em relação à higiene ambiental; no entanto, houve diferença significativa ( $p<0,05$ ), na média geral, apenas nos itens de higiene pessoal. Tal resultado justifica-se principalmente pelo aprimoramento dos procedimentos realizados, maior padronização nos métodos de higienização e diminuição do desperdício de material, o qual foi relatado pelos responsáveis técnicos dos serviços de nutrição hospitalar. O que evidencia que a intervenção com profissional externo, as capacitações e as melhorias realizadas foram importantes e auxiliaram na adequação dos requisitos de higiene, proporcionando mudanças positivas em relação aos hábitos dos manipuladores de alimentos.

Os requisitos de higiene pessoal e ambiental que apresentaram melhorias significativas ( $p<0,05$ ) após intervenção foram: os lavatórios para higienização das mãos; asseio pessoal, conduta e comportamento; e procedimento de higienização das superfícies em contato com os alimentos (**Tabela 1**). Esses resultados estão atrelados ao maior investimento realizados pelos hospitais, o que proporcionou melhorias na estrutura física e nos produtos destinados a higiene pessoal e ambiental, assim como no aperfeiçoamento das técnicas e comportamento dos manipuladores de alimentos.

A contagem de microrganismos aeróbios mesófilos nas mãos dos manipuladores e superfície de apoio, antes e após intervenção sistemática, encontra-se na **Tabela 2**. Antes da intervenção, 90% (n=27) das mãos dos manipuladores e 53% (n=8) das superfícies em contato com os alimentos, estavam acima do limite estabelecido para a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos, que foi considerado de  $1,0 \times 10^2$  UFC/mão e  $5,0 \times 10^1$  UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente. Os manipuladores de alimentos apresentaram valores de microrganismos aeróbios mesófilos de até  $10^7$  UFC/mão, enquanto que as superfícies de apoio até  $10^4$  UFC/cm<sup>2</sup>. Considerando o fato de que as mãos e as superfícies já tinham sido consideradas higienizadas, esses resultados revelam que as técnicas e/ou produtos eram ineficientes, e pode tornar as mãos e as superfícies fonte potencial de contaminação nos serviços de nutrição hospitalar avaliados.

Após a intervenção sistemática, houve diminuição na contagem de microrganismos aeróbios mesófilos em 80% (n=24) das mãos dos manipuladores e 86% (n=13) das superfícies em contato com os alimentos (**Tabela 2**). O que revela que os procedimentos de higienização das mãos e superfícies de apoio foram mais eficazes após a intervenção, assim como demonstrado na segunda aplicação da lista de verificação (**Tabela 1**). Apesar das melhorias obtidas após intervenção, 43% (n=13) das mãos dos manipuladores e 6% (n=1) das superfícies de apoio ainda permaneceram com a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos acima dos limites estabelecidos (**Tabela 2**). O que reforça a importância da utilização de intervenções contínuas e supervisão permanente, quanto aos requisitos higienicossanitárias, para que os mesmos se tornem hábitos.

Na avaliação de *Staphylococcus aureus* nas mãos de manipuladores e nas superfícies de apoio, todas as amostras estavam dentro dos limites aceitáveis, antes e após a intervenção, que é inferior a  $1,0 \times 10^0$  UFC/mão para mãos de manipuladores de alimentos e  $1,0 \times 10^0$  UFC/cm<sup>2</sup> para superfícies de apoio<sup>9,10,11</sup>, o que é satisfatório, pois sua presença no ambiente de manipulação é bastante comum, uma vez que seu reservatório primário é a microflora natural da pele humana e, portanto, mais suscetível a contaminar alimentos por contato humano direto ou indireto durante as etapas de preparação dos alimentos.

Antes da intervenção, 87% (n=26) e 97% (n=29) das amostras estavam dentro de limites aceitáveis para coliformes totais e termotolerantes, respectivamente, enquanto que, após a intervenção, todas as amostras estavam dentro dos limites aceitáveis. Na análise de coliformes totais e termotolerantes nas superfícies de apoio, verificou-se que todas as amostras estavam dentro dos limites aceitáveis, que é menor que  $0,3 \times 10^0$  UFC/cm<sup>10,11</sup>, antes e após a intervenção.

As bactérias aeróbias mesófilas, coliformes e *Staphylococcus aureus*, por serem microrganismos indicadores<sup>14</sup>, podem ser utilizados como ferramenta importante para monitorar os procedimentos realizados durante a manipulação, higienização de equipamentos e utensílios, e na higiene pessoal em serviços de nutrição hospitalar, contribuindo para a qualidade higienicossanitária dos alimentos.

**Tabela 2.** Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos nas mãos de dois manipuladores e uma superfície de apoio de 15 serviços hospitalares de nutrição, antes e após intervenção sistemática, Rio Grande do Sul, Brasil, 2013-2014

Serviços hospitalares de nutrição	Antes intervenção		Após intervenção	
	Mãos (UFC/Mão)	Superfície (UFC/cm <sup>2</sup> )	Mãos (UFC/Mão)	Superfície (UFC/cm <sup>2</sup> )
1	4,1x10 <sup>4</sup>	7,9x10 <sup>0</sup>	1,5x10 <sup>0</sup>	0
	1,2x10 <sup>3</sup>		3,0x10 <sup>2</sup>	
2	3,9x10 <sup>2</sup>	1,1x10 <sup>3</sup>	4,0x10 <sup>2</sup>	0,5x10 <sup>0</sup>
	6,3x10 <sup>2</sup>		7,0x10 <sup>2</sup>	
3	1,9x10 <sup>3</sup>	0,7x10 <sup>0</sup>	9,0x10 <sup>0</sup>	0,8x10 <sup>0</sup>
	5,4x10 <sup>4</sup>		3,0x10 <sup>3</sup>	
4	2,1x10 <sup>3</sup>	0,3x10 <sup>0</sup>	0,3x10 <sup>0</sup>	0
	2,8x10 <sup>2</sup>		2,0x10 <sup>1</sup>	
5	4,8x10 <sup>4</sup>	5,4x10 <sup>4</sup>	0,8x10 <sup>0</sup>	1,5x10 <sup>1</sup>
	1,2x10 <sup>3</sup>		2,0x10 <sup>1</sup>	
6	5,4x10 <sup>1</sup>	1,0x10 <sup>3</sup>	7,0x10 <sup>1</sup>	3,8x10 <sup>2</sup>
	7,2x10 <sup>2</sup>		0,8x10 <sup>0</sup>	
7	3,6x10 <sup>5</sup>	2,9x10 <sup>3</sup>	0,6x10 <sup>0</sup>	1,0x10 <sup>1</sup>
	4,6x10 <sup>3</sup>		1,5x10 <sup>1</sup>	
8	4,6x10 <sup>5</sup>	3,2x10 <sup>2</sup>	3,5x10 <sup>3</sup>	4,0x10 <sup>0</sup>
	3,6x10 <sup>5</sup>		2,5x10 <sup>2</sup>	
9	2,3x10 <sup>7</sup>	1,1x10 <sup>3</sup>	2,3x10 <sup>3</sup>	2,0x10 <sup>0</sup>
	4,3x10 <sup>5</sup>		3,0x10 <sup>3</sup>	
10	1,3x10 <sup>3</sup>	3,0x10 <sup>0</sup>	1,0x10 <sup>1</sup>	0
	9,0x10 <sup>3</sup>		1,3x10 <sup>1</sup>	
11	2,4x10 <sup>0</sup>	7,9x10 <sup>0</sup>	3,0x10 <sup>0</sup>	0
	5,4x10 <sup>1</sup>		6,0x10 <sup>1</sup>	
12	2,7x10 <sup>2</sup>	0,3x10 <sup>0</sup>	5,0x10 <sup>1</sup>	0
	3,0x10 <sup>2</sup>		3,5x10 <sup>2</sup>	
13	1,3x10 <sup>6</sup>	9,0x10 <sup>1</sup>	5,4x10 <sup>3</sup>	4,0x10 <sup>1</sup>
	3,6x10 <sup>5</sup>		2,3x10 <sup>3</sup>	
14	2,3x10 <sup>7</sup>	2,0x10 <sup>0</sup>	1,2x10 <sup>4</sup>	2,0x10 <sup>0</sup>
	1,3x10 <sup>6</sup>		3,7x10 <sup>2</sup>	
15	4,6x10 <sup>3</sup>	9,0x10 <sup>1</sup>	2,0x10 <sup>1</sup>	5,0x10 <sup>1</sup>
	4,3x10 <sup>2</sup>		3,5x10 <sup>1</sup>	



## CONCLUSÃO

A intervenção sistemática, baseada nos requisitos de higiene pessoal e ambiental, auxiliou na melhoria das condições higienicossanitárias nos serviços de nutrição hospitalar, assim como proporcionou mudanças positivas em relação aos hábitos dos manipuladores de alimentos. O que demonstra ser uma alternativa viável e que pode ser aplicada de maneira periódica em serviços de nutrição hospitalar, para auxiliar na melhoria da qualidade da higiene, por meio da implementação das Boas Práticas.

## REFERÊNCIAS

1. Stangarlin L, Hecktheuer LH, Serafim AL, Medeiros LB. Evaluation of hygienic-sanitary conditions of hospital nutrition and dietary services from the perspectives of internal and external auditors. *Food Sci Technol*. 2013;33(3):521-5. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612013005000058>].
2. World Health Organization. Improving nutrition outcomes with better water, sanitation and hygiene: practical solutions for policies and programmes. Geneva, Switzerland; 2015. Disponível em: [[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/publications/washandnutrition/en/](http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/washandnutrition/en/)].
3. Lund BM, O'Brien SJ. Microbiological safety of food in hospitals and other healthcare settings. *J Hosp Infect*. 2009;73(2):109-20. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2009.05.017>].
4. World Health Organization. Five Keys to Safer Food Manual. Geneva, Switzerland; 2006. Disponível em: [<http://www.who.int/foodsafety/publications/5keysmanual/en/>].
5. Serafim AL, Hecktheuer LH, Stangarlin-Fiori L, Medeiros LB, Martello L, Machado CE. Evaluation of the implementation of good handling practices in food and beverage areas of hotels. *J Food Prot*. 2015;78(11):2043-51. [DOI: <https://dx.doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-144>].
6. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. 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. p25-8.
7. Rio Grande do Sul. Secretaria da Saúde. Portaria nº 78, de 30 de janeiro de 2009. Aprova a Lista de Verificação em Boas Práticas para Serviços de Alimentação, aprova Normas para Cursos de Capacitação em Boas Práticas para Serviços de Alimentação e dá outras providências. *Diário Oficial [do] Estado do Rio Grande do Sul*. Porto Alegre, RS, 30 jan. 2009. Disponível em: [[http://www.tramandai.rs.gov.br/download/portaria\\_estadual\\_078\\_2009.pdf](http://www.tramandai.rs.gov.br/download/portaria_estadual_078_2009.pdf)].
8. Vanderzant C, Splittstoesser F. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4<sup>th</sup> ed. Washington (DC): APHA; 2001.
9. Balzaretta CM, Marzano MA. Prevention of travel-related foodborne diseases: Microbiological risk assessment of food handlers and ready-to-eat foods in northern Italy airport restaurants. *Food Control*. 2013;29(1):202-7. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.077>].
10. Henroid Jr DH, Mendonca AF, Sneed J. Microbiological evaluation of food contact surfaces in Iowa schools. *Food Prot Trends*. 2004;24(9):682-5.
11. Sneed J, Strohbahn C, Gilmore SA, Mendonca A. Microbiological evaluation of foodservice contact surfaces in Iowa assisted-living facilities. *J Am Diet Assoc*. 2004;104(11):1722-4. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jada.2004.08.026>].
12. Lambrechts AA, Human IS, Doughari JH, Lues JF. Bacterial contamination of the hands of food handlers as indicator of hand washing efficacy in some convenient food industries in South Africa. *Pak J Med Sci*. 2014;30(4):755-8.
13. Lopes LF, Müller I, Souza AM, Ansuaj AP, Moraes DAO, Moreira Junior FJ et al. *Cadernos didáticos: estatística geral*. 3<sup>a</sup> ed. Santa Maria (RS): CCNE; 2008, 209p.
14. Medeiros MG, Carvalho LR, Franco RM. Percepção sobre a higiene dos manipuladores de alimentos e perfil microbiológico em restaurante universitário. *Ciênc Saúde Colet*. 2017;22(2):383-92. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1413-81232017222.17282015>].



# O círculo vicioso da negligência da leptospirose no Brasil

## The vicious circle of the leptospirosis negligence in Brazil

RIALA6/1729

Cláudio Manuel RODRIGUES\*

\*Endereço para correspondência: Centro de Desenvolvimento Tecnológico em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4036, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, CEP: 21040-361. Tel: 21 3882 9234. E-mail: cmrodrigues@cdfs.fiocruz.br

Recebido: 03.05.2017 - Aceito para publicação: 25.11.2017

### RESUMO

A leptospirose é uma das zoonoses de maior incidência mundial, estimando-se que ocorram em torno de um milhão de casos e, possivelmente, 59.000 óbitos anualmente. Foi proposto um modelo lógico que avaliasse os aspectos que permeiam o tema, por meio de revisão narrativa da literatura indexada e de manuais técnicos, que despertassem a ideia da negligência para esta doença no Brasil. Ao fomentar uma nova abordagem paradigmática, procurou-se refletir a dificuldade em se realizar um diagnóstico mais atilado e precoce, em colaboração a um processo de naturalização da subnotificação pelos que organizam, gerenciam e operam o Sistema de Saúde, e que influenciam negativamente no investimento na gestão da vigilância e controle da doença no país, tornando-se possível a manutenção do círculo vicioso para a negligência da leptospirose no Brasil.

**Palavras-chave.** leptospirose, sistemas de informação em saúde, doenças negligenciadas, diagnóstico precoce.

### ABSTRACT

Leptospirosis is one of the most widespread and incident zoonosis in the world, estimated to occur around one million cases and possibly 59,000 deaths annually. A logical model to evaluate the aspects that permeate the theme through the narrative review of indexed literature and technical manuals, it was proposed to awaken the idea of the neglect of this disease in Brazil. By fostering a new paradigm approach, it was considered the difficulty in performing a more sagacious and early diagnosis. This condition contributes to a process of naturalization of underreporting by those who organize, manage and operate the health system. And, directly it causes negative impact on the investment for managing the disease surveillance and control in the country, making it possible to maintain a vicious circle for neglecting leptospirosis in Brazil.

**Keywords.** leptospirosis, health information systems, neglected diseases, early diagnosis.

## INTRODUÇÃO

A leptospirose é reconhecidamente um dos mais importantes problemas de saúde pública, estando a endemicidade da doença concentrada nas áreas mais quentes e úmidas do planeta, mais precisamente no Caribe, Américas Central e do Sul, além do sudeste asiático e Oceania<sup>1</sup>. Considerada emergente no continente europeu, está indicada em estudo da OMS como uma das doenças passíveis de serem incorporadas à lista de zoonoses negligenciadas<sup>2,3</sup>. Em recente e importante revisão sistemática a respeito da temática, Costa et al<sup>4</sup> estimaram em 1,03 milhões de casos e, aproximadamente, 59.000 óbitos por leptospirose em todo o planeta a cada ano, correspondendo ou extrapolando os valores atribuídos a outras causas de febre hemorrágica investigadas em 2010 pelo *Global Burden of Disease*.

A taxa de mortalidade para a doença varia entre países, estando calculada na faixa de cinco a 40%, conforme literatura científica consultada. No Brasil, o Ministério da Saúde estima em torno de 10% os casos mais graves que chegam a óbito, porém a realidade parece ser mais dura para com o suspeito de ter contraído a leptospirose, chegando a 50% de taxa de mortalidade no caso de grave hemorragia pulmonar associada<sup>5,6</sup>.

Ainda é considerado um desafio conhecer a magnitude da doença, sendo necessário apurar sua real incidência e carga global, pois se relaciona à baixa notificação para a leptospirose não epidêmica, a falta de um diagnóstico mais rápido e preciso ainda na Atenção Primária e ao processo infeccioso agudo ser de difícil percepção clínica, muitas vezes confundido com viroses tropicais<sup>6,7</sup>. Schneider et al<sup>2</sup> afirmam que a leptospirose é tipicamente subdiagnosticada e, por consequência, subnotificada. Como a sintomatologia é vasta, variando de uma síndrome gripal a uma grave hemorragia pulmonar, com agudização rápida do quadro clínico e óbito subsequente, diferenciá-la de outras morbidades de diagnóstico nosológico similar, como dengue, malária e influenza, torna-se uma missão muito árdua para a assistência em saúde<sup>7-9</sup>.

O número de casos da doença no Brasil permite que se considere um status de doença negligenciada, já que sua espacialidade e tempo-

ralidade são conhecidas e há uma recorrência anual. Entretanto, o reconhecimento da leptospirose como doença negligenciada ocorre no meio acadêmico e no senso comum, mas não nos documentos oficiais do governo brasileiro. Sendo assim, o acesso aos editais de financiamento de pesquisas voltados às doenças negligenciadas no Brasil não a contemplam, uma vez que a leptospirose não se encontra na lista de prioridades do Ministério da Saúde, o que a torna uma doença duplamente esquecida no Brasil<sup>10,11</sup>.

O objetivo deste artigo é identificar as discrepâncias entre o que se discute cientificamente quanto à leptospirose e o discurso oficial do Ministério da Saúde, além das respectivas ações propostas para notificação, prevenção, diagnóstico e controle da doença no Brasil.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para a avaliação circunstanciada da negligência para com a informação da leptospirose no Brasil, é proposto um modelo lógico (**Figura 1**), composto por quatro pontos que, a nosso ver, são a chave para uma nova abordagem da leptospirose como um problema de saúde pública nacional e estão listados a seguir:

- i) Falha de diagnóstico, diagnóstico tardio ou subdiagnóstico;
- ii) Subnotificação;
- iii) Desconhecimento da real incidência e carga global e;
- iv) Falta de investimento na gestão da vigilância e no controle da leptospirose.

A revisão narrativa da literatura foi realizada com base nas publicações científicas em formato de artigos, capítulos de livro, resumos de eventos, anais, textos em jornais e/ou revistas científicas. Para tal, se utilizaram de bases de dados disponibilizadas pelas bibliotecas e repositórios digitais Arca Fiocruz, Bireme/BVS, BVS, PubMed, Portal de Periódicos do CAPES e SciELO Saúde Pública, acessados através da Biblioteca de Saúde Pública da Fiocruz, assim como outras bases de dados não indexados, caso do Google Acadêmico, visto ser este também uma rica fonte da literatura cinzenta<sup>12</sup>.



**Figura 1.** Matriz do círculo vicioso da negligência da leptospirose no Brasil

Com objetivo de reconhecer a abrangência do assunto a ser estudado, inicialmente foi realizada uma busca simples - *default* - nos repositórios e sítios eletrônicos acima mencionados, entre as datas e 25 e 31 de março de 2015, na qual foram encontrados textos, documentos e publicações a respeito do conhecimento técnico e científico acerca da leptospirose. Inicialmente, foram utilizadas as palavras-chave na língua nativa e seu correspondente na língua inglesa e, posteriormente, as possíveis combinações associando o termo booleano *AND*. O objetivo foi reconhecer as fontes de dados indexados que poderiam ser importantes ao estudo, assim como entender a dimensão do assunto a ser tratado, entretanto sem qualquer preocupação em analisar a qualidade e a força de citação, comum aos estudos bibliométricos<sup>13</sup>, através de filtros de busca comuns aos repositórios e bases bibliográficas eletrônicas.

Em uma segunda etapa foram analisados o título e o resumo dos artigos e demais documentos indexados, sendo selecionados aqueles que configuravam estreita relação com os quatro pontos do modelo lógico proposto.

Na terceira etapa, a relevância da produção acadêmica foi avaliada pelo número de citações que apresentavam e disponibilizada em ordem decrescente, sendo este o principal fator de

definição para a seleção de determinado artigo ou documento, em detrimento de outros que versassem sobre temáticas similares, independente do ano da publicação. Por conveniência, foi estipulado um limite máximo de 15 artigos ou documentos outros, a serem considerados para o estudo em cada base de dados e em cada língua. A **Figura 2** sintetiza os resultados desta busca ampliada em bancos de dados indexados.

DESCRITOR DE ASSUNTO	TESES	ARCA	BIREME	BVS	PUBMED	CAPES	SCIELO
Leptospirose	32	91	6462	6286	0	655	10
Leptospirosis	19	52	6462	6286	8687	4272	25
Leptospirose AND Diagnóstico	3	20	2	4	0	137	0
Leptospirosis AND Diagnosis	0	11	2	4	4193	841	2
Leptospirose AND Vigilância	3	18	2	1	0	22	2
Leptospirosis AND Surveillance	0	5	0	0	2991	81	0
Leptospirose AND Assistência à Saúde	0	43	0	0	0	9	0
Leptospirosis AND Delivery of Health Care	0	8	0	0	39	0	0
Leptospirose AND Gestão em Saúde	0	56	0	0	0	3	0
Leptospirosis AND Health Management	0	0	0	0	79	27	0
Leptospirose AND Veterinária	0	6	35	25	0	98	0
Leptospirosis AND Veterinary	0	0	0	0	2304	601	0

Fonte: Biblioteca Fiocruz

**Figura 2.** Busca de termos por bibliotecas e repositórios eletrônicos

Ao término deste processo de busca sistematizada, foram incorporados 72 documentos indexados, com acesso total ao seu conteúdo que, associados a dois manuais técnicos do Ministério da Saúde e seis da Organização Mundial de Saúde, além de duas entrevistas a revistas de divulgação da ciência e *sites* eletrônicos da Fundação Oswaldo Cruz e material disponibilizado pelos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina, se tornaram o arcabouço teórico para discussão do modelo lógico proposto para a negligência da leptospirose no Brasil.

Tratou-se de organizar o material coletado, relacionando a área do conhecimento referente à leptospirose com as seguintes temáticas: Epidemiologia; Diagnóstico Rápido; Diagnóstico Laboratorial; Vigilância em Saúde; Sistema de Informação em Saúde; e Incidência e Carga Global da Doença. Todos os artigos e demais documentos selecionados foram arquivados eletronicamente em pastas do *software* gerenciador de citações *Zotero* versão 4.0 para *Windows*, utilizando-se do conceito de *cloud computing*<sup>14</sup>.

## RESULTADOS

Através de revisão de literatura, foi apurado o que atualmente se disponibiliza no meio acadêmico quanto ao diagnóstico, tratamento e vigilância da leptospirose, assim como a representação do discurso oficial adotado pelo Ministério da Saúde, através dos manuais técnicos de manejo clínico e vigilância da doença, que repercutem como ações propostas de gestão, inclusive com a possibilidade de incorporação de tecnologias diversas pelo Sistema Único de Saúde.

Os resultados encontrados (**Tabela**) foram organizados em quatro grupos, de acordo com o proposto na Matriz do Círculo Vicioso da Negligência da Leptospirose no Brasil, para facilitar o entendimento do discurso oficial.

Na coluna *Resultados*, estão as premissas dispostas na literatura revisada, tendo como referências aquelas citadas na coluna *Publicação*. No item *Falha de diagnóstico, diagnóstico tardio e subdiagnóstico*, foram encontradas seis premissas em três referências documentais. Já no item *Subnotificação*, duas premissas estão dispostas em dois documentos selecionados. No que diz respeito ao *Desconhecimento da real incidência e da carga global*, quatro premissas estão dispostas em quatro publicações previamente selecionadas. Por fim, no item *Falta de investimento na gestão da vigilância e do controle da leptospirose*, sete premissas foram disponibilizadas com base em quatro documentos selecionados.

## DISCUSSÃO

Sendo a leptospirose uma das zoonoses de maior incidência global, porém com expressiva falta de dados que subsidiem o não reconhecimento da real incidência e carga da doença no Brasil, observamos ser oportuno acrescentar à tríade de falhas que classicamente compõem a negligência em saúde (falha da ciência, falha do mercado e falha da saúde) a negligência para com a informação, pois sem a realidade dos dados não seria possível produzir saúde de forma universal, equânime e integral, conforme descrito em preceitos constitucionais brasileiros<sup>15-18</sup>.

Sob o ponto de vista ético, deveríamos

tratá-la como uma doença negligenciada, que poderia ter seus efeitos deletérios mitigados pelo uso de medidas saneadoras do meio ambiente, atividades de educação para a saúde e garantia de acesso ao diagnóstico rápido, de acurácia comprovada e realizado em tempo oportuno, ainda na Atenção Primária<sup>4,19,20</sup>.

Rajeev et al<sup>21</sup> apresentam a leptospirose como uma doença tratável se diagnosticada precocemente; no entanto, o diagnóstico preciso é um desafio devido à diversidade de apresentações clínicas da doença, à falta de consciência do risco pelo paciente e à frágil suspeita clínica durante sua fase precoce pelos profissionais de saúde, além do limitado potencial para um diagnóstico rápido e preciso pelas unidades básicas de saúde.

Ribeiro<sup>6</sup> indica que o subdiagnóstico da doença se deve às características inespecíficas em sua fase inicial, com sintomas como febre, dor de cabeça e dores musculares. Em torno de 90% dos casos há resolução espontânea e raramente ocorre diagnóstico. Os 10% restantes evoluem para formas graves e podem apresentar icterícia, insuficiência renal e sangramentos. A confirmação da infecção é feita a partir da exclusão da possibilidade de outras doenças e da análise do histórico de exposição do paciente à água contaminada e do contato com animais possivelmente infectados, sempre contando com a memória de eventos relacionados aos períodos chuvosos ou de inundação<sup>7</sup>.

O ser humano costuma responder à infecção por *Leptospira* muito tardiamente, produzindo anticorpos entre o sétimo e o décimo dia de infecção, quando estes passam a serem detectáveis pelas técnicas *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA-IgM) e Teste de Aglutinação Microscópica (MAT, na língua inglesa). Em tese, haveria negligência da gestão do Sistema de Saúde por não oferecer um diagnóstico mais precoce, o que poderia fomentar o não tratamento ou, ao menos, um manejo clínico inadequado de pacientes insuspeitos ou, ainda, um manejo equivocado de quadros mórbidos com sintomas similares à leptospirose. Em alguns casos mais críticos, a antibioticoterapia instituída para tratamento da leptospirose pode agravar o quadro de saúde dos pacientes erroneamente diagnosticados<sup>6-8</sup>.

**Tabela.** Resultados encontrados e suas respectivas publicações de referência

Falhas e negligências em saúde	Resultados	Publicação
Falha de diagnóstico, diagnóstico tardio e subdiagnóstico	<ul style="list-style-type: none"> <li>A cultura somente se finaliza (positiva ou negativa) após algumas semanas, o que garante apenas um diagnóstico retrospectivo.</li> <li>Pelas dificuldades inerentes à realização dos exames anteriormente citados, os métodos sorológicos são consagradamente eleitos para o diagnóstico da leptospirose.</li> </ul>	BRASIL <sup>7</sup>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>A fase precoce da doença é caracterizada pela instalação abrupta de febre, comumente acompanhada de cefaleia e mialgia e, frequentemente, não pode ser diferenciada de outras causas de doenças febris agudas.</li> <li>Embora a fase precoce da doença corresponda de 85 a 90% das formas clínicas, a minoria dos casos são identificados e, conseqüentemente, notificados nesta fase da doença devido às dificuldades inerentes ao diagnóstico clínico e à confirmação laboratorial.</li> </ul>	Albuquerque Filho et al <sup>8</sup>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>O padrão-ouro para o diagnóstico de leptospirose é o teste da microaglutinação e para sua realização é mandatório a coleta de soro convalescente. Já o resultado da sorologia para leptospirose pelo método ELISA-IgM geralmente está disponível dentro de uma semana após o envio da amostra de soro.</li> <li>O subdiagnóstico da doença se deve às características inespecíficas em sua fase inicial.</li> </ul>	Ribeiro <sup>6</sup>
Subnotificação	<ul style="list-style-type: none"> <li>A leptospirose é uma doença subnotificada em razão da falta de suspeita clínica e baixa capacidade de diagnóstico. Em geral, é difícil, mesmo para um médico bem treinado, reconhecer um caso de leptospirose em sua forma inicial leve apenas pela apresentação clínica.</li> </ul>	Vieira Lima <sup>9</sup>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Os casos notificados podem estar aquém da realidade do território estudado, visto a falta de confirmação laboratorial. Também é avaliado que a conduta médica exigida pela forma clínica que se apresenta a doença pode levar à negligência do correto diagnóstico da leptospirose pelo profissional de saúde.</li> </ul>	Castro et al <sup>10</sup>
Óbitos evitáveis	<ul style="list-style-type: none"> <li>A leptospirose poderá ser autolimitante com regressão da sintomatologia entre três e sete dias. Há cura clínica e ausência de sequelas, o que muitas vezes se confunde com uma síndrome gripal.</li> <li>Em aproximadamente 15% dos pacientes com leptospirose, ocorre a evolução para manifestações clínicas graves, que tipicamente iniciam-se após a primeira semana de doença, mas que pode ocorrer mais cedo, especialmente em pacientes com apresentações fulminantes.</li> <li>A síndrome de hemorragia pulmonar é caracterizada por lesão pulmonar aguda e sangramento pulmonar maciço e vem sendo cada vez mais reconhecida no Brasil como uma manifestação distinta e importante da leptospirose na fase tardia.</li> </ul>	BRASIL <sup>7</sup>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Para a resolução desses antigos problemas é necessário definir prioridades no setor saúde, mostrando a importância da introdução de medidas que visem à prevenção da mortalidade prematura para leptospirose (...) mesmo que essas medidas ultrapassem a esfera de ação do setor saúde.</li> </ul>	Souza et al <sup>26</sup>

Continua

Continuação		
<b>Desconhecimento da real incidência e da carga global</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>A real incidência das formas leves da leptospirose no país é desconhecida por causa do subdiagnóstico.</li> </ul>	Ribeiro <sup>6</sup>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>A incidência real de leptospirose reflete a disponibilidade de diagnóstico laboratorial e a sensibilidade para a suspeita clínica pelos profissionais de saúde.</li> </ul>	Musso e La Scola <sup>22</sup>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>A carga global da doença é mal compreendida devido, principalmente, à falta de instalações laboratoriais necessárias ao diagnóstico da fase aguda da leptospirose em países endêmicos, sendo necessário o desenvolvimento de novas tecnologias diagnósticas mais sensíveis e específicas para os casos agudos da doença.</li> </ul>	Musso et al <sup>33</sup>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Os dados existentes sobre a incidência de leptospirose e de sequelas da doença são limitados, mas sugerem que a África, o Pacífico Ocidental, e as Américas têm o maior peso da doença e menor disponibilidade de recursos econômicos, estando associados a uma maior carga da doença.</li> </ul>	WHO <sup>35</sup>
<b>Falta de investimento na gestão da vigilância e do controle da leptospirose</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Lacunas do conhecimento científico e a necessidade de produzir mais e melhores dados para desenvolvimento de estratégias mais eficazes para controle e prevenção da leptospirose são destacadas em diversos artigos e documentos disponibilizados em repositórios.</li> </ul>	Corbellini et al <sup>30</sup>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Perpetuação da pobreza.</li> </ul>	Figueiredo et al <sup>31</sup>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Falta de informação e sensibilização de profissionais de saúde e gestores sobre a extensão do problema.</li> </ul>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ausência de ferramentas de diagnóstico adequadas e de estratégias sustentáveis de prevenção e controle das doenças.</li> </ul>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Falsa percepção de que a carga da doença e o impacto social sejam baixos e não atraiam recursos para a saúde ou para a investigação necessária ao seu controle, o que efetivamente as coloca na categoria de doenças zoonóticas negligenciadas (NZDs).</li> </ul>	Serafini et al <sup>32</sup>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Intervenção que requer uma ação coordenada entre a saúde humana e animal, além de outros setores que se mostrem relevantes.</li> </ul>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Necessidade de partilhar responsabilidades e coordenar as atividades para enfrentar os riscos à saúde na interface humana-animal-ambiente.</li> </ul>	WHO <sup>36</sup>

Corroborando com os aspectos anteriormente descritos, o estudo de Costa et al<sup>4</sup> fornece aos gestores da Saúde, os verdadeiros tomadores de decisão, evidências científicas suficientes para implementação de políticas efetivas quanto à doença. Conforme observado pelos autores, a falta de um teste de diagnóstico adequado continua a ser a principal barreira para mitigar os danos à população menos favorecida e epidemiologicamente bem descrita.

A demanda por diagnósticos aprimorados seria maior do que a indicada pelos casos estimados, uma vez que esses cálculos refletem somente a carga referente a leptospirose considerada grave, aquela enxergada pelo Sistema de Saúde por necessidade de internação e cuidados hospitalares aos portadores da moléstia, representando um limite inferior quando comparado ao número real de casos<sup>4</sup>.

Fora das áreas endêmicas ou em que ocorreram inundações, os médicos e demais profissionais de saúde envolvidos na Assistência à Saúde frequentemente não pensam em leptospirose como uma hipótese diagnóstica plausível<sup>2,6,22</sup>. Além disto, o próprio discurso oficial identifica como uma das causas da falta de diagnóstico em tempo oportuno, a complexidade operacional das técnicas preconizadas para se realizar os procedimentos laboratoriais ainda na fase leptospirêmica da doença<sup>7</sup>.

Assim sendo, afirmações referentes ao diagnóstico tardio e ao subdiagnóstico da leptospirose se fazem presentes no discurso oficial do próprio Ministério da Saúde, instituição organizadora do sistema de saúde brasileiro. Seria possível ofertar um diagnóstico precoce, se utilizadas tecnologias de acurácia comprovadas e miniaturizadas o suficiente para que pudessem ser realizadas à beira do leito, e que cumprissem com o papel hoje exclusivo do aparato laboratorial oficial, centralizado nos LACENs estaduais<sup>5,7,23,24</sup>.

De outra feita, a utilização de ferramentas pautadas em algoritmos diagnósticos clínicos validados para a leptospirose, assim como sua inserção a outras abordagens sindrômicas para vigilância de doenças febris agudas, caso das arboviroses, da febre maculosa brasileira e das hepatites virais, poderia ser de grande valia para a resolução diagnóstica e oferta de melhor prognóstico aos pacientes acometidos<sup>8</sup>.

Em não havendo qualquer diagnóstico na fase precoce, seja este clínico ou laboratorial, a doença se mantém em curso, podendo agravar o quadro do paciente. Na hipótese por nós perscrutada, a impossibilidade de notificação oportuna da doença pelos serviços locais de Vigilância em Saúde atrasaria a investigação ambiental e epidemiológica do caso suspeito, o que permitiria a manutenção de áreas de risco sem uma intervenção necessária e a presença de reservatórios animais em contato com população exposta<sup>6,21,25</sup>.

Quando na forma tardia, a leptospirose tem maior chance de agravamento do quadro clínico. Estima-se que 15% dos pacientes evoluem para quadros mais graves, caso da insuficiência renal aguda, o que exige maior atenção da assistência em saúde. Em média, 10% dos casos diagnosticados nesta fase vão a óbito, podendo chegar a taxas

de 50% quando associada à hemorragia pulmonar aguda<sup>6,7</sup>. Desta feita, há um mecanismo de notificação compulsória aos hierarquizados Sistemas de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) e sobre Mortalidade (SIM), ambos robustos e bem estabelecidos quanto a capilaridade no território nacional, parecem sugerir subnotificação para casos de leptospirose considerados leves ou que se confundem com outras patologias febris agudas, assim como para crescer ao SIM, óbitos por causas outras que não a leptospirose<sup>9,26,27</sup>. A falta de um diagnóstico mais cuidadoso e oportuno para a leptospirose pode levar a erros na classificação de doenças (CID-10) de pacientes suspeitos de terem contraído alguma das doenças febris agudas – caso da dengue, hepatite viral, hantavirose, febre maculosa e sepsis – seja por dificuldades na coleta ou no transporte de amostras em tempo oportuno para o laboratório de referência, seja por dificuldade de diagnóstico diferencial em períodos de franca epidemia de arboviroses, por exemplo, em que os serviços de assistência e de vigilância em Saúde ficam sobrecarregados<sup>8,27</sup>.

Em se tratando do aspecto político e de gestão pública da Saúde no Brasil, Souza et al<sup>26</sup> afirmam que a falta de medidas voltadas ao controle da leptospirose se traduz pelo desconhecimento do seu real impacto socioeconômico, implicando na gestão do erário fer-tado à Saúde Pública que, como em um círculo vicioso, posterga a deflagração das tais medidas de controle.

O impacto da doença em seres humanos possui potencial de ser devastador, já que pode resultar na hospitalização e absenteísmo, o que reflete diretamente na economia da região afetada<sup>11,26</sup>. No Brasil, são notificados mais de dez mil casos de leptospirose a cada ano sendo, em sua maioria, moradores de favelas urbanas que necessitam de hospitalização, devido às complicações graves da doença, o que indica ser uma doença perpetuada pela pobreza, relacionada à falta de saneamento e à urbanização desenfreada, típica dos países economicamente menos favorecidos<sup>28</sup>.

Agampodi et al<sup>29</sup> afirmam que as estimativas da carga global de leptospirose são dificultadas pela falta de dados científicos de países com provável alta endemicidade e limitada capacidade de diagnóstico. Observa-se que, além da falta de um aporte



tecnológico adequado para um diagnóstico precoce da leptospirose, especialmente aquela que se apresenta de forma oligossintomática, também podemos caracterizar a falta de dados precisos para se estimar a real carga global da doença no Brasil. Lacunas do conhecimento científico, além da necessidade de produzir mais e melhores dados para desenvolvimento de estratégias mais eficazes para controle e prevenção da leptospirose, integrando ações na perspectiva da Saúde Única, são destacadas em diversos estudos disponibilizados em repositórios científicos<sup>30-32</sup>.

Já para Musso et al<sup>33</sup>, a carga global da doença é mal compreendida devido, principalmente, à falta de instalações laboratoriais necessárias ao diagnóstico da fase aguda da leptospirose em países considerados endêmicos, sendo necessário o desenvolvimento de novas tecnologias diagnósticas, que sejam sensíveis e específicas para os casos agudos da doença.

Sintomas febris agudos e outros um tanto inespecíficos – mialgia, dor de cabeça, calafrios, sufusão conjuntival – quando presentes, associados à ausência do quadro clínico mais clássico para a leptospirose, em tese, dificultariam um diagnóstico precoce e a estimativa da real carga da doença. A incidência real de leptospirose reflete a indisponibilidade de um diagnóstico laboratorial mais oportuno e acurado ainda na fase aguda da doença, visto que o diagnóstico por microscopia direta em campo escuro é de pouca sensibilidade e especificidade, tanto no sangue quanto na urina dos suspeitos, e os diagnósticos sorológicos dependem da presença de anticorpos, que normalmente não se fazem presentes na fase aguda da doença. A depender do contexto epidemiológico para a leptospirose, um exclusivo diagnóstico presuntivo, baseado em história clínica do paciente e uso de métodos indiretos, poderia levar a uma sensibilidade diagnóstica frágil ao se utilizar da definição de caso proposto para atividades de vigilância clínica da leptospirose<sup>22,24</sup>.

Quanto às prioridades do Ministério da Saúde para o enfrentamento de doenças negligenciadas no Brasil, os investimentos para financiamento de pesquisa estariam vinculados às seguintes doenças: Dengue, Doença de Chagas, Leishmaniose, Hanseníase, Malária, Esquistossomose e

Tuberculose<sup>34</sup>.

Esta lista fechada se originou de análises de dados epidemiológicos e demográficos que, discutidos nas oficinas de prioridades desenvolvidas pelo Ministério, levaram a valores referentes ao financiamento de pesquisas entre 2003 e 2009 de R\$ 82,4 milhões, inclusive com editais específicos para a Dengue, Tuberculose, Hanseníase e Malária<sup>34</sup>.

Para uma melhor compreensão dos fatores de risco de transmissão e os caminhos para a doença, é imprescindível elaborarmos intervenções integradas e melhor arrançadas, objetivando a redução das fontes de infecção, atilando para a perspectiva da Saúde Única e promovendo inovação tanto à saúde humana quanto à saúde animal. Caso a leptospirose estivesse acobertada por essa política, uma parcela desses recursos poderia ter financiado projetos relacionados ao desenvolvimento tecnológico de formas diagnósticas mais acuradas e precoces, assim como o uso de tecnologias relacionadas à genômica e à proteômica, na busca por conhecimento estratégico da ecologia das leptospirosas, com aplicação direta em desenvolvimento e incorporação de tecnologias curativas e de medidas profiláticas de massa, sejam em humanos ou animais, principalmente em se tratando de áreas demograficamente importantes e de populações desassistidas socialmente<sup>35-39</sup>.

## CONCLUSÃO

O uso de tecnologias inovadoras para diagnóstico precoce da leptospirose no Brasil, caso dos dispositivos *point-of-care testing* (POCT), poderiam apoiar a condução clínica dos profissionais de saúde quanto ao manejo de pacientes, contribuindo para a redução do risco de agravamento da doença e gerando oportunidade da notificação aos serviços de vigilância de forma mais oportuna para desenvolver ações mitigadoras do risco ambiental. De forma sinérgica, o desenvolvimento e a implantação de protocolos de diagnóstico outros, caso das abordagens sindrômicas, poderiam ser alavancados objetivando abordar as múltiplas causas da febre aguda em regiões com logística dificultada ou que operam recursos de custo elevado para um diagnóstico laboratorial satisfatório à assistência e à vigilância da leptospirose.

Considerando ser a leptospirose um problema socioecológico, muitas vezes relacionado ao contexto de desigualdade social, é oportuno que haja uma atitude crítica de reavaliação de abordagem, investindo em intervenções que garantam condições ambientais adequadas e mitiguem possíveis deficiências de infraestrutura comuns aos enclaves populacionais mais pobres de áreas urbanas ou rurais de nosso país.

Por fim, ao fomentar uma nova abordagem para com a leptospirose, visto as características clínicas da doença, as interações ecológicas, os fatores de risco e as lacunas do conhecimento ainda existentes, procuramos refletir a dificuldade de realizar um diagnóstico atilado da leptospirose, ainda durante a fase precoce da doença, colaborando para um processo de naturalização da subnotificação pelos que organizam, gerenciam e operam nosso Sistema de Saúde, o que pode explicar a falta de investimento na gestão da vigilância e do controle da leptospirose no país, compondo um cenário favorável à manutenção de um círculo vicioso para a negligência da leptospirose no Brasil.

### NOTA

Este artigo é produto da dissertação de Mestrado intitulada “O círculo vicioso da leptospirose: ampliando o conceito de negligência em saúde no Brasil”, defendida em março de 2016 pelo autor no Programa de Pós-graduação em Informação e Comunicação em Saúde (PPGICS) da Fundação Oswaldo Cruz.

### REFERÊNCIAS

1. Sitprija V, Tantawichien T. Leptospirosis. In: *Encyclopedia of life Sciences (ELS)*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester; 2011.p.1-11.
2. Schneider MC, Jancoes M, Buss DF, Aldighieri S, Bertherat E, Najera P et al. Leptospirosis: a silent epidemic disease. *Int J Environ Res Public Health*. 2013;10(12):7229-34. [DOI: <http://www.dx.doi.org/10.3390/ijerph10127229>].
3. WHO. Neglected Tropical Diseases. [acesso 2015 Dez 20]. Disponível em: [[http://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/)].
4. Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira MS et al. Global morbidity and mortality of leptospirosis: a systematic review. *Small. PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(9):e0003898. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003898>].
5. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância em Saúde. Brasília: Ministério da Saúde; 2014. Disponível em: [[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_vigilancia\\_saude\\_unificado.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_unificado.pdf)].
6. Ribeiro GS. Subdiagnóstico aumenta o risco [entrevista a Cristiana Bravo] *Revista Pesquisa Médica out/dez*. 2009.12:22-27 In: Rascado R, Marques L, Oliveira D, Abjaude S. Centro de Farmacovigilância. Alfenas(MG):Universidade Federal de Alfenas; 2010. Disponível em: [<http://www.unifal-mg.edu.br/cefal/sites/default/files/boletim-03.pdf>].
7. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Leptospirose: diagnóstico e manejo clínico. Brasília: Ministério da Saúde; 2014. Disponível em: [<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/leptospirose-diagnostico-manejo-clinico2.pdf>].
8. Albuquerque Filho APL, Araújo JG, Souza IQ, Martins LC, Oliveira MI, Silva MJB et al. Validation of a case definition for leptospirosis diagnosis in patients with acute severe febrile disease admitted in reference hospitals at the State of Pernambuco, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011;44(6):735-9. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822011000600016>].
9. Vieira Lima, HCA. Incidência de fatores de risco associados às diferentes formas clínicas da leptospirose: um estudo de vigilância de base populacional em uma comunidade urbana de Salvador-Bahia. [Dissertação Mestrado]. Salvador (BA): Universidade Federal da Bahia; 2011.
10. Reis MG. Duplamente esquecida. [entrevista a Thiago Camelo]. Instituto Ciência Hoje, 2011. [acesso 2015 Dez 25]. Disponível em: [[http://www.cienciahoje.org.br/noticia/v/ler/id/2440/n/duplamente\\_esquecida](http://www.cienciahoje.org.br/noticia/v/ler/id/2440/n/duplamente_esquecida)].

11. Pereira CAR. Custo social da leptospirose no Brasil e o efeito de chuvas extremas em Nova Friburgo para o incremento de casos da doença. [Dissertação Mestrado]. Rio de Janeiro (RJ): Fundação Oswaldo Cruz. Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca; 2014.
12. Campello BS, Cendón BV, Kremer JM (Org). Fontes de informação para pesquisadores e profissionais. Belo Horizonte: UFMG; 2000. 319p.
13. Souza Vanz AS, Stumpf IRC. Procedimentos e ferramentas aplicados aos estudos bibliométricos. *Inf Soc*. 2010;20(2):67-75. Disponível em: [http://www.brapci.inf.br/v/a/9095].
14. Beatty JF. Zotero: A Tool for Constructionist Learning in Critical Information Literacy. In: *Critical Library Pedagogy Handbook*. McElroy K, Pagowsky N, editors. Chicago: Association of College and Research Libraries, 2016 [acesso 2017 Jul 25]. Disponível em: [http://digitalcommons.plattsburgh.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1012&context=lis].
15. Rodrigues CM. Sobre leptospirose e informação: ampliando os conceitos de negligência em saúde. *ABCS Health Sci*. 2017; 42(1):45-9. [DOI: <https://dx.doi.org/10.7322/abcshs.v42i1.949>].
16. WHO. Library Cataloguing-in-Publication Data. Neglected tropical diseases, hidden successes, emerging opportunities. Geneve; 2009 [acesso 2015 Dez 21]. Disponível em: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241598705\_eng.pdf].
17. Mahoney RT, Morel CM. A Global Health Innovation System (GHIS). *Innovation Strategy Today*. 2006;2(1):1-12.
18. Mahoney RT, Morel CM. A Global Health Innovation System (GHIS). *Global Forum Update on Research for Health Volume 3*. In: *Combating disease and promoting health*. London (UK): Pro-Brook Publishing; 2006.p.149-56.
19. Vijayachari P, Sugunan AP, Shegal SC. Evaluation of Lepto Dri Dot as a rapid test for diagnosis of Leptospirosis. *Epidemiol Infect*. 2002; 129(3):617-21. [DOI:<https://dx.doi.org/10.1017/S0950268802007537>].
20. Souza W, coordenador. *Doenças Negligenciadas*. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências; 2010.
21. Rajeev S, Ilha M, Woldemeskel M, Berghaus RD, Pence ML. Detection of asymptomatic renal *Leptospira* infection in abattoir slaughtered cattle in southeastern Georgia, United States. *SAGE Open Med*. 2014;2:2050312114544696. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1177/2050312114544696>].
22. Musso D, La Scola B. Laboratory diagnosis of leptospirosis: a challenge. *J Microbiol Immunol Infect*. 2013;46(4):245-52. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.jmii.2013.03.001>].
23. Nability SA, Ribeiro GS, Aquino CL, Takahashi D, Damião AO, Gonçalves AH et al. Accuracy of a dual path platform (DPP) assay for the rapid point-of-care diagnosis of human leptospirosis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(11):e1878. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001878>].
24. Calado EJR, Oliveira VS, Dias FCFD, Lopes AB, Oliveira AA, de Santana VMX et al. Leptospirose na região norte do Brasil: uma revisão da literatura e perfil epidemiológico comparativo. *Rev Patol Tocantins*. 2017;4(2):65-71 [DOI: <https://dx.doi.org/10.20873/uft.2446-6492.2017v4n2p65>].
25. WHO. Zoonoses. Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group (LERG). Geneve; 2010. [acesso 2015 Dez 27] Disponível em: [http://www.who.int/zoonoses/diseases/lerg/en/index2.html].
26. Souza VM, Arsky MLNS, Castro AP, Araujo WN. Years of potencial life lost and hospitalization cost associated with leptospirosis in Brazil. *Rev Saúde Pública*. 2011;45(6):1001-8. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89102011005000070>].
27. Lima CRA, Schramm JMA, Coeli CM, Silva MEM. Revisão das dimensões de qualidade dos dados e métodos aplicados na avaliação dos sistemas de informação em saúde. *Cad Saúde Pública*. 2009;25(10):2095-109. [DOI: <https://dx.doi.org/110.1590/S0102-311X2009001000002>].
28. Felzemburgh RD, Ribeiro GS, Costa F, Reis RB, Hagan JE, Melendez AX et al. Prospective study of leptospirosis transmission in an urban slum community: role of poor environment in repeated exposures to the *Leptospira* agent. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(5): e2927. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002927>].

29. Agampodi SB, Peacock SJ, Thevanesam V, Nugegoda DB, Smythe L, Thaipadungani J et al. Leptospirosis outbreak in Sri Lanka in 2008: lessons for assessing the global burden of disease. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;85(3):471-8. [DOI: <https://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2011.11-0276>].
30. Corbellini LG, Cavagni G, Machado G, Rodrigues RO, Schneider MC, Pereira MM. Prevalência e Fatores de Risco da Leptospirose Bovina no Estado do Rio Grande do Sul. 41º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária; agosto de 2014; Gramado, RS. Disponível em: [[http://sovergs.com.br/site/conbravet2014/artigos/trabalhos\\_2144.htm](http://sovergs.com.br/site/conbravet2014/artigos/trabalhos_2144.htm)]
31. Figueiredo CM, Mourão AC, Oliveira MA, Alves WR, Ooteman MC, Chamone CB et al. Leptospirose humana no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil: uma abordagem geográfica. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2001;34(4):331-8. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822001000400004>].
32. Serafini PP, Gonçalves MLL, Biondo A, Quadros J. Investigação sorológica de anticorpos contra *Leptospira* spp. em roedores silvestres e marsupiais de Unidades de Conservação da Ilha Rasa, Guaraqueçaba, Paraná, Brasil. *Ciênc Vet Tróp*. 2011;14(1/2/3):54-8.
33. Musso D, Roche C, Marfel M, Bel M, Nilles EJ, Cao-Lormeau VM. Improvement of leptospirosis surveillance in remote Pacific islands using serum spotted on filter paper. *Int J Infect Dis*. 2014;20:74-6. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2013.12.002>].
34. BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Ciência e Tecnologia, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos estratégicos. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. São Paulo: Rev Saúde Pública. 2010;44(1):200-2.
35. WHO. Report of second meeting of the leptospirosis burden epidemiology reference group. Geneva: World Health Organization; 2011. [acesso 2018 Mar 12] Disponível em: [[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44588/1/9789241501521\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44588/1/9789241501521_eng.pdf)].
36. WHO. Report of the first meeting of the leptospirosis burden epidemiology reference group. Geneva, 2010. [acesso 2018 Mar 12]. Disponível em: [[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44382/1/9789241599894\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44382/1/9789241599894_eng.pdf)].
37. Hartskeerl RA, Collares-Pereira M, Ellis WA. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(4): 494-501. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03474.x>].
38. Evangelista KV, Coburn J. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiol*. 2010;5(9):1413-25. [DOI: <https://dx.doi.org/10.2217/fmb.10.102>].
39. Zinsstag J, Schelling E, Wyss K, Mahamat MB. Potential of cooperation between human and animal health to strengthen health systems. *The Lancet*. 2005;366(9503):2142-5. [DOI: [https://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67731-8](https://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67731-8)].
40. Castro JR, Salaberry SRS Souza MA, Lima-Ribeiro AMC. Sorovares de *Leptospira* spp. predominantes em exames sorológicos de caninos e humanos no município de Uberlândia, Estado de Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011;44(2):217-22. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822011005000012>].



# Aspectos epidemiológicos da esquistossomose em área do sudoeste de Minas Gerais, Brasil

## Epidemiological aspects of schistosomiasis in area at the southwest of Minas Gerais, Brazil

RIALA6/1730

Raquel Lopes Martins SOUZA<sup>1\*</sup>, Cybele GARGIONI<sup>3</sup>, Rosângela Vieira SIQUEIRA<sup>1</sup>, Rita Maria da SILVA<sup>2</sup>, Pedro Luiz Silva PINTO<sup>3</sup>, Herminia Yohko KANAMURA<sup>1</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Departamento de Patologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 Centro, Alfenas, MG, CEP: 37130-001. Tel: 35 3701 9576. E-mail: martinssouza@unifal-mg.edu.br

<sup>2</sup>Centro de Laboratório Regional de Rio Claro, Rio Claro, SP, Instituto Adolfo Lutz

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

Recebido: 08.06.2017 - Aceito para publicação: 17.11.2017

### RESUMO

Este estudo foi desenvolvido com o objetivo de contribuir com a vigilância da esquistossomose, no âmbito da Superintendência Regional de Saúde de Alfenas, MG, na mesorregião Sul/Sudoeste do estado, considerada não endêmica para a esquistossomose, ao contrário de outras áreas ao norte e nordeste do estado. Durante o ano de 2015, os escolares e migrantes de dois municípios dessa região, Arceburgo e Guaranésia, foram submetidos aos inquéritos parasitológico e sorológico. No inquérito parasitológico, nenhum caso de esquistossomose foi detectado em Arceburgo. Em Guaranésia, ovos de *S. mansoni* foram detectados entre os migrantes, com taxa de positividade de 13,6% (9/66), e em um único estudante. Sete membros da família, classificada como moradora de Guaranésia, mas determinada como oriunda de Timbaúba, PE quando investigada pela vigilância epidemiológica, foram também positivos para *S. mansoni*. No inquérito sorológico, a positividade para esquistossomose foi de 18,5% entre os migrantes de Guaranésia. Em relação às demais parasitoses, as taxas de positividade variaram de 12,5% a 32,3%. Os resultados sugerem diferenças em relação ao risco de exposição a *S. mansoni* e a importância da vigilância epidemiológica, mesmo em áreas não endêmicas, com foco nos migrantes, quando estes são oriundos de regiões endêmicas para esquistossomose.

**Palavras-chave.** esquistossomose, vigilância epidemiológica, migrantes.

### ABSTRACT

This study was developed aiming at contributing to the schistosomiasis surveillance, within the scope of the Regional Health Superintendence of Alfenas, MG, in the South/Southwest mesoregion of the state, considered not endemic for schistosomiasis, unlike North and Northeast areas of the state. During the year of 2015, schoolchildren and migrants from two municipalities of this region, Arceburgo and Guaranésia, underwent parasitological and serological surveys. In the parasitological survey, no case of schistosomiasis was detected in Arceburgo. In Guaranésia, *S. mansoni* eggs were detected among the migrants, with a positivity rate of 13.6% (9/66), and in only one schoolchild. Seven members of his family, who were classified as residents of Guaranésia, but were determined as coming from Timbaúba, PE, when investigated by the epidemiological surveillance, they were also positive for *S. mansoni*. In the serological survey, the positivity for schistosomiasis was 18.5% among migrants from Guaranésia. Concerning the other intestinal parasites, the positivity rates ranged from 12.5% to 32.3%. The results suggest differences in the risk of exposure to *S. mansoni* and the importance of epidemiological surveillance, even in non-endemic areas, with a focus on migrants when they come from endemic regions for schistosomiasis.

**Keywords.** schistosomiasis, epidemiological surveillance, migrants.

## INTRODUÇÃO

A esquistossomose, tendo como agente causal *Schistosoma mansoni*, considerada uma doença negligenciada e subnotificada em todo o mundo, ainda é de importância em saúde pública no Brasil, tendo em vista a grande extensão da área de transmissão e significativo número de casos graves e mortes que provoca a cada ano<sup>1</sup>. No Brasil, estima-se que cerca de 6 milhões de pessoas estão infectados com *S. mansoni*, e 25 milhões estão em risco de contrair a doença<sup>2</sup>; e 70% dos casos estão concentrados nos estados de Minas Gerais e Bahia<sup>3</sup>.

Um aspecto importante que deve ser levado em consideração quando se pretende avaliar o risco do estabelecimento de focos de transmissão em uma região é o estudo dos vetores, mais especificamente, no caso da esquistossomose, da fauna malacológica planorbídica. É sabido que a distribuição da esquistossomose no território brasileiro coincide com a distribuição dos moluscos do gênero *Biomphalaria*. No Brasil, foram descritas dez espécies do gênero *Biomphalaria*, mas somente três espécies foram encontradas eliminando cercárias de *S. mansoni*, em ambientes aquáticos naturais: *Biomphalaria glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*<sup>4</sup>.

No estado de Minas Gerais, *B. glabrata* é considerada a espécie de molusco mais importante na transmissão da esquistossomose, em vista de sua ampla distribuição geográfica e altos índices de infecção. Embora *B. tenagophila* não seja amplamente difundido em Minas Gerais, foram encontrados naturalmente infectados com *S. mansoni* nos municípios de Jaboticatubas, Itajubá, Belo Horizonte e Ouro Branco<sup>5</sup>. Em Paracatu, embora nunca encontrada infectada em Minas Gerais, *B. straminea* foi considerado a responsável pelo foco da esquistossomose<sup>6</sup>.

A área endêmica para esquistossomose, em Minas Gerais, compreende 523 dos 853 municípios, com uma população estimada em quase 11 milhões vivendo nessa área<sup>7</sup>. As áreas consideradas de maior risco para esta parasitose se situam nas regiões norte, nordeste e centro, acreditando-se que a região sul do estado estaria livre da endemia, embora, na década de 1980,

casos autóctones de esquistossomose tenham sido relatados em Itajubá<sup>8</sup>.

A expansão territorial da esquistossomose está relacionada ao deslocamento de pessoas infectadas por *S. mansoni*, de áreas endêmicas para áreas que, embora sem relato de transmissão, tem características ambientais que favorecem a presença de caramujos do gênero *Biomphalaria*; além disso, o saneamento básico deficiente, encontrado nessas áreas, constitui-se em fator de risco importante para a transmissão da esquistossomose.

São vários os fatores que caracterizam a região sul/sudoeste de MG, considerada não endêmica para esquistossomose, como uma área que merece atenção especial no que diz respeito ao controle da esquistossomose e à necessidade de implantação de um programa de vigilância sistematizado: as constantes correntes migratórias de trabalhadores, oriundos de áreas endêmicas; a detecção de casos de esquistossomose entre esses migrantes, em municípios da região; o estabelecimento daqueles em bairros de periferia das cidades, com condições sanitárias inadequadas; e grande número de coleções hídricas, que favoreceriam a ampla distribuição dos caramujos hospedeiros de *S. mansoni* na região<sup>6,9-11</sup>.

Assim, mesmo em áreas consideradas não endêmicas, como é o caso dos dois municípios envolvidos no presente estudo, é de grande valia a realização de uma investigação epidemiológica eficaz, com utilização de ferramentas de diagnóstico sorológico para esquistossomose e coproparasitológico para enteroparasitoses, incluindo a esquistossomose; os dados levantados permitirão aos serviços de saúde estimar as necessidades de intervenção e selecionar quais as ações de controle mais adequadas para cada situação.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Caracterização dos municípios e da região selecionados para estudo

A área de abrangência da Superintendência Regional de Saúde de Alfenas (SRS/Alfenas) situa-se na região sudoeste do estado de Minas Gerais. A economia da região se baseia em atividades

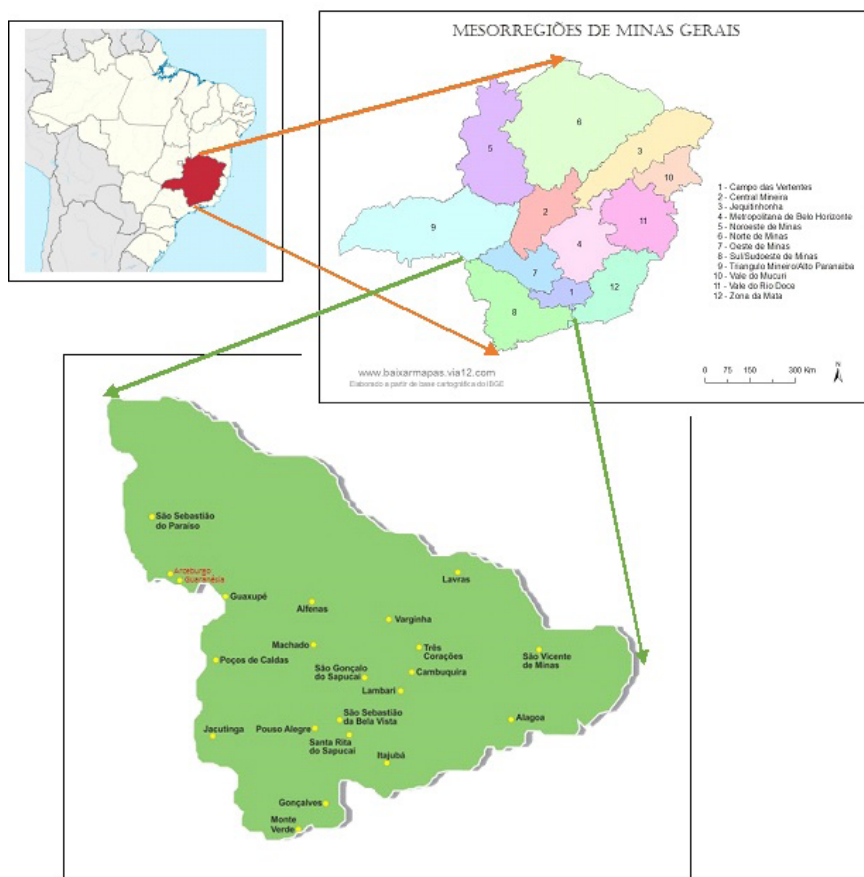
voltadas para a agricultura e pecuária, sendo que as empresas agropecuárias costumam importar mão-de-obra de outras regiões do estado e do país. A SRS/Alfenas, como uma Instituição Pública Estadual que compõe a Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais, assessora, acompanha e monitora as ações de saúde desenvolvidas nos seguintes municípios: Alfenas, Alterosa, Arceburgo, Areado, Bandeira do Sul, Botelhos, Campos Gerais, Campo do Meio, Cabo Verde, Carvalhópolis, Conceição da Aparecida, Carmo do Rio Claro, Campestre, Divisa Nova, Fama, Guaranésia, Guaxupé, Juruáia, Machado, Monte Belo, Muzambinho, Nova Resende, Paraguaçu, Poço Fundo, São Pedro da União, e Serrania. Abrange uma população aproximada de 470.000 habitantes<sup>12</sup>.

Como ponto de partida para se conhecer o problema da esquistossomose na região, foram selecionados dois municípios da jurisdição da

SRS-Alfenas, Arceburgo e Guaranésia, tendo em vista resultados já descritos<sup>9,13</sup>. Com população estimada, em 2015, respectivamente de 10.373 e 19.340 habitantes, Arceburgo e Guaranésia estão localizadas a 478 Km e 457 Km de Belo Horizonte, capital do estado de MG, na região limítrofe com o estado de São Paulo. (**Figura 1**)

### Abordagem da população alvo e aspectos éticos

Nos dois municípios, foram convidadas para participarem deste estudo, todas as crianças matriculadas, em 2015, na 5ª série do ensino fundamental, nas escolas da rede municipal e estadual. Foram também convidados para participarem do estudo, todos os migrantes, cadastrados nas unidades de saúde do município, oriundos de outras regiões do estado de Minas Gerais ou de outros estados do país e contratados para trabalho temporário nas safras agrícolas regionais.



**Figura 1.** Localização dos municípios de Arceburgo e Guaranésia, dentro da mesorregião sul/sudoeste do estado de Minas Gerais (Fonte: [https://pt.wikipedia.org/wiki/Minas\\_Gerais](https://pt.wikipedia.org/wiki/Minas_Gerais) e <http://www.cultura.mg.gov.br/territoriocultura/index.php/calendario/sul-de-minas>, com modificações introduzidas pelo autor)

A abordagem ao grupo de escolares foi feita por meio de contato com a Secretaria de Educação local. Foram realizadas reuniões, nas escolas, com os gestores, professores e pais, para discussão do projeto e planejamento das ações a serem efetivadas. Foram oferecidas informações e esclarecimentos sobre o estudo a ser desenvolvido e a coleta de amostras clínicas (sangue e fezes). A participação das crianças envolvidas foi voluntária. Para obtenção das amostras de sangue e fezes, os pais ou responsáveis pelos menores foram devidamente informados quanto aos procedimentos e riscos e solicitados a assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

O projeto teve aprovação dos Comitês de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alfenas-UNIFAL-MG (Número do Parecer: 1.125.741, com data de 27/05/2015) e do Instituto Adolfo Lutz (CTC IAL N° 70/2014).

Quanto aos migrantes, a abordagem foi feita através de contato com a Secretaria de Saúde local, que organizou a lista das famílias de migrantes, cadastradas nas unidades de saúde do município, nos Programas de Saúde da Família (PSF); os agentes de saúde se responsabilizaram pela visita a essas famílias e pela coleta das amostras de fezes e sangue, após assinatura do TCLE.

### **Inquérito para investigação de enteroparasitoses e esquistossomose**

Foi coletada de cada participante (migrantes e escolares) uma amostra de fezes em potes plásticos com tampa de rosca, sem adição de conservantes, sendo as amostras fecais enviados ao Laboratório de Parasitologia Clínica da UNIFAL, para processamento. As amostras fecais foram submetidas à técnica de Kato-Katz<sup>14</sup> para a contagem de ovos de *S. mansoni* e pesquisa de ovos de helmintos, detectáveis por esta técnica, e às técnicas de sedimentação espontânea e de Ritchie modificado, para a pesquisa de larvas e ovos de helmintos em geral, e de cistos de protozoários<sup>15, 16</sup>. De três a seis lâminas de Kato-Katz foram preparadas na UNIFAL, dependendo o volume de fezes recebido; estas foram encaminhadas, para leitura, ao Núcleo de Enteroparasitas do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL), em São Paulo; foi também encaminhada ao IAL, uma

alíquota conservada em formol 10% tamponado, de cada amostra fecal, para processamento por técnica de Ritchie modificado, conforme procedimento já descrito<sup>16</sup>.

### **Inquérito sorológico para esquistossomose**

Foi coletada de cada participante (migrantes e escolares) uma amostra de sangue em papel filtro Whatman n° 3 e enviados ao Núcleo de Enteroparasitas do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz, em São Paulo; onde foi realizado por técnica sorológica de RIF-IgM (Reação de imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos IgM, em cortes parafinados de vermes adultos machos, contra componentes do tubo digestivo), de acordo com metodologia já descrita<sup>17</sup>.

## **RESULTADOS**

Durante o ano de 2015, foram analisadas amostras de fezes de 247 indivíduos, coletados em dois municípios da SRS-Alfenas, Arceburgo e Guaranésia, sendo 147 de escolares e 100, de trabalhadores rurais procedentes de diferentes regiões de Minas Gerais ou de outros estados brasileiros, classificados no presente estudo como migrantes. Amostras de sangue de 252 indivíduos foram submetidas a testes sorológicos de RIF-IgM, sendo 187 de escolares e 65 de migrantes; não foram coletadas amostras de sangue de migrantes em Arceburgo. A **Tabela 1** descreve o número total de indivíduos envolvidos e as taxas de adesão ao projeto.

Em Arceburgo, 48 escolares e 34 migrantes encaminharam amostras fecais para exame. Nenhuma amostra foi positiva para *S.mansoni*. Em Guaranésia, entre os 66 migrantes que se submeteram ao exame parasitológico de fezes, nove foram positivos para *S.mansoni*, com taxa de positividade de 13,6%. Fora esses nove casos entre os migrantes, foi encontrado um escolar com esquistossomose (**Tabela 2**). A partir deste escolar, mais sete casos foram ainda detectados entre os familiares, totalizando 17 casos de esquistossomose diagnosticados em Guaranésia. A carga parasitária nesses pacientes variou de 12 a 387 ovos por grama de fezes (**Tabela 3**).



**Tabela 1.** Número de indivíduos envolvidos e taxas de adesão ao projeto, de acordo com a categoria (escolares ou migrantes) e o município estudado

INDIVÍDUOS ENVOLVIDOS	MUNICÍPIO				TOTAL
	Arceburgo		Guaranésia		
	Escolares	Migrantes	Escolares	Migrantes	
<b>Número total</b>	140	136	216	381	873
<b>Adesão ao projeto com assinatura do TCLE<sup>1</sup></b>	63 (45,0%) <sup>2</sup>	40 (29,4%)	147 (68,1%)	164 (43,0%)	414 (17,3%)
<b>Amostras fecais recebidos</b>	48 (34,3%) <sup>2</sup>	34 (25,0%)	99 (45,8%)	66 (17,3%)	247 (28,3%)
<b>Amostras de sangue processadas</b>	54 (38,6%) <sup>2</sup>	- - -	133 (61,6%)	65 (17,0%)	252 (28,8%)

1. TCLE = Termo de consentimento livre e esclarecido; 2. Taxas de adesão ao projeto e de recebimento de amostras, calculadas em relação ao total de alunos envolvidos

**Tabela 2.** Número de amostras positivas para as diferentes espécies parasitárias e porcentagem de positividade geral, de acordo com a categoria (escolares ou migrantes), nos municípios de Arceburgo e Guaranésia, MG, no ano de 2015

ESPÉCIE PARASITARIA*	Número de amostras positivas e porcentagem de positividade geral (amostras positivas/Nº total de amostras=N)				
	Arceburgo		Guaranésia		
	Escolares (N=48)	Migrantes (N=34)	Escolares (N=99)	Migrantes (N=66)	
Positivos com	1 espécie de parasita	4	8	15	15
	2 espécies de parasita	1	1	2	2
	3 ou mais espécies	1	2	2	0
HELMINTO	<i>Schistosoma mansoni</i>	0	0	1	9
	<i>Ascaris lumbricoides</i>	0	0	0	0
	<i>Trichuris trichiura</i>	0	0	0	0
	<i>Ancylostomatidae</i>	0	0	1	0
	<i>Enterobius vermicularis</i>	0	0	1	0
	<i>Hymenolepis nana</i>	0	0	0	0
	<i>Strongyloides stercoralis</i>	0	0	2	0
	<i>Taenia sp</i>	0	0	0	0
PROTOZOÁRIO	<i>Entamoeba coli</i>	3	5	8	4
	<i>Giardia lamblia</i>	3	5	6	0
	<i>Entamoeba histolytica</i>	0	1	1	0
	<i>Endolimax nana</i>	0	6	3	7
	<i>Iodamoeba butschili</i>	1	1	1	0
	<i>Blastocystis hominis</i>	2	1	2	0
<b>Positividade geral</b>	<b>12,5% (6/48)</b>	<b>32,3% (11/34)</b>	<b>19,2% (19/99)</b>	<b>25,8% (17/66)</b>	

\*Os resultados incluem as espécies parasitárias encontradas em qualquer uma das três técnicas parasitológicas empregadas: sedimentação espontânea, Ritchie modificado e Kato-Katz.

**Tabela 3.** Detalhamento de resultados dos nove casos detectados, em Guaranésia, a partir do inquérito com migrantes, e dos sete membros da família do escolar J.A.S.S.

	Identificação	RESULTADO			Resultados do KK	
		RIF	FE <sup>1</sup>	KK <sup>2</sup>	Nº de ovos por lâmina	OPG
Casos detectados no inquérito com migrantes	DVN	P	P	P	(3)(3)(3)(7)(3)(11)	119
	EVS	P	P	N	- - -	-
	COS	P	N	P	(1)(2)(0)(0)(1)(1)	20
	PJS	P	N	P	(1)(0)(2)(1)(1)(0)	20
	VMC	P	P	N	- - -	-
	AJCS	P	N	P	(1)(0)(0)(1)(0)(1)	12
	MHS	NR	N	P	(14)(9)(13)(9)(5)(6)	222
	JRS	P	P	MI	- - -	-
	FCAS	N	P	MI	- - -	-
Famíliares do escolar J.A.S.S.*	JASS*	N	P	P	(02)(05)(03)	79
	EMS	N	P	P	(01)(02)(02)	40
	RDS	P	P	P	(05)(04)(02)(03)	83
	JRSS	P	P	P	(12)(08)(01)(05)	155
	JMN	P	P	P	(17)(15)(22)(11)	387
	JAS	P	P	P	(14)(15)(18)(18)	387
	JASS	N	P	P	(08)(09)(11)(8)	214
	ORDS	N	P	P	(11)(15)(07)(13)	274

1= técnica parasitológica concentração pelo Ritchie modificado (formol-éter); 2= Kato-Katz; P= positivo; N= negativo; NR= não realizado; MI= material insuficiente; OPG= ovos por grama de fezes

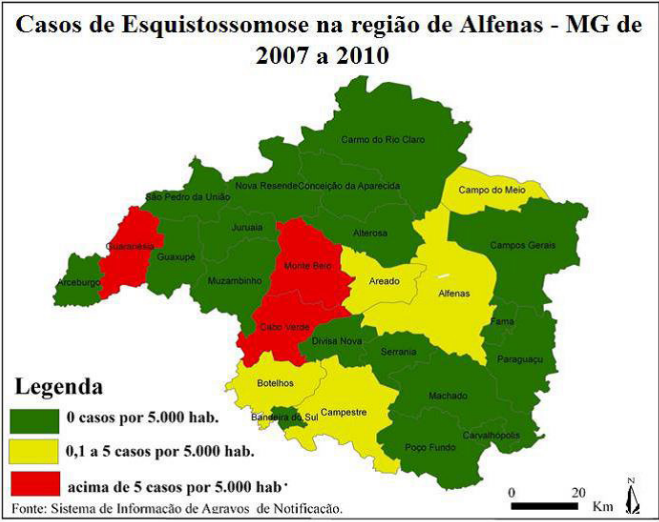
## DISCUSSÃO

Em relação às demais parasitoses intestinais, em Arceburgo foram detectadas somente infecções por protozoários e em Guaranésia, foram diagnosticadas, além dos protozoários, casos com outras espécies de helmintos. As taxas de positividade encontradas foram, respectivamente, de 12,5% e 19,2%, entre os escolares, e de 32,3% e 25,8%, entre os migrantes (**Tabela 2**).

Quanto aos resultados do inquérito soropidemiológico em Guaranésia, dos 65 migrantes submetidos ao teste sorológico, 12 foram positivos (18,5% de positividade). Dos nove casos positivos para esquistossomose no exame de fezes, sete foram positivos pela RIF-IgM, um foi negativo e um caso não coletou amostra de sangue (**Tabela 3**). Amostras de cinco migrantes sem detecção de ovos de *S. mansoni* nas fezes foram soropositivas. Resultados soropositivos não foram encontrados entre os escolares, tanto em Guaranésia como em Arceburgo.

As regiões sul e sudoeste de Minas Gerais são compostas de aproximadamente 156 municípios, a grande maioria pequenas cidades e uma considerável área inundada pelo reservatório de Furnas. Especificamente, a economia da mesorregião do sudoeste de Minas Gerais se baseia em atividades voltada para a agricultura e pecuária, sendo assim é comum a importação, pelas empresas agropecuárias que atuam na região, de mão-de-obra de outras regiões do estado e do país.

Na região de abrangência da SRS-Alfenas, com 26 municípios sob sua jurisdição, vários deles às margens do reservatório de Furnas, em estudo recente, utilizando-se técnicas de geoprocessamento e dados do Programa de Controle de Esquistossomose (PCE), Servidoni e Hayakawa<sup>12</sup> mostraram que os municípios de Cabo Verde, Guaranésia e Monte Belo apresentavam número de casos de esquistossomose mais expressivos para a região (**Figura 2**).



**Figura 2.** Distribuição espacial dos casos de Esquistossomose na área de abrangência da Superintendência Regional de Saúde de Alfenas, Minas Gerais. De 2007 a 2010

Fonte: Servidoni e Hayakawa<sup>12</sup>

Em trabalho recente, Vieira Jr et al<sup>9</sup>, por meio de inquérito coproparasitológico realizado em Arceburgo e Guaraniésia, dois municípios sob jurisdição da SRS-Alfenas, localizados no extremo oeste da região, do total de 480 amostras submetidas ao exame parasitológico de fezes, verificou-se a presença de enteroparasitos em 65 (13,5%); e ovos de *S. mansoni* em 21 amostras (4,4%). Pimenta<sup>13</sup> mostrou que entre as amostras fecais de 442 migrantes de três municípios da SRS-Alfenas, Arceburgo, Botelhos e Campos Gerais, quando foram submetidas a quatro técnicas parasitológicas, oito foram positivas para *S. mansoni*.

Considerando que a região apresenta uma fisiografia abundante em cursos fluviais, lagos e açudes, que favorece a presença de hospedeiros intermediários de *S. mansoni*, associada à ocorrência de fluxo migratório de trabalhadores rurais, oriundos de regiões endêmicas para esquistossomose, esses trabalhos alertam para a necessidade de se implantar ações de vigilância e controle da doença, de forma a prevenir o estabelecimento de focos de transmissão de esquistossomose na região. Já em 1989, alguns pesquisadores alertavam sobre essa necessidade, ao relatarem sobre a ocorrência de esquistossomose no sudoeste de Minas Gerais, em área adjacente ao reservatório de Furnas, preocupados com a

possibilidade de esse reservatório vir a se constituir em foco da doença, pois caso isso ocorresse, seu controle se tornaria difícil, ou até mesmo impossível de ser realizado<sup>18</sup>.

Com relação a esta parasitose, em áreas de baixa transmissão, como são as áreas do sul e sudoeste de Minas Gerais<sup>6,7</sup>, a Organização Mundial de Saúde recomenda a eliminação da esquistossomose<sup>19</sup>. Entretanto, nestas áreas, os métodos parasitológicos de fezes nem sempre apresentam boa eficiência diagnóstica, pois a maioria dos indivíduos infectados apresenta baixas cargas parasitárias, dificultando o encontro de ovos do parasita por meio de um único exame de fezes, como usualmente é feito em inquéritos epidemiológicos. A detecção de ovos de *S. mansoni*, através do exame parasitológico de fezes, é historicamente utilizada como referência para o diagnóstico laboratorial da esquistossomose, pois são altamente específicos, baratos e relativamente simples de se executar, sendo que a técnica de Kato-Katz é a mais comumente utilizado em estudos epidemiológicos, embora apresente baixa sensibilidade diagnóstica, especialmente em áreas de baixa endemicidade<sup>2</sup>. Esta baixa sensibilidade das técnicas parasitológicas, e a necessidade de se incorporar novas metodologias diagnósticas nos programas e controle de esquistossomose, vem sendo discutida por outros autores<sup>20,21</sup>, com especial ênfase nas técnicas sorológicas.

Entre as técnicas sorológicas aplicadas ao diagnóstico da esquistossomose, as mais empregadas em estudos epidemiológicos são o teste de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) e a reação de imunofluorescência indireta (RIF). Em estudos epidemiológicos, diferentes antígenos têm sido utilizados na RIF: antígeno particulado de verme adulto, cortes congelados de verme adulto e cortes parafinados de verme adulto para pesquisa de anticorpos IgM contra antígenos presentes no tubo digestivo do parasita. Ao contrário do que ocorre nas infecções causadas por vírus e protozoários, em que a presença de anticorpos IgM é considerada marcador sorológico de fase aguda, anticorpos IgM são encontrados tanto na infecção recente como na crônica na esquistossomose. A possibilidade de detectar anticorpos em amostras de sangue coletadas em papel de filtro, por meio do emprego de cortes de vermes parafinados, estáveis à temperatura ambiente,

dispensando, portanto, o uso de congeladores, tornou a RIF um teste de aplicação mais prática. A grande estabilidade dos cortes de vermes de *S. mansoni*, fixados em solução de Rossman e incluídos em parafina, facilitou seu armazenamento e distribuição, viabilizando a execução da RIF por laboratórios que não mantinham o ciclo do parasita. A RIF para detecção de anticorpos IgM contra antígenos do tubo digestivo do verme, em cortes parafinados (RIF-IgM) mostrou bons índices de sensibilidade e especificidade, em diferentes áreas de baixa endemicidade para esquistossomose no Estado de São Paulo<sup>20,22</sup>. Esta boa sensibilidade diagnóstica da RIF-IgM foi também observada em trabalho recente, por Espírito Santo et al<sup>2</sup>, que compararam o desempenho das técnicas sorológicas de ELISA-IgG, ELISA-IgM e RIF-IgM, em relação às técnicas parasitológicas de Kato-Katz e sedimentação espontânea, utilizando como referência a reação periovular; o melhor índice de sensibilidade foi o observado para ELISA-IgM seguida pela RIF-IgM e ELISA-IgG, respectivamente, 81,8%, 78,8% e 66,7%; quando avaliadas para estudo epidemiológico, em uma área de baixa endemicidade, as taxas de positividade sorológica encontradas foram de 21,4% (131/612), 15,8% (97/612) e 11,6% (71/612), respectivamente. Essas taxas foram muito acima da positividade de 0,8% (5/610), obtida pelo conjunto de resultados das técnicas parasitológicas de Kato-Katz e de sedimentação espontânea.

Essa discrepância observada entre as taxas de positividade sorológica e parasitológica foi também observado e discutida por outros autores<sup>17,20-22</sup>, que têm enfatizado como responsável por essa disparidade a baixa sensibilidade diagnóstica dos métodos parasitológicos. A utilização de mais de uma técnica parasitológica e/ou aumento do número de amostras e/ou lâminas de Kato-Katz examinadas, por paciente, costumam diminuir, em parte, essa discrepância de resultados<sup>21,22</sup>. No presente estudo, a prevalência sorológica observada foi de 18,5%, portanto não muito superior à positividade parasitológica que foi de 13,6%. Este resultado não está de acordo com o observado em trabalhos anteriores<sup>2,17</sup>, onde as taxas de prevalência sorológica costumam ser de quatro a 20 vezes superior que a parasitológica, dependendo do tipo de população abordada e da técnica sorológica utilizada. Vale mencionar que, neste trabalho,

as amostras fecais foram analisadas por três diferentes técnicas parasitológicas, e, na técnica de Kato-Katz, foi preconizada leitura de seis lâminas por amostra, o que deve ter aumentado a sensibilidade do método parasitológico, embora, em alguns casos, a quantidade de amostra fornecida pelo participante não tenha sido suficiente para o preparo de seis lâminas. Por outro lado, ao analisar os resultados da **Tabela 3**, pode-se observar que quatro dos oito elementos da família do escolar JASS apresentaram resultado negativo para a RIF, indicando falha diagnóstica do teste sorológico, como executado no presente estudo. Esses fatos podem ter contribuído para essa aparente similaridade observada entre os dados de prevalência sorológica e parasitológica, mas estudos mais aprofundados seriam necessários para entender melhor os resultados obtidos.

No presente estudo, os resultados divergentes observados, nos dois municípios, em relação à esquistossomose, indicam diferenças epidemiológicas nas áreas de origem dos migrantes. Dos nove migrantes diagnosticados com esquistossomose em Guaranésia, um era procedente de Vitória da Conquista, na Bahia, e oito eram oriundos do estado de Pernambuco, sendo cinco da cidade de Vicência, dois de Nazaré da Mata e um de Macaparana, cidades localizadas em área endêmica para esquistossomose, de acordo com trabalhos publicados por outros autores<sup>23,24</sup>. Quanto aos migrantes que foram trabalhar em Arceburgo, estes eram provenientes principalmente do estado da Paraíba. A origem sertaneja destes migrantes, oriundos de municípios como Manaíra, Água Branca, Triunfo, entre outros, localizados na região do sertão, longe da faixa litorânea da Paraíba, pode explicar a inexistência de casos positivos neste grupo. Segundo Scholte et al<sup>25</sup>, a área endêmica para esquistossomose neste estado estaria concentrada na região da zona da Mata Atlântica, área litorânea do estado.

A família do único escolar de Guaranésia, com exame de fezes positivo para *S. mansoni*, foi constatado ser originária de Timbaúba, no estado de PE. Esta cidade está localizada na zona da mata de PE, em área hiperendêmica para esquistossomose<sup>24</sup>, o que justificaria a alta carga parasitária encontrada no exame parasitológico para vários dos membros desta família (**Tabela 3**).

## CONCLUSÃO

A alta positividade para esquistossomose, encontrada pelo exame de fezes, entre os migrantes de Guaranésia, sugere a importância de um programa de vigilância epidemiológica nesse município, com foco principalmente nos migrantes ou que pelo menos também os contemplem, para evitar possível introdução dessa endemia no município em estudo. Os resultados de sorologia negativa entre os escolares sugerem que essa parasitose ainda não parece ter sido introduzida na região.

A positividade para outras espécies parasitárias entre os escolares, mais elevada em Guaranésia que em Arceburgo, justificaria uma análise comparativa dos fatores macro-determinantes ou condições sociais e ambientais dos dois municípios estudados.

## REFERÊNCIAS

1. Amaral RS, Tauil PL, Lima DD, Engels D. An analysis of the impact of the Schistosomiasis Control Programme in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006; 101(Suppl.I):79-85. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762006000900012>].
2. Espírito-Santo MC, Alvarado-Mora MV, Pinto PL, Sanchez MC, Dias-Neto E, Castilho VL, et al. Comparative Study of the Accuracy of Different Techniques for the Laboratory Diagnosis of Schistosomiasis Mansoni in Areas of Low Endemicity in Barra Mansa City, Rio de Janeiro State, Brazil. *Biomed Res Int* 2015;2015:135689. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/135689>].
3. Drummond SC, Silva LC, Amaral RS, Sousa-Pereira SR, Antunes CM, Lambertucci R. Morbidity of schistosomiasis mansoni in the state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101(suppl 1):37-44. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762006000900007>].
4. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Vigilância da Esquistossomose Mansoni: diretrizes técnicas. 4 ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2014. 144 p.
5. Souza CP, Caldeira RL, Drummond SC, Melo AL, Guimarães CT, Soares DM, et al. Geographical Distribution of *Biomphalaria* Snails in the State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001;96(3):293-302. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762001000300003>].
6. Guimarães RJ, Freitas CC, Dutra LV, Scholte RG, Martins-Bedé FT, Fonseca FR et al. A geoprocessing approach for studying and controlling schistosomiasis in the state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010;105(4):524-31. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762010000400030>].
7. Drummond SC, Pereira SR, Silva LC, Antunes CM, Lambertucci JR. Schistosomiasis control program in the state of Minas Gerais in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010;105(4):519-23. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762010000400029>].
8. Katz N, Carvalho OS. Introdução recente da esquistossomose mansoni no sul do estado de Minas Gerais, Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1983;78(3):281-4. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761983000300006>].
9. Vieira Júnior RS, Hayakawa EH, Pimenta DP, Sousa RL. Sensoriamento remoto aplicado na espacialização de esquistossomose no sul-sudoeste do Estado de Minas Gerais. Anais XVI Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto - SBSR, Foz do Iguaçu, PR, Brasil, 13 a 18 de abril de 2013, INPE. [acesso 2016 Nov 17]. Disponível em: [<http://www.dsr.inpe.br/sbsr2013/files/p0599.pdf>].
10. Pereira DC, Frederico S. Migrantes do café: migração sazonal e relações de produção no município de Campos Gerais/MG. Anais do XVI Encontro Nacional dos Geógrafos. Porto Alegre, RS, 25 a 31 de julho de 2010. [acesso 2016 Set 14]. Disponível em: [[www.agb.org.br/evento/download.php?idTrabalho=1857](http://www.agb.org.br/evento/download.php?idTrabalho=1857)].
11. Souza CA, Freitas RC. Gênero, migração e trabalho temporário: vidas em trânsito pelas lavouras de café do Sul de Minas Gerais. Anais do XXVIII Simpósio Nacional de História. Florianópolis, SC, 27 a 31 de julho de 2015. [acesso 2016 Set 14]. Disponível em: [[www.shh2015.anpuh.org/resources/anais/39/1427199025\\_ARQUIVO\\_Genero,migracaoetrabalhotemporario,vidasemtransitopelaslavourasdecafedoSuldeMinasGerais.pdf](http://www.shh2015.anpuh.org/resources/anais/39/1427199025_ARQUIVO_Genero,migracaoetrabalhotemporario,vidasemtransitopelaslavourasdecafedoSuldeMinasGerais.pdf)].
12. Servidoni LC, Hayakawa EH. Mapeamento da esquistossomose mansônica em vinte e seis municípios da região de Alfenas, MG. Apresentado na 3ª Jornada Científica da Geografia. Alfenas-MG, 3 a 6 de Setembro de 2012. Universidade Federal de Alfenas-MG. [acesso 2016 Set 14]. Disponível em: [<http://www.unifal-mg.edu.br/jornadageografia/files/S03061.pdf>].

13. Pimenta, DP. Avaliação de diferentes metodologias para o diagnóstico parasitológico da esquistossomose mansoni [dissertação de mestrado]. Alfenas (MG): Universidade Federal de Alfenas; 2014. Disponível em: [https://bdt.unifal-mg.edu.br:8443/handle/tede/467].
14. Katz N, Chaves A, Pellegrino J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 1972;14(6):397-400.
15. De Carli GA. Parasitologia clínica: seleção de métodos e técnicas de laboratório para o diagnóstico das parasitoses humanas. 2ª ed. São Paulo: Atheneu, 2007. 906p.
16. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Laboratórios de Saúde Pública. Manual de diagnóstico dos agentes oportunistas: parasitos intestinais e *Pneumocystis jirovecii* / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Laboratórios de Saúde Pública. Brasília: Ministério da Saúde; 2012.
17. Kanamura HY, Silva RM, Chiodelli SG, Glasser CM, Dias LC. IgM-Immunofluorescence test as a diagnostic tool for epidemiologic studies of schistosomiasis in low endemic areas. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002;97(4):485-9. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762002000400005>].
18. Carvalho OS, Massara CL, Rocha RS, Katz N. Esquistossomose mansoni no sudoeste do estado de Minas Gerais (BRASIL). *Rev Saúde Pública*. 1989;23(4):341-4.
19. Engels D, Chitsulo L, Montresor A, Savioli L. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. *Acta Trop*. 2002;82(2):139-46. [DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0001-706X\(02\)00045-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0001-706X(02)00045-1)].
20. Oliveira EJ, Kanamura HY, Lima DM. Efficacy of an enzyme-linked immunosorbent assay as a diagnostic tool for schistosomiasis mansoni. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100(4):421-5. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762005000400013>].
21. Grenfell RF, Martins W, Enk M, Almeida A, Siqueira L, Silva-Moraes V, et al. *Schistosoma mansoni* in a low-prevalence area in Brazil: the importance of additional methods for the diagnosis of hard-to-detect individual carriers by low-cost immunological assays. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013;108:328-34. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762013000300011>].
22. Gargioni C, Silva RM, Thomé CM, Quadros CM, Kanamura HY. Utilização de método sorológico como ferramenta diagnóstica para implementação da vigilância e controle da esquistossomose no município de Holambra, São Paulo, Brasil. *Cad Saúde Pública*. 2008;24:373-79. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2008000200016>].
23. Silva PC, Domingues AL. Aspectos epidemiológicos da esquistossomose hepatoesplênica no Estado de Pernambuco, Brasil. *Epidemiol Serv Saúde*. 2011;20(3):327-36. [DOI: <http://dx.doi.org/10.5123/S1679-49742011000300007>].
24. Saucha CVV, Silva JAM, Amorim LB. Condições de saneamento básico em áreas hiperendêmicas para esquistossomose no estado de Pernambuco em 2012. *Epidemiol Serv Saúde*. 2015;24(3):497-506. [DOI: <http://dx.doi.org/10.5123/S1679-49742015000300015>].
25. Scholte RG, Gosoni L, Malone JB, Chammartin F, Utzinger J, Vounatsou P. Predictive risk mapping of schistosomiasis in Brazil using Bayesian geostatistical models. *Acta Trop*. 2014;132:57-63. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.12.007>].



# Método espectrofotométrico na região UV a 205 nm para determinação de íon nitrato em água: validação

## Spectrophotometric method in UV region at 205 nm for determination of nitrate ion in water: validation

RIALA6/1731

Maria Anita SCORSFAVA\*, Arlete de SOUZA, Gisele Letícia ALVES

\*Endereço para correspondência: Núcleo de Águas e Embalagens, Centro de Contaminante, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira César, São Paulo, SP, Brasil, CEP 01246-000. Tel: 11 3068 2918. E-mail: mscorsaf@ial.sp.gov.br

Recebido: 08.03.2017 - Aceito para publicação: 16.10.2017

### RESUMO

Este estudo teve por objetivo validar o método espectrofotométrico na região ultravioleta (205 nm) para determinação de nitrato em água para consumo humano e de diálise, bem como calcular sua incerteza associada. A linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram avaliados de acordo com o documento de orientação INMETRO DOQ-CGCRE-008. Os resultados obtidos utilizando água de abastecimento indicaram que a matriz não tem efeito significativo sobre a seletividade do método. A exatidão e a repetitividade foram avaliadas com três níveis de concentração do analito na água de abastecimento, na água de diálise e em material de referência certificado, apresentando resultados satisfatórios para todas as matrizes utilizadas. Os limites de detecção e quantificação foram de 0,074 e 0,248 mg/L de nitrato, respectivamente. O método mostrou-se adequado para determinação de nitrato em água de abastecimento e em água de diálise.

**Palavras-chave.** nitrato, água para consumo humano, diálise, validação.

### ABSTRACT

This study validated the spectrophotometric method in ultraviolet region (205 nm) for determining nitrate in water used for human consumption and dialysis procedure and to calculate its associated uncertainty. The linearity, selectivity, precision, accuracy, limit of detection (LD) and limit of quantification (LQ) were evaluated according to the INMETRO DOQ-CGCRE-008. The results obtained using water supply indicated that the matrix has no significant effect on the selectivity of the method. Accuracy and repeatability were evaluated using three different levels of analyte concentration in the supply water, in the dialysis water and in the certified reference material, showing satisfactory results at all matrices used. The limits of detection and of quantification were 0.074 and 0.248 mg/L of nitrate, respectively. The method proved to be adequate for determining nitrate in water supply and dialysis water.

**Keywords.** nitrate, water for human consumption, dialysis, validation.

## INTRODUÇÃO

Entre os ânions mais comuns encontrados em águas, o nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) tem importância devido a sua toxicidade; em conjunto com nitrito, o nitrato está associado à indução da metemoglobinemia e a formação potencial de nitrosaminas e nitrosamidas carcinogênicas<sup>1</sup>. O nitrato pode estar presente tanto nas águas superficiais como nas subterrâneas, como consequência da atividade da agricultura, da eliminação de águas residuais e da oxidação de resíduos de produtos nitrogenados em fertilizantes agrícolas, excrementos humanos e animais, incluindo fossas<sup>2</sup>.

Na água de diálise, o nitrato é um dos íons que devem ser monitorados para garantir sua qualidade, portanto o tratamento inadequado da água, pode colocar em risco a vida e a segurança de pacientes com insuficiência renal sob tratamento<sup>3</sup>. De acordo com a RDC nº 11/2014<sup>4</sup> da ANVISA, o limite máximo permitido (LMP) de nitrato na água de diálise é 2 mg/L expresso na forma de N, que equivale a 8,8 mg/L de nitrato<sup>4</sup>.

O método recomendado para determinação de nitrato pelo *Standard Method for Examination of Water and Wastewater* (2012)<sup>5</sup> é o espectrofotométrico, com detecção UV em 220 e 275 nm. Porém, na literatura há relatos de detecção espectrofotométrica do nitrato em outros comprimentos de onda.

Mazon et al<sup>6</sup> avaliaram quatro métodos para determinação de nitrato em água natural envasada: método colorimétrico (I), espectrofotométrico UV a 205 nm (II), espectrofotométrico UV a 205 nm modificado (III) e espectrofotométrico UV a 220/275 nm (IV). Foi observado que os métodos espectrofotométricos UV a 220/275 nm (IV) e UV a 205 nm (II) apresentam características de desempenho estatisticamente adequadas para análise de rotina laboratorial, além de serem métodos de fácil execução, pois utilizam reagente único e apresentam resultados imediatos na determinação de nitratos em águas com baixo teor de matéria orgânica, pois embora sejam simples e de baixo custo, estão sujeitos à presença de interferentes, como cloreto e matéria orgânica<sup>5</sup>.

Souto et al<sup>7</sup> avaliaram as interferências espectrais na determinação de nitrato em água por métodos espectrofotométricos nas regiões 220 nm (com correção para a presença da matéria orgânica em 275 nm) e

205 nm; observaram a interferência do íon cloreto em concentrações acima de 50 mg/L no segundo método.

Tanto Mazon et al<sup>6</sup> como Souto et al<sup>7</sup> utilizaram leitura direta da absorbância em amostra de água, com adição de ácido clorídrico 1,0 M, em espectrofotômetro a 205 nm, porém não avaliaram a seletividade nas matrizes de interesse e precisão/exatidão em água de diálise.

Por definição, validar um método analítico é confirmar - por exame e fornecimento de evidência objetiva - que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos<sup>9</sup>. Na validação, o parâmetro seletividade é o grau que o método pode quantificar o analito de interesse na presença de outros analitos, matrizes ou outro material potencialmente interferente; os experimentos que avaliam esse parâmetro envolvem ensaios com padrões ou materiais de referência, amostras com e sem o analito, além da avaliação da capacidade de identificação do analito de interesse na presença de interferentes.

Ainda, para um ensaio ser acreditado na norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005<sup>10</sup>, deve utilizar método validado e com incerteza envolvida na medição estimada, a qual caracteriza a dispersão dos valores<sup>11</sup>, sendo um indicativo quantitativo da qualidade do resultado analítico e influencia a tomada de decisão para verificar a conformidade do mesmo frente a um limite ou a uma especificação<sup>12</sup>.

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi validar um método espectrofotométrico na região do UV (205 nm) para determinação de íon nitrato e calcular a incerteza associada contribuindo assim, para o aprimoramento da técnica analítica já utilizada por Laboratório de Saúde Pública na avaliação da qualidade da água quanto ao íon nitrato.

## MATERIAL E MÉTODO

### Amostras

As matrizes utilizadas na validação consistiram de:

- a) Água ultrapura (18 $\Omega$ m)
- b) Água para consumo humano, coletada da rede de abastecimento público diretamente da torneira do laboratório, em frascos de vidro previamente lavados com água clorada (0,5%), enxaguados com água ultrapura e secos;



- c) Água tratada para diálise, coletada em serviços de diálise no âmbito do Programa Estadual de Hemodiálise e,
- d) Material de referencia certificado (MRC) ERM – CA016a (lote a), que consistiu de amostra de água potável com valor declarado igual a 48 mg/L de nitrato e incerteza expandida de 3,0 mg/L.

### Solução padrão

Solução padrão de nitrato (grau cromatográfico)  $1,002 \pm 4 \mu\text{g mL}^{-1}$ , da marca *Inorganic Venture*, certificada de acordo com a Norma ABNT ISO Guia 34:2016<sup>13</sup>: utilizada para preparar a solução estoque de 100 mg/L, a partir da qual foram preparadas soluções de teste com as seguintes concentrações: 0,10; 0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 4,00; 6,00 mg/L, em água ultrapura (18  $\Omega\text{m}$ ).

### Reagentes

Foram utilizados ácido clorídrico, cloreto e sódio e ácido húmico, todos apresentando grau analítico.

### Equipamentos e vidrarias

Todos os equipamentos e vidrarias utilizados no estudo estavam adequadamente calibrados pela Rede Brasileira de Calibração (RBC).

## MÉTODO

Foram transferidos 25 mL da amostra para balão volumétrico de 25 mL, sendo adicionado 0,25 mL de ácido clorídrico 1,0 M, com posterior homogeneização. O mesmo procedimento foi realizado para as soluções padrão e o branco da análise (utilizada água ultrapura (18 $\Omega\text{m}$ )). As leituras de absorbância foram realizadas em 205 nm, em espectrofotômetro UV/Vis modelo Orion Aquamate 8000 marca Thermo Scientific.

### Parâmetros de Validação

Os parâmetros de validação foram avaliados de acordo com documento orientativo INMETRO DOQ-CGCRE-008<sup>9</sup>, AOAC<sup>14</sup> e *Codex Alimentarius*<sup>15</sup>, sendo os dados analisados por meio da “Planilha de Validação versão 1”, desenvolvida pelo Núcleo de Análise e Tratamento e Dados do Centro de Materiais de Referência do Instituto Adolfo Lutz.

### Linearidade e faixa de trabalho

Para a construção da curva de calibração, foram preparadas três replicatas independentes de solução teste contendo sete níveis de concentração de nitrato (n=27): 0,10; 0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 4,00 e 6,00 mg/L, em água ultrapura.

Inicialmente, foram verificadas a ausência de valores discrepantes pelo teste de Grubbs e a homocedasticidade (igualdade das variâncias) pelo teste de Cochran (99% de confiança)<sup>9</sup>.

A linearidade foi avaliada por análise de regressão linear, com ajuste dos dados pelo método dos mínimos quadrados (MMQ), sendo a significância da regressão e o desvio da linearidade (falta de ajuste) verificados por análise de variância (ANOVA) univariada e os critérios de aceitação utilizados foram: coeficiente de correlação ( $R^2 \geq 0,995$ ); regressão linear significativa ( $p \leq 0,05$ ) e falta de ajuste não significativa ( $p > 0,05$ ).

### Seletividade

#### a) Efeito da matriz

Foram comparadas as inclinações das curvas de calibração obtidas para o branco do ensaio (Grupo 1: água ultrapura) e para a matriz água de abastecimento (Grupo 2). Para os dois grupos, foram preparadas triplicatas independentes, adicionadas de concentrações idênticas da solução padrão de nitrato e incluíram ponto de análise não adicionado de solução padrão, conforme descrito a seguir;

Grupo 1: Água ultrapura + adição de padrão de analito, para obter seis níveis de concentração (0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 6,0 mg/L de nitrato);

Grupo 2: Água de abastecimento + adição de padrão de analito, para obter seis níveis de concentração (0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 6,0 mg/L de nitrato).

Foram realizados teste F para avaliar a homogeneidade das variâncias dos resíduos da regressão (equação 1) e o teste *t Student* para avaliar a equivalência da inclinação das curvas (equação 2) com 95 % de confiança. Se as inclinações dessas duas curvas de regressão linear não diferirem significativamente, não há efeito de matriz.

$$F_{\text{calculado}} = s^2_{\text{res1}} / s^2_{\text{res2}} \quad (\text{equação 1})$$

Onde  $s^2_{\text{res1}}$  e  $s^2_{\text{res2}}$  são as variâncias dos resíduos a regressão de cada grupo, com maior variância, respectivamente.

$$t_{\text{ calculado}} = \frac{|b_1 - b_2|}{\sqrt{(s^2 \text{ res}_1 / Sxx_1) + (s^2 \text{ res}_2 / Sxx_2)}}$$

(equação 2)

Onde:

$b_1$  = coeficiente de inclinação da reta de regressão do grupo 1

$b_2$  = coeficiente de inclinação da reta de regressão do grupo 2

$Sxx_1$  = somatória das diferenças quadráticas entre as concentrações das soluções padrão e a concentração média (grupo 1)

$Sxx_2$  = somatória das diferenças quadráticas entre as concentrações das soluções padrão e a concentração média (grupo 2)

#### b) Presença de interferentes

Também foi realizada a avaliação da amostra na presença de interferentes, considerando que nessa faixa espectral a matéria orgânica dissolvida e alguns íons normalmente encontrados em água natural, como cloretos, podem interferir na detecção de nitrato. Para o estudo da seletividade foram analisados, separadamente, o interferente cloreto ( $Cl^-$ ) e o ácido húmico que foram adicionados em água de abastecimento público em sete replicatas independentes para cada nível de concentração: fortificação de 50, 100, 150 e 200 mg/L de cloreto; fortificação de 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 6,0 mg/L de ácido húmico. Os resultados (absorbância) da matriz sem (grupo 1) e com adição de interferentes (grupo 2) foram analisados, para cada nível de concentração. Utilizou-se o teste F para avaliar a homogeneidade, sendo que se  $p \geq 0,05$ , as variâncias dos grupos são estatisticamente iguais. Utilizou-se então o teste t para avaliar a equivalência das médias dos grupos com 95% de confiança. Se  $t_{\text{ calculado}} < t_{\text{ crítico}}$  (bicaudal com 12 graus de liberdade), a média das duas populações são estatisticamente iguais e, portanto, o interferente adicionado não tem efeito significativo sobre o resultado do ensaio, ou seja, o método é seletivo. A análise estatística dos dados foi realizada no software *Excel 2010*<sup>®</sup>.

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

Foram avaliadas seis replicatas independentes de água ultrapura (branco) fortificada com 0,5 mg/L

de nitrato. Os limites foram calculados de acordo com as equações 3 e 4:

Limite de detecção:  $LD = 0 + 3s$  (equação 3)

Limite de quantificação:  $LQ = 0 + f.s$  (equação 4)

Onde:

$s$  = desvio das amostras-branco fortificadas;

$f$  = fator adotado de acordo com avaliação crítica do analista (5, 6 ou 10).

#### Exatidão

Para a avaliação da exatidão do método, foram analisadas seis replicatas do material de referência certificado (MRC) de água potável. Os dados obtidos foram avaliados calculando-se o *Z score* (equação 5) e o erro relativo normalizado (equação 6), sendo os resultados considerados exatos quando  $Z \text{ score} \geq 2$  e o erro normalizado  $\leq 1\%$ .

$$|Z| = \frac{|X_{lab} - X_v|}{u_{MRC}} \quad (\text{equação 5})$$

Onde:

$|Z|$  = valor de z score;  $X_{lab}$  = valor médio das replicatas;  $X_v$  = valor aceito como verdadeiro = valor certificado no material do MRC;

$u_{MRC}$  = incerteza padrão do valor certificado do material de referência.

$$E_n = \frac{|X_{lab} - X_v|}{\sqrt{U_{lab}^2 - U_{ref}^2}} \quad (\text{equação 6})$$

Onde:

$E_n$  = erro normalizado;

$U_{lab}$  = incerteza expandida dos resultados do processo de medição do laboratório;

$U_{ref}$  = incerteza expandida associada ao MRC.

A exatidão também foi determinada pela recuperação das concentrações de nitrato adicionadas nas amostras, em três níveis de concentração correspondendo a 1; 1,5 e 2 vezes o limite mínimo de desempenho do método (0,5 mg/L de nitrato), em triplicatas independentes ( $n=9$ ) para água de abastecimento e diálise; sendo utilizado como critério de

aceitação a porcentagem de recuperação (equação 7) entre 80-110%, de acordo com AOAC<sup>14</sup>.

$$\text{Recuperação \%} = \left( \frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad (\text{equação 7})$$

Onde:

$C_1$  = concentração do analito na amostra fortificada;  
 $C_2$  = concentração do analito na amostra sem fortificação;  
 $C_3$  = concentração do analito adicionada na fortificação.

### Repetibilidade

A repetibilidade foi determinada pela porcentagem do coeficiente de variação em amostras fortificadas com nitrato, em três níveis de concentração correspondendo a 1; 1,5 e 2 vezes o limite mínimo de desempenho do método (0,5 mg/L de nitrato), em triplicatas independentes (n=9) para água de abastecimento e diálise. Utilizou-se como critério de aceitação a porcentagem do coeficiente de variação (equação 8) menor que 8% de acordo com AOAC<sup>14</sup>.

$$CV\% = RSD = s/\bar{x} \quad (\text{equação 8})$$

Onde:

CV% = RSD = porcentagem do coeficiente de variação = desvio padrão relativo;

s = desvio padrão;  $\bar{x}$  = média

### Incerteza da Medição

O cálculo da incerteza da medição foi realizado de acordo com Eurachem/Citac<sup>16</sup>, utilizando-se a abordagem subanalítica que permite estimar a contribuição de cada fonte de incerteza identificada para a incerteza da medição calculada, o que pode ser usada para otimizar o método analítico do ponto de vista metrológico<sup>17</sup>. Foram consideradas fontes de incerteza: volume da amostra, volume do branco, padrões de calibração, regressão da curva analítica com ajuste linear, equipamento (espectrofotômetro) e repetibilidade. A equação da incerteza da concentração de nitrato é descrita na equação 9.

$$u_{NO_3^-} = \sqrt{u_{va}^2 + u_{vb}^2 + u_{pad}^2 + u_{reg}^2 + u_{equi}^2 + u_{repet}^2}$$

(equação 9)

Onde:

$u$  = incerteza-padrão;  $u_{va}$  = incerteza do volume da amostra;  $u_{vb}$  = incerteza do volume do padrão;  
 $pad$  = padrão;  $reg$  = regressão;  $equi$  = equipamento;  
 $repet$  = repetibilidade.

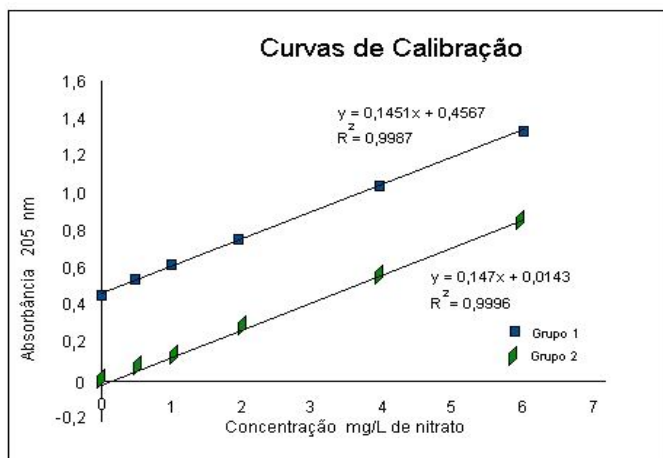
## RESULTADOS E DISCUSSÕES

As concentrações 0,10 e 0,25 mg/L de nitrato não apresentaram boa reprodutibilidade, portanto, foi avaliada a linearidade a partir de 0,50 mg/L de  $NO_3^-$ . Os dados da curva analítica, resultante da média de três curvas padrão, foram ajustados por análise de regressão linear e o teste unilateral de variância (ANOVA) avaliou a qualidade do ajuste do modelo linear (**Tabela 1**). A análise dos dados da linearidade demonstrou ser a regressão altamente significativa ( $p = 4,12 \times 10^{-26}$ ), bem como não foi evidenciada a falta de ajuste do modelo (0,633) no nível de 95% de confiança de acordo com os critérios adotados. Portanto, o método analítico possui faixa de linearidade entre as concentrações de 0,50 e 6,00 mg/L de nitrato.

**Tabela 1.** Dados referentes a linearidade do método

Parâmetros	Resultados
Faixa de linearidade	0,5 - 6,0 mgNO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /L,
Equação: y = ax + b	y = 0,1481x - 0,0198
Intercepto (b) ± desvio padrão	-0,0198 ± 0,0017
Inclinação (a) ± desvio padrão	0,1481 ± 0,0005
Coefficiente de correlação (R <sup>2</sup> )	0,9987
Valor p regressão	4,12 x 10 <sup>-26</sup>
Valor p falta de ajuste	0,633

Na **Figura 1** encontram-se os resultados do teste de seletividade. Os resultados do teste F indicaram que as variâncias dos grupos são estatisticamente diferentes ( $p \leq 0,05$ ) e o teste t indicou que as inclinações da regressão dos dois grupos são estatisticamente iguais, isto é, a matriz (água de abastecimento) não tem um efeito significativo sobre o resultado do ensaio.

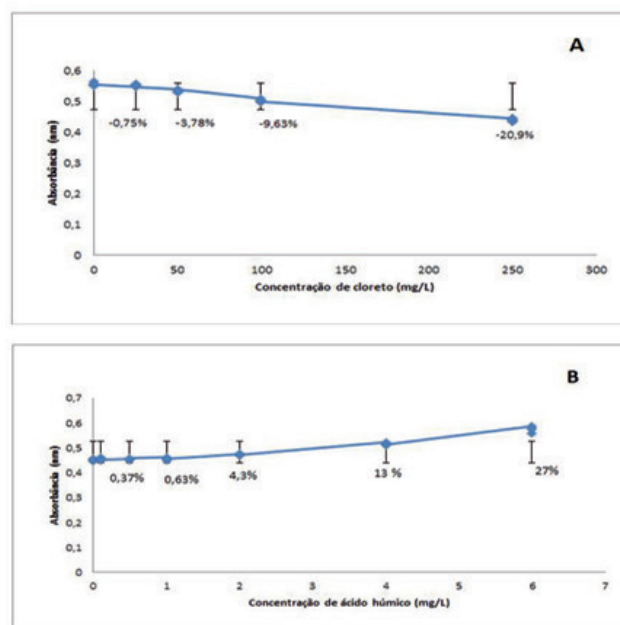


**Figura 1.** Concentração de nitrato (mg/L) versus leitura de absorbância para os grupos 1 (água ultrapura) e grupo 2 (água de abastecimento)

A avaliação da amostra na presença de interferentes, realizada de acordo com documento INMETRO DOQ-CGCRE-008<sup>9</sup>, demonstrou que nas amostras fortificadas com cloreto a partir da adição de 50 mg/L de cloreto, há diferença significativa na leitura de absorbância, para o nível de significância de 95%. A partir dessa concentração, pode ser previsto um erro relativo negativo crescente em função do aumento da concentração do cloreto. Observou-se um erro relativo médio de -3,78 % e -9,64% em amostras fortificadas com 50 e 100 mg/L, respectivamente (**Figura 2**), ou seja, o erro é mais pronunciado a partir da presença de 100 mg/L do interferente.

Como foi observada a interferência do cloreto no método de determinação de nitrato por leitura direta em 205 nm da amostra acidificada, foram realizadas análises para determinação de cloreto por cromatografia de íons no período de julho de 2015 a março de 2016 em 303 amostras do Programa de Vigilância da Qualidade da Água para consumo Humano (PROÁGUA) e 145 amostras de hemodíalise do Programa Estadual de Monitoramento da Água Tratada para Diálise. Verificou-se que o teor médio de cloreto (e seus desvios padrões) foi de  $8,06 \pm 3,59$  e  $0,971 \pm 1,068$  mg/L em água de abastecimento e água de diálise, respectivamente. Portanto, a concentração de cloreto média obtida nas análises para água de abastecimento foi aproximadamente 6,25 vezes menor que a concentração que poderia interferir na resposta da análise do método proposto.

A interferência da presença de até 1,0 mg/L de ácido húmico foi considerada não significativa ( $\alpha = 5\%$ )<sup>3</sup>; entretanto, a partir da adição de 2,0 mg/L pode ser previsto um erro relativo positivo crescente com aumento da concentração de ácido húmico (**Figura 2**).



**Figura 2.** Influência da presença do íon cloreto (A) e ácido húmico (B) na determinação de nitrato pelo método espectrofotométrico (205 nm) em água de abastecimento. Cada ponto no gráfico representa os valores de absorbância das replicatas, e apresenta a barra de erro do desvio-padrão e a porcentagem de erro relativo de cada concentração avaliada

Os resultados obtidos foram semelhantes aos de Souto et. al<sup>7</sup>, que indicaram interferência do cloreto em concentrações acima de 50 mg/L e de compostos orgânicos na determinação de nitrato pelo método espectrofotométrico a 205 nm, em água deionizada; apesar deste estudo ter sido realizado em amostras de água de abastecimento, os resultados obtidos indicaram que a matriz não tem um efeito significativo nas medidas de absorbância, além do fato que os dados obtidos de programas indicaram que a concentração de cloreto encontrada, tanto em água de abastecimento como de diálise, não levaria a um erro na quantificação de nitrato pelo método proposto.

A sensibilidade do método foi analisada através da determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), tendo sido verificados valores de 0,0744 e 0,248 mg/L, respectivamente, sendo que foi adotado o fator 10 para o cálculo do LQ (equação 4). Como os limites calculados encontraram-se abaixo da faixa de trabalho, o LQ correspondeu ao padrão de calibração de menor concentração (0,5 mg/L  $\text{NO}_3^-$ ).

De acordo com *Codex Alimentarius*<sup>15</sup>, o limite de quantificação deverá ser 1/5 do valor do limite máximo permitido (VMP) quando esse valor for  $\geq 0,1$  mg/kg (1/5 x VMP). Considerando-se o valor máximo permitido (VMP) para nitrato de acordo com a Portaria nº 2914/2011 é de 10 mg/L expresso em N (equivalente a 44,4 mg/L de  $\text{NO}_3^-$ ) e da Resolução RDC nº11/2014 é de 2 mg/L expresso em N (equivalente a 8,8 mg/L de  $\text{NO}_3^-$ ), o limite de quantificação atende as necessidades de aplicação do método<sup>18,4</sup>.

Os valores obtidos das porcentagens de recuperação e coeficiente de variação (CV) das amostras fortificadas (**Tabela 2**), nas três faixas de concentração analisadas e nas duas matrizes, foram satisfatórios de acordo com os critérios de aceitação: 80 a 110% de recuperação e  $\text{CV}(\%) < 8\%$  (AOAC)<sup>14</sup>.

Para o material de referência certificado com valor declarado igual a 48 mg/L e incerteza expandida de 3,0 mg/L (ERM -CA016a,- água potável), observou-se que a porcentagem de recuperação e o coeficiente de variação foram, respectivamente, 103% e 1,30%, portanto adequados, considerando-se os critérios de aceitação em relação a concentração do analito estabelecidos pela AOAC<sup>14</sup> e acima citados. Ainda, os resultados do índice Z (1,13) e do erro relativo (normalizado) 0,401 para intervalo de confiança de 95%, indicaram que a média

das replicatas é estatisticamente equivalente ao valor de propriedade certificado e consequentemente, o método é considerado suficientemente exato.

Comparando-se os resultados obtidos no presente trabalho (**Tabelas 1 e 2**) com os do método analítico espectrofotométrico recomendado pelo APHA<sup>5</sup> para leitura em 220 e 275 nm, em águas naturais, com faixa de linearidade entre 0-7 mg/L, porcentagem de recuperação entre 96-102% e  $\text{CV}(\%)$  médio de 2%, foi observado que o método proposto apresentou capacidade similar de determinar o analito em questão<sup>6</sup>.

O nitrato pode ser determinado em água para consumo humano por método espectrofotométrico na região do visível através das reações com desenvolvimento de cor, como o método baseado na formação de íons nitrônio ( $\text{NO}_2^-$ ) em meio ácido e posterior reação com salicilato de sódio em meio básico para formar um composto nitrobenzóico de cor amarela, que é aplicado em águas minerais e que apresenta linearidade de 0,096 a 3,86 mg/L de nitrato e porcentagem de recuperação entre 88 e 106% e  $\text{CV}(\%)$  inferior a 4%<sup>19</sup> – ou métodos que envolvem a redução do nitrato em nitrito e posterior reação para obtenção de compostos coloridos, como a redução na presença de Zn/NaCl e posterior reação com ácido sulfanílico para formar composto colorido com absorção máxima em 493 nm – este método, aplicado a amostras de água de abastecimento público, apresentou porcentagem de recuperação entre 98-99%<sup>20</sup>. Os resultados obtidos neste estudo demonstram capacidade similar entre o método proposto e os métodos colorimétricos, porém, estes últimos demandam maior tempo de análise, necessitam maior quantidade de reagentes e produzem maior quantidade de resíduos.

**Tabela 2.** Resultados da porcentagem de recuperação e coeficiente de variação das águas fortificadas com três níveis de concentração

Concentração do analito adicionado (mg/L)	Tipo de matriz	% de Recuperação	% Coeficiente de variação (CV)
0,50	aa	89,30	2,65
0,50	ah	103,0	3,92
0,75	aa	97,0	0,49
0,75	ah	96,7	2,85
1,00	aa	94,2	0,83
1,00	ah	99,7	4,67

aa: água de abastecimento; ah: água de hemodiálise; três replicatas

**Tabela 3.** Fontes de incerteza e respectivas porcentagens de contribuição para a incerteza total

Fonte de Incerteza	Incerteza padrão ( $u_{xi}$ )	Unidade	Distribuição	Graus de liberdade	% Contribuição
Padrão 0,5	0,0014	mg/L	Normal	$\alpha$	0,1
Padrão 1,0	0,0031	mg/L	Normal	$\alpha$	0,7
Padrão 2,0	0,0062	mg/L	Normal	$\alpha$	2,8
Padrão 4,0	0,0110	mg/L	Normal	$\alpha$	8,8
Padrão 6,0	0,0160	mg/L	Normal	$\alpha$	18,7
Regressão da curva analítica	0,0283	mg/L	Normal	13	58,2
Volume branco	0,0018	L	retangular	$\alpha$	0,3
Volume amostra	0,0018	L	retangular	$\alpha$	0,3
Equipamento (espectrofotômetro)	0,0006	uA	retangular	$\alpha$	0,0
Repetibilidade	0,0118	mg/L	Normal	5	10,1
Total	0,0371			$(v_{eff})=36$	100%

A quantificação das incertezas padrão relativa de cada fonte, seus valores e sua porcentagem de contribuição para a incerteza total encontram-se na **Tabela 3**. Observa-se que a maior contribuição para a incerteza total da concentração de nitrato em água está associada à regressão da curva analítica. Considerando-se os graus de liberdade efetivo ( $v_{eff}$ ), obtém-se um valor de abrangência ( $k$ ) igual a aproximadamente 2,07 para um nível de confiança de 95%. A incerteza expandida associada a concentração de nitrato é obtida multiplicando-se a incerteza-padrão combinada pelo fator de abrangência,  $k = 2,07$ , considerando-se nível de significância de 95% (equação 10)

$$\mu c_{NO_3} = u c_{NO_3} \times k = 0,0371 \times 2,07 = 0,1 \text{ mg (equação 10)}$$

Para o cálculo da incerteza associada à regressão da curva analítica com ajuste linear para concentração de nitrato foi utilizada uma amostra de água de abastecimento (determinada em triplicata) com concentração média de 2,6 mg/L de  $NO_3^-$ . Portanto, o resultado da concentração de nitrato em água foi de  $2,6 \pm 0,1$  mg/L, com um nível de confiança de 94,5%. Dessa forma, a porcentagem relativa da incerteza expandida é de 3,0%.

Lopez-Moreno et al<sup>21</sup> determinaram a incerteza expandida de soluções de nitrato de

três concentrações distintas (em água ultrapura) utilizando o método de cromatografia de íons; para soluções de 1 e 20 mg/L de  $NO_3^-$ , foram obtidos valores de incerteza expandida de 0,7 e 0,9 mg/L, respectivamente. Ou seja, incertezas expandidas de 16,99% e 5,00%. Comparando-se os resultados obtidos neste estudo, observou-se incerteza inferior, porém, deve-se considerar no trabalho citado foi utilizada uma abordagem conservadora e incluídos a exatidão e a reprodutibilidade como fontes de incerteza para a cromatografia de íons. Como observado na **Tabela 3**, a maior fonte de incerteza é a regressão da curva, no caso da cromatografia de íons a curva analítica utilizada tinha maior extensão (0,50 a 100 mg $NO_3^-$ /L) o que poderia explicar esse maior valor de incerteza.

## CONCLUSÃO

O método analítico espectrofotométrico proposto foi validado e demonstrou ser simples, rápido, seletivo, preciso e exato para determinação de nitrato em água de abastecimento e em água de diálise, em atendimento às respectivas legislações, Portaria nº 2914/2011 do Ministério da Saúde<sup>18</sup> e Resolução RDC nº 11/2014 da Anvisa<sup>4</sup>, desde que a concentração de íons cloreto na água sejam inferiores a 50 mg/L e apresenta limites de detecção e quantificação de

0,07 e 0,50 mg/L de nitrato, respectivamente. Os dados indicam que esse método é eficaz e pode auxiliar na avaliação da qualidade da água em programas como o PROAGUA e Programa Estadual de Monitoramento de Água Tratada para Diálise.

## AGRADECIMENTOS

Agradecimentos ao Prof. Dr. Jaim Lichtig pelo incentivo no desenvolvimento desta metodologia.

## REFERÊNCIAS

1. Bruning-Fann CS, Kaneene JB. The effects of nitrate, nitrite and N-nitroso compounds on human health: a review. *Vet Hum Toxicol*.1993;35(6):521-38.
2. World Health Organization – WHO. Guidelines for drinking water quality. 4<sup>th</sup> ed. Geneva: World Health Organization; 2011.
3. Simões M, Brígido BM, Mazon EMA, Pires MFC. Água de diálise: parâmetros físico-químicos na avaliação do desempenho das membranas de osmose reversa. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2005;64(2):173-8.
4. Brasil. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 11 de 13 de março de 2014. Dispõe sobre os requisitos de Boas Práticas de Funcionamento para os serviços de Diálise. *Diário Oficial [da] União*. Brasília, DF, 14 mar. 2014. Seção 1, nº 50. p.40-2.
5. American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22<sup>th</sup> ed. Washington, DC: APHA; 2012.
6. Mazon EMA, Oliveira ACG, Brígido BM, Freitas VPS. Estudo comparativo de métodos para determinação de nitrato em águas para consumo humano. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2005;64(1):110-6.
7. Souto MAM, Okada MM, Okada IA, Dovidauskas S. A determinação de nitrato em águas por espectrofotometria UV: usos e precauções. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2006;65(1):66-69.
8. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo – Brasil). Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4<sup>a</sup> ed. [1<sup>a</sup> ed. digital]. São Paulo (SP): Instituto Adolfo Lutz; 2008.
9. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO. DOQ-CGCRE-008 - Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos. Rio de Janeiro (RJ): Coordenação Geral de Acreditação; 2016.
10. Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT. NBR ISO/IEC 17025:2005. Requisitos gerais para a competência para laboratórios de ensaio e de calibração. Rio de Janeiro: ABNT; 2005.
11. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO. Vocabulário Internacional de Metrologia. Conceitos Fundamentais e Gerais e Termos Associados - VIM. 1<sup>a</sup> ed. Luso Brasileira. Rio de Janeiro: Inmetro, 2012. Disponível em: [[http://www.inmetro.gov.br/inovacao/publicacoes/vim\\_2012.pdf](http://www.inmetro.gov.br/inovacao/publicacoes/vim_2012.pdf)].
12. Oliveira CC, Kira CS, Trujillo LM, Carvalho MFH, Caruso MSF, Silva AS et al. Incerteza de medição em ensaios físico-químicos: uma abordagem prática. 1<sup>a</sup>ed. São Paulo: SES-SP; 2015. 140p.
13. Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT. NBR ISO/IEC17034:2016. Requisitos Gerais para a competência de produtores de material de referência. Rio de Janeiro: ABNT; 2016.
14. Association of Official Analytical Chemists – AOAC. Official Methods of Analysis. Apêndix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. 19<sup>th</sup> ed. Washington: AOAC International; 2016. p.1-18. Disponível em: [[http://www.eoma.aoac.org/app\\_f.pdf](http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf)].
15. Codex Alimentarius Commission. Procedural Manual. 21<sup>th</sup> ed. Rome: World Health Organization-FAO-Food and Agriculture Organization of United Nation; 2013. Disponível em: [<http://www.fao.org/3/a-i3243e.pdf>].
16. Ellison, SLR, Williams A, editors. Eurachem/Citac Guide. Quantifying uncertainty in analytical measurement. 3<sup>th</sup> ed. CITAC; 2012. Disponível em [[https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012\\_P1.pdf](https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012_P1.pdf)].
17. Rodrigues JFP. Otimização da incerteza da determinação, por cromatografia iônica, da composição maioritária e vestigial de soluções salinas [dissertação de mestrado]. Lisboa: Universidade de Lisboa; 2012. Disponível em: [[http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/9226/1/ulfc104693\\_tm\\_Joana\\_Rodrigues.pdf](http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/9226/1/ulfc104693_tm_Joana_Rodrigues.pdf)].

18. Brasil. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Portaria nº 2914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial [da] União. Brasília, DF, 14 dez 2011. Seção 1, nº 239. p.39-46.
19. Monteiro MIC, Ferreira FN, De Oliveira NMM, Ávila AK. Simplified version of the sodium salicylate method for analysis of nitrate in drinking waters. *Anal Chim Acta*. 2003;477:125-9.
20. Narayana B, Sunil K. A spectrophotometric method for the determination of nitrite and nitrate. *Eurasian J Anal Chem*. 2009;4(2):204-14.
21. Lopez-Moreno CP, Vieira I, Urbano AM. Validation of an ion chromatographic method for the quantification of anions in water. *Desalination*. 2010;261:111-6. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.desal.2010.05.022>].





# Antifungal activity of geraniol and citronellol against food-relevant dematiaceous fungi *Cladosporium* spp.

## Atividade antifúngica de geraniol e citronelol frente a fungos dematiáceos de importância para os alimentos do gênero *Cladosporium* spp.

RIALA6/1732

Aldeir Sabino dos SANTOS<sup>1</sup>, Gezaílido Santos SILVA<sup>1</sup>, Kaltz Victor Souza SILVA<sup>1</sup>, Maria Islaine de Oliveira LIMA<sup>1</sup>, Juliana Moura Mendes ARRUA<sup>3</sup>, Edeltrudes de Oliveira LIMA<sup>2</sup>, Fillipe de Oliveira PEREIRA<sup>1\*</sup>

\*Correspondence to: <sup>1</sup>Centro de Educação e Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, Sítio Olho D'Água da Bica, s/n, Zona Rural, Cuité, PB, Brasil, CEP: 58175-000. Tel: 55 83 3372 1900. Email: fillipeopereira@ufcg.edu.br

<sup>2</sup>Laboratório de Micologia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba, Campus Universitário Castelo Branco, João Pessoa, PB, Brasil

<sup>3</sup>Centro Multidisciplinar de Investigações Tecnológicas, Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguay

Recebido: 11.12.2016 - Aceito para publicação: 09.10.2017

### ABSTRACT

*Cladosporium* spp. is a group of dematiaceous food-relevant fungi which are well dispersed in the environment causing food spoilage and poisoning. Considering the importance of fungal contamination, natural drugs to control their growth have become important. Thus, the aim of this study was to evaluate the inhibitory effects of two monoterpenoids, (geraniol and citronellol), against strains of *Cladosporium carrioni*, *C. cladosporioides*, and *C. oxysporum*. Methods: The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicide Concentration (MFC) of the drugs were determined by microdilution. The effects of test drugs on mycelial dry weight, conidia germination, and conidiogenesis of *Cladosporium* spp. were also investigated using a hemacytometer. Respective MIC and MFC values of citronellol varied from 256 to 512 µg/mL, and from 256 to 2048 µg/mL. The MIC and MFC of geraniol varied similarly to citronellol. Conidia germination, mycelial dry weight, and conidiogenesis of *Cladosporium* spp. were reduced by the test-drugs at 1/2MIC, MIC and 2xMIC ( $p < 0.05$ ). These measurable cell events are essential for fungal infection and development in foods. The action of citronellol and geraniol against *Cladosporium* spp. suggest that the drugs may serve as effective agents for controlling fungal contamination and growth in foods.

**Keywords.** monoterpenes, contamination, natural products, food safety, *Cladosporium*.

### RESUMO

*Cladosporium* spp. é um grupo de fungos dematiáceos relevantes para os alimentos, que podem ser dispersos pelo ambiente e causar deterioração e intoxicação alimentar. Considerando a importância da contaminação fúngica, os produtos naturais usados para controlar seu crescimento são importantes. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos inibitórios de dois monoterpenoides, geraniol e citronelol, contra cepas de *Cladosporium carrioni*, *C. cladosporioides* e *C. oxysporum*. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) das drogas foram determinadas por microdiluição. Os efeitos das drogas-teste sobre a massa micelial seca, a germinação de conídios e a conidiogênese de *Cladosporium* spp. também foram investigados utilizando um hemocitômetro. Os valores de CIM e CFM do citronelol variaram de 256 a 512 µg/mL e de 256 a 2048 µg/mL, respectivamente. CIM e CFM de geraniol variaram de forma semelhante. A germinação de conídios, massa micelial seca e conidiogênese de *Cladosporium* spp. foram inibidas pelas drogas-teste 1/2CIM, CIM e 2xCIM ( $p < 0,05$ ). Esses eventos celulares são essenciais para a infecção e desenvolvimento fúngico em alimentos. A ação de citronelol e geraniol contra *Cladosporium* spp. sugere que podem servir como agentes eficazes para controlar a contaminação fúngica e o seu crescimento em alimentos.

**Palavras-chave.** monoterpenos, contaminação, produtos naturais, segurança alimentar, *Cladosporium*.

## INTRODUCTION

Food acts as a vehicle for many microorganisms; causatives of food-borne diseases. Among these, fungal contaminants are worth mentioning since they can cause food spoilage, allergic reactions, poisoning, and infections in humans and animals<sup>1</sup>.

*Cladosporium* spp., dematiaceous fungi, are contaminants found as saprophytes in soil and decaying materials, particularly in temperate regions, such as the semi-arid region of Brazil. The species most often isolated are *Cladosporium elatum*, *C. herbarum*, *C. sphaerospermum*, *C. cladosporioides*, *C. carrionii*, and *C. oxysporum*<sup>2-4</sup>. *Cladosporium* species are producers of volatile organic compounds associated with the odors of decaying food. Fungal growth on food modifies its maturation, causes discoloration, unpleasant odor, chemical and nutritional changes, and loss of quality. Fungi also cause losses to producers, to industry, and to consumers.<sup>5,6</sup> Further, the genus *Cladosporium* produces several secondary metabolites; mycotoxins such as cladosporin and emodin, which are both heat resistant and cause serious problems to internal human organs<sup>5</sup>.

Considering the importance of fungal contamination, procedures to control fungal growth are fundamental to prevent foodborne illness and food quality losses. One of the principal methods is application of chemical sanitizers such as chlorine or quaternary ammonium products. However, to provide microbiologically safe foods, the demand for natural alternatives to replace chemically synthesized antimicrobials has been increasing<sup>7</sup>.

In this context many studies have been conducted with natural substances, like the terpenes, to investigate possible applications in microbiological food control. Terpene compounds, widely distributed in plants, are hydrogenated cyclic or aliphatic carbon chains endowed with activities against pathogenic fungi and contaminants<sup>8</sup>. Within the group, those oxygenated due to the action of specific enzyme systems such as citronellol and geraniol are called monoterpenoids (C<sub>10</sub>). Monoterpenoids are a group of molecules with antimicrobial activity<sup>9</sup>.

This study presents the antifungal potential of citronellol and geraniol on strains of the genus *Cladosporium*; focusing on inhibitory effects against important stages of fungal development such as spore germination and production, and mycelial formation. These monoterpenoids have demonstrated various biological activities; researchers have shown that geraniol has outstanding neuroprotective<sup>10</sup>, insecticidal<sup>11</sup> and antineoplastic activities<sup>12</sup>. Currently, there are reports in the literature confirming the antifungal potential of geraniol against strains of *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. and *Penicillium* spp.<sup>13</sup>. Meanwhile, it is reported that citronellol has: anti-hyperalgesic<sup>14</sup>, antimicrobial<sup>13</sup> and repellent activity<sup>15</sup>.

## MATERIALS AND METHODS

### Fungal strains

For the antifungal activity tests, the strains: *C. carrionii* (LM 227, URM 5109), *C. cladosporioides* (URM 5737, URM 6246), and *C. oxysporum* (URM 5234, URM 5412), were taken from the culture collections of the (Federal University of Paraíba) Mycology Laboratory, and the (Federal University of Pernambuco) Department of Mycology. The fungi were grown in potato dextrose agar at 28 °C for 7 days. Fresh cultures were overlaid with sterile saline (0.9% NaCl), and suspensions formed by gentle agitation. The resulting mixture of conidia and hyphal fragments were transferred to sterile test tubes. After 15 seconds of stirring, each inoculum was allowed to stand for 3 minutes and the supernatant was collected in sterile test tubes. After stirring, the conidia were counted using a hemocytometer and adjusted to an inoculum of approximately 10<sup>6</sup> conidia/mL<sup>16,17</sup>.

### Test compounds

Citronellol and geraniol were purchased from Sigma-Aldrich® (Brazil). Emulsions were freshly prepared for the tests by first dissolving them in dimethylsulfoxide (DMSO), with sterilized distilled water to obtain a concentration of 1024 µg/mL. From this concentration, dilutions were performed to achieve a concentration of 1 µg/mL using RPMI 1640 medium.

### Determination of minimum inhibitory concentration (MIC)

Determining the MIC for each test-drug was carried out by microdilution technique using 96 well flat bottom micro-titer plates as adapted from document M38-A of the CLSI<sup>18</sup>. To each row of the plate was added 100  $\mu$ L of the diluted test drugs in RPMI 1640. To each well of the plate was added 100  $\mu$ L of a previously prepared inoculum diluted in RPMI 1640 to a ratio of 1:50. A fungal control was performed by replacing the test drug with sterile saline (growth control). A sterility control and DMSO were also performed. The plates were sealed and incubated at 28 °C for 5 days. The MIC values were determined by visual analysis of growth inhibition in each well, as compared to controlled growth. The MIC was the lowest concentration of drugs capable of inhibiting observed fungal growth in the wells by 100%. The experiment was performed in triplicate and the MIC values were expressed as a geometric mean.

### Determination of minimum fungicide concentration (MFC)

A 10  $\mu$ L aliquot from each well having no fungal growth was sown on a plate with Sabouraud dextrose agar. The plates were incubated at 28 °C for 5 days. The MFC was considered to be the lowest concentration sown, where the growth was less than 3 colony-forming units. The experiment was performed in triplicate and the MFC values were expressed as a geometric mean<sup>19,20</sup>.

### Effects on conidia germination

In sterile test tubes, 500  $\mu$ L of the RPMI 1640 plus the test-drugs (1/2MIC, MIC, 2xMIC) were homogeneously mixed with 500  $\mu$ L inoculates of *C. carrioni* LM 227, *C. cladosporioides* URM 5737, and *C. oxysporum* URM 5234. The tubes were incubated at 28 °C for 48 hours. The quantities of germinated and non-germinated conidia were determined using a hemocytometer. The percentages of germinated conidia were calculated for each experimental group. A control with no drug was used. The whole experiment was performed in triplicate<sup>21,22</sup>.

### Effects on dry mycelial weight

The analysis of test-drug interference on mycelial growth was performed by determining the dry mycelial masses for *C. carrioni* LM 227, *C. cladosporioides* URM 5737, and *C. oxysporum* URM 5234<sup>22,23</sup>. To a sterile test tube were added 2.5 mL of RPMI 1640, previously completed with the test-drug solutions (1/2MIC, MIC, 2xMIC), and then 0.5 mL of inoculum to each tube. The controls (no drugs) were performed in a similar manner. The system was incubated at 28 °C for 5 days to determine the dry mycelial mass. For this, the cultures were sterile filtered using filter paper (porosity: 11  $\mu$ m), and washed with distilled sterile water. The mycelium retained in the filter paper was subjected to drying in an oven at 60 °C for 10 minutes. Upon completion, the filter paper containing the dry mycelium was weighed and the dry mycelial mass percentage was calculated considering the experimental control as 100% mycelial production. The experiment was performed in triplicate.

### Effects on fungal conidiogenesis

*C. carrioni* LM 227, *C. cladosporioides* URM 5737, and *C. oxysporum* URM 5234 conidia production was analyzed (after cultivation) on Sabouraud dextrose agar in the absence and presence of test-drugs (at 1/2MIC, MIC, 2xMIC) according to Tzortzakis and Economakis<sup>24</sup>. Into sterile test tubes, 10 mL of Sabouraud dextrose agar was poured and set in a water bath at 35 °C. The test drugs were then added. The controls (no drugs) were performed in a similar manner. On the surface of the medium was placed a 2 mm portion of fungal mycelium, newly grown in potato dextrose agar, and the whole system incubated at 28 °C for 5 days. Afterwards, the conidia were collected by adding 5 mL of sterile saline solution to the surface of the fungal colonies. The suspension was then collected and centrifuged at 4500g for 5 minutes, the supernatant was then discarded and the pellet washed once with sterile saline. The inoculum was analyzed in a hemocytometer to count the number of conidia in each group tested. Assays were performed in triplicate.

## Statistical analysis

The results were expressed as mean  $\pm$  SEM. The data were compared statistically using the unpaired *t*-test. A  $p < 0.05$  was considered significant.

## RESULTS

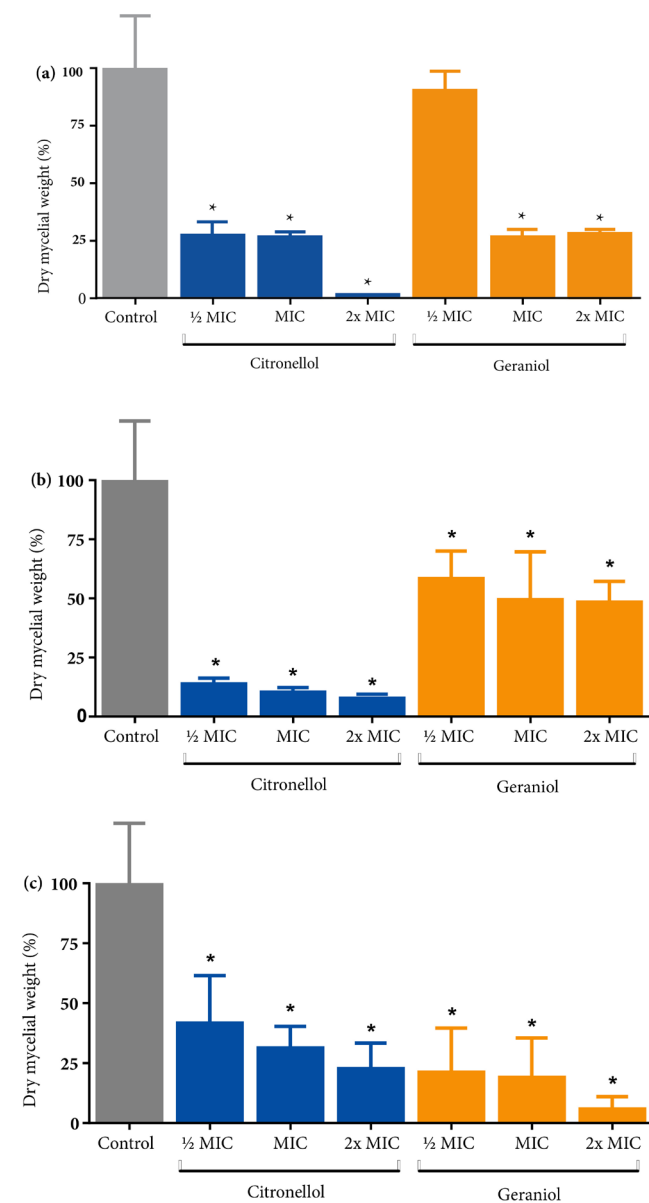
Initially, tests were performed to determine the MFC and MIC of citronellol and geraniol against the *Cladosporium* spp. strains. As can be seen in **Table**, the test-drugs inhibited the growth of the tested strains starting from the 256  $\mu\text{g/mL}$  concentration. Importantly, the species *C. carrioni* was the most sensitive, having lower MIC values for both drugs. The control tests, confirmed the following: (1) fungal growth in the absence of the drugs; revealing the viability of the fungal inoculum (growth control), (2) the absence of fungal growth in the culture medium without inoculum (sterility control), (3) fungal growth when DMSO was used in the same concentrations as the drug emulsifier. The minimum fungicidal concentration (MFC) of citronellol was found in concentrations above the respective MIC values when tested against the strains of *C. cladosporioides* and *C. oxysporum*. For the *C. carrioni* strains, the MIC of citronellol was identical to the MFC. Geraniol showed similar results.

Our results showed that at all concentrations tested, citronellol and geraniol significantly inhibited ( $p < 0.05$ ) the mycelial growth of *C. cladosporioides* URM 5737, and *C. oxysporum* URM 5234 as compared to the controls. Regarding the strain *C. carrioni* LM 227, geraniol only showed inhibition ( $p < 0.05$ ) at the MIC and 2xMIC concentrations (**Figure 1a**).

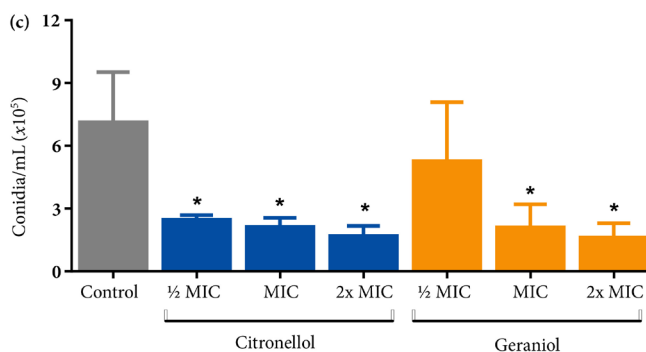
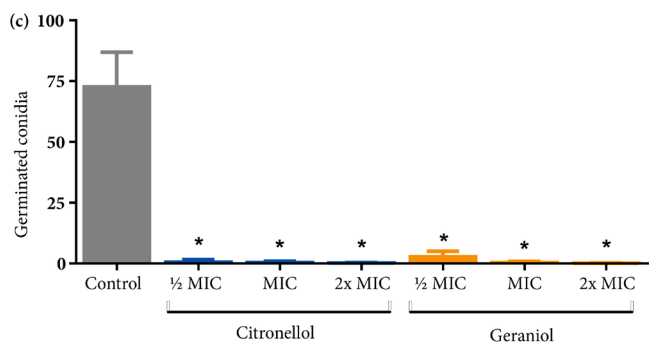
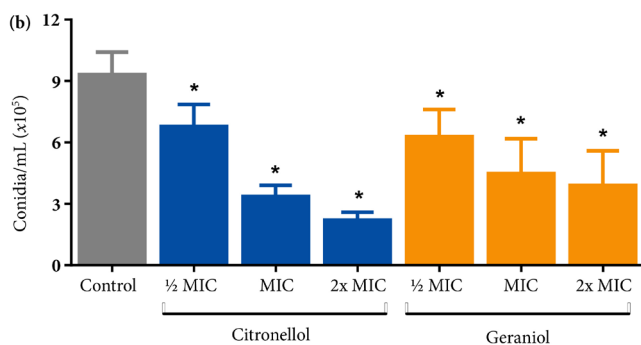
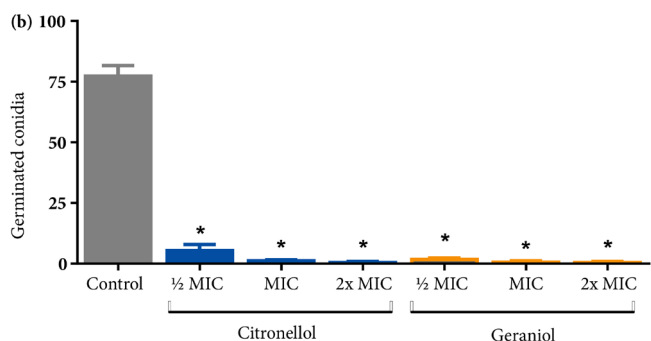
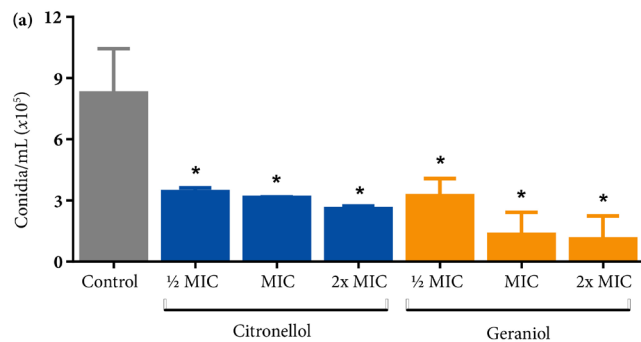
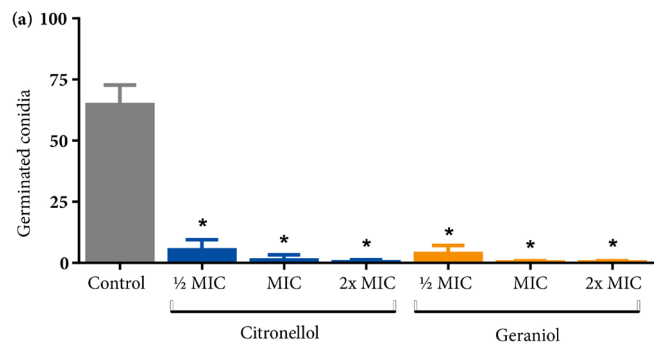
**Table.** Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicide concentration (MFC) of citronellol and geraniol against *Cladosporium* spp. strains

Fungi	Citronellol ( $\mu\text{g/mL}$ )		Geraniol ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	MIC	MFC	MIC	MFC
<i>C. carrioni</i> LM 227	256	256	512	512
<i>C. carrioni</i> URM 5109	256	256	256	512
<i>C. cladosporioides</i> URM 5737	512	1024	512	512
<i>C. cladosporioides</i> URM 6246	256	512	512	512
<i>C. oxysporum</i> URM 5234	512	2048	512	2048
<i>C. oxysporum</i> URM 5412	512	1024	512	1024

All concentrations of the test-drugs inhibited the conidia germination processes of *C. cladosporioides* URM 5737, *C. carrioni* LM 227 and *C. oxysporum* URM 5234 when compared to the test controls (absence of the drug) ( $p < 0.05$ ). The results also showed that all groups present inhibition of conidial production ( $p < 0.05$ ), except geraniol (at 1/2MIC), which did not significantly inhibit conidiogenesis for *C. oxysporum* URM 5234 as compared to the control (**Figure 3c**).



**Figure 1.** Percentage of dry mycelial weight produced by *Cladosporium carrioni* LM 227 (a), *C. cladosporioides* URM 5737 (b) and *C. oxysporum* URM 5234 (c) in the absence (control) and presence of citronellol and geraniol. Control produced 100% of dry mycelial weight. \* $p < 0.05$  compared to control



**Figure 2.** Percentage of germinated conidia of *Cladosporium carrioni* LM 227 (a), *Cladosporium cladosporioides* URM 5737 (b) and *Cladosporium oxysporum* URM 5234 (c) in the absence (control) and presence of citronellol and geraniol. \* $p < 0.05$  compared to control

**Figure 3.** Number of conidia/mL produced by *Cladosporium carrioni* LM 227 (a), *C. cladosporioides* URM 5737 (b) and *C. oxysporum* URM 5234 (c) in the absence (control) and presence of citronellol and geraniol. \* $p < 0.05$  compared to control

## DISCUSSION

According to Aoudou et al<sup>13</sup>, when antimicrobial agents are tested, it is common to obtain fungicidal values which are higher than their MIC values, validating our results. In our study, citronellol and geraniol showed outstanding antifungal activity against all of the strains tested. However, according to criteria proposed by Sartoratto et al<sup>25</sup>, both compounds presented strong antifungal activity.

This unique character makes the results of this study highly relevant. However, the antifungal potential of geraniol and citronellol has been reported in other studies such as Shin and Lim<sup>26</sup>, which demonstrated such antifungal activity against the dermatophyte species: *Trichophyton erinacei*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *T. tonsurans*, *T. schoenleinii* and *T. soudanense*; also using microdilution technique. Pereira et al<sup>27</sup> reported evidence that both drugs interfere with *T. rubrum* growth by inhibiting ergosterol biosynthesis. Aoudou et al<sup>13</sup> also examined antifungal activity against contamination with *Fusarium*, *Aspergillus*, and *Penicillium* species. In addition to the antifungal activity of the isolated components, their essential oils (high in citronellol and geraniol) also have proven antifungal activity against many species. The essential oil of *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex. Bor has large amounts of geraniol and citronellol, and is therefore recognized as having antifungal activity<sup>22,28</sup>.

To study the interference of the test-drugs at different stages of fungal development such as fungal mycelial growth, conidia germination, and conidogenesis, we chose the strains *C. cladosporioides* URM 5737, *C. carrioni* LM 227 and 5234 *C. oxysporum* URM; because of their higher growth rates. Our results were promising, since the drugs inhibited cellular processes.

The inhibitory effects of natural drugs on mycelium, conidia production, and germination of conidia for *Trichophyton rubrum*<sup>27</sup>, *Rhizopus oryzae*<sup>17</sup>, *Sclerotium cepivorum*<sup>29</sup> have been previously reported. There is evidence in the literature that due to the lipophilic profile of terpenes, their antifungal mode of action involves disruption of the plasma membrane lipid bilayer. A subsequent release of intracellular components, and disruption of the activity of membrane enzymes, interferes with energy dependent processes

such as: solute transport, metabolism regulation, ergosterol synthesis, cell wall formation and morphogenesis<sup>8,27</sup>.

The air itself can be an important distributor of fungal conidia. Once produced and then dispersed, conidia start the process of germination in the presence of nutrients such as amino acids and sugars present in food. Morphological changes in the single asexual fungal cell provide longitudinal growth in hyphae. Hyphae penetrate the inner layers of food, increasing the extent of injury, and cause deterioration; with consequent losses<sup>30-32</sup>.

For years, researchers have been seeking an alternative to applying chlorine-based compounds; or new ways to control fungi contaminants. Currently, the safety of such chemical preservatives is being debated, since many of these products have both carcinogenic and teratogenic properties, as well as residual toxicity<sup>33,34</sup>.

Belsito et al<sup>35</sup> published a review showing that acute oral toxicities of non-cyclic terpene alcohols, including geraniol and citronellol, present low LD<sub>50</sub> values in rats. These safety data are relevant for risk assessments of monoterpene alcohol use in the food industry. The use of natural antimicrobial agents for food preservation is a globally recognized control measure; to be used either alone or in combination with other preservation technologies. Although many reports highlight terpenes and essential oils as potential flavoring agents, they also represent a source of natural drugs with antifungal potential. Yet, possible application as food preservatives requires specific knowledge of their properties, such as those presented in this study. Further, their organoleptic effects on the food matrix must also be analyzed<sup>8</sup>.

## CONCLUSION

The formation of fungal conidia and their subsequent germination drive mycelium formation, and therefore, the appearance of fungal food infections. Our results are relevant because they demonstrate that both citronellol and geraniol effectively interfere in these growth processes. In conclusion, we present two natural drugs with anti-*Cladosporium* potential; citronellol and geraniol, which may well be useful in the food industry. However, even with roof of their antifungal potential, further

studies are necessary so that the drugs may be applied appropriately as preservatives in food.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Brazilian agency CNPq (National Counsel of Technological and Scientific Development) for financial support. The authors report no conflicts of interest.

## REFERENCES

1. Newell DG, Koopmans M, Verhoef L, Duizer E, Aidara-Kane A, Sprong H et al. Food-borne diseases - The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *Int J Food Microbiol*. 2010;139 Suppl 1:S3-15. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.021>].
2. Mendes GRL, Reis TA, Corrêa B, Badiale-Furlong E. Mycobiota and occurrence of Fumonisin B<sub>1</sub> in wheat harvested in Southern Brazil. *Ciênc Rural*. 2015;45(6):1050-7. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20140005>].
3. Bensch K, Braun U, Groenewald JZ, Crous PW. The genus *Cladosporium*. *Stud Mycol*. 2012;72(1):1-401. [DOI: <http://dx.doi.org/10.3114/sim0003>].
4. Altunatmaz SS, Issa G, Aydin A. Detection of airborne psychrotrophic bacteria and fungi in food storage refrigerators. *Braz J Microbiol*. 2012;43(4):1436-43. [DOI: [10.1590/S1517-838220120004000027](http://dx.doi.org/10.1590/S1517-838220120004000027)].
5. Ogórek R, Lejman A, Pusz W, A Miluch, Miodynska P. Characteristics and taxonomy of *Cladosporium* fungi. *Mikologia Lekarska*. 2012.19(2):80-5.
6. Rivas S, Thomas CM. Molecular interactions between tomato and the leaf mold pathogen: *Cladosporium fulvum*. *Annu Rev Phytopathol*. 2005;43:395-436. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.140224>].
7. Suwa M, Oie S, Furukawa H. Efficacy of disinfectants against naturally occurring and artificially cultivated bacteria. *Biol Pharm Bull*. 2013;36(3):360-3. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1248/bpb.b12-00721>].
8. Hyldgaard M, Mygind T, Meyer RL. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Front Microbiol*. 2012;3:12. [DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2012.00012>].
9. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils-a review. *Food Chem Toxicol*. 2008;46(2):446-75. [DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>].
10. Prasad SN, Muralidhara. Neuroprotective effect of geraniol and curcumin in an acrylamide model of neurotoxicity in *Drosophila melanogaster*: relevance to neuropathy. *J Insect Physiol*. 2014;60(1):7-16. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2013.10.003>].
11. Jeon JH, Lee CH, Lee HS. Food protective effect of geraniol and its congeners against stored food mites. *J Food Prot*. 2009;72(7):1468-71.
12. Wiseman DA, Werner SR, Crowell PL. Cell cycle arrest by the isoprenoids perillyl alcohol, geraniol, and farnesol is mediated by p21Cip1 and p27Kip1 in human pancreatic adenocarcinoma cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;320(3):1163-70. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1124/jpet.106.111666>].
13. Aoudou Y, Léopold TN, Michel JDP, Xavier EF, Moses MC. Antifungal properties of essential oils and some constituents to reduce foodborne pathogen. *J Yeast Fungal Res*. 2010;1(1):1-8.
14. Brito RG, Santos PL, Quintans JSS, Lucca Júnior W, Araújo AA, Saravananc S, et al. Citronellol, a natural acyclic monoterpene, attenuates mechanical hyperalgesia response in mice: evidence of the spinal cord lamina I inhibition. *Chem Biol Interact*. 2015;239:111-7. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2015.06.039>].
15. Semmler M, Abdel-Ghaffar F, Schmidt J, Mehlhorn H. Evaluation of biological and chemical insect repellents and their potential adverse effects. *Parasitol Res*. 2014;113(1):185-8. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-013-3641-7>].
16. Rasooli I, Abyaneh MR. Inhibitory effect of thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Food Control*. 2004;15(6):479-83. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2003.07.002>].
17. Lira Mota KS, Oliveira Pereira F, Oliveira WA, Lima IO, Oliveira Lima E. Antifungal activity of *Thymus vulgaris* L. essential oil and its constituent phytochemicals against *Rhizopus oryzae*: interaction with ergosterol. *Molecules*. 2012;17(12):14418-3. [DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules171214418>].

18. Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard. CLSI document M38-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2002.
19. Klepser ME, Ernst EJ, Ernst ME, Messer SA, Pfaller MA. Evaluation of endpoints for antifungal susceptibility determinations with LY303366. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42(6):1387-91.
20. Ernst EJ, Klepser ME, Ernst ME, Messer SA, Pfaller MA. *In vitro* pharmacodynamic properties of MK-0991 determined by time-kill methods. *Mycol*. 1999;33(2):75-80. [DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0732-8893\(98\)00130-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0732-8893(98)00130-8)].
21. Liu T, Zhang Q, Wang L, Yu L, Leng W, Yang J, et al. The use of global transcriptional analysis to reveal the biological and cellular events involved in distinct development phases of *Trichophyton rubrum* conidial germination. *BMC genomics*. 2007;8:100. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-8-100>].
22. Oliveira Pereira F, Alves Wanderley P, Cavalcanti Viana FA, Batazar de Lima R, Barbosa de Sousa F, Oliveira Lima E. Growth inhibition and morphological alterations of *Trichophyton rubrum* induced by essential oil from *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor. *Braz J Microbiol*. 2011;42(1):233-42. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822011000100029>].
23. Sharma N, Tripathi A. Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiol Res*. 2008;163(3):337-44. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2006.06.009>].
24. Tzortzakis NG, Economakis CD. Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. *Inn Food Sci Emerg Technol*. 2007;8(2):253-8. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2007.01.002>].
25. Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder VLG. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Braz J Microbiol*. 2004;35(4):275-80. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822004000300001>].
26. Shin S, Lim S. Antifungal effects of herbal essential oils alone and in combination with ketoconazole against *Trichophyton* spp. *J App Microbiol*. 2004;97(6):1289-96. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02417.x>].
27. Pereira FO, Mendes JM, Lima IO, Mota KS, Oliveira WA, Lima EO. Antifungal activity of geraniol and citronellol, two monoterpenes alcohols, against *Trichophyton rubrum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis. *Pharm Biol*. 2015;53(2):228-34. [DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/13880209.2014.913299>].
28. Oliveira WA, Oliveira Pereira F, Luna CG, Lima IO, Wanderley PA, Lima RB, et al. Antifungal activity of *Cymbopogon winterianus* jowitt ex bor against *Candida albicans*. *Braz J Microbiol*. 2011;42(2):433-41. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822011000200004>].
29. Pontin M, Bottini R, Burba JL, Piccoli P. *Allium sativum* produces terpenes with fungistatic properties in response to infection with *Sclerotium cepivorum*. *Phytochemistry*. 2015;115:152-60. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.02.003>].
30. Dao T, Dantigny P. Control of food spoilage fungi by ethanol. *Food Control*. 2011; 22(3-4): 360-8. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.09.019>].
31. Seong KY, Zhao X, Xu JR, Güldener U, Kistler HC. Conidial germination in the filamentous fungus *Fusarium graminearum*. *Fungal Genet Biol*. 2008;45(4):389-99. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2007.09.002>].
32. Gupta AK, Chaudhry M, Elewski B. *Tinea corporis*, *Tinea cruris*, *Tinea nigra*, and *Tinea pedis*. *Dermatol Clin*. 2003;21(3):395-400.
33. Schoeny R. Disinfection by-products: a question of balance. *Environ Health Perspect*. 2010;118(11):466-7. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1003053>].
34. Gómez-López VM, Marin A, Medina-Martinez MS, Gil MI, Allende A. Generation of trihalomethanes with chlorine-based sanitizers and impact on microbial, nutritional and sensory quality of baby spinach. *Postharvest Biol Technol*. 2013;85(1):210-7.
35. RIFM EXPERT Panel, Belsito D, Bickers D, Bruze M, Calow P, Greim H, Hanifin JM et al. A toxicologic and dermatologic assessment of cyclic and non-cyclic terpene alcohols when used as fragrance ingredients. *Food Chem Toxicol*. 2008;46(Suppl 11):S1-S71. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2008.06.085>].



## AGRADECIMENTOS

O Corpo Editorial agradece a todos os relatores abaixo relacionados que, com seu trabalho voluntário e anônimo ao longo de 2017, contribuíram para o bom andamento das atividades e elevação do nível dos artigos publicados pela Revista

- **Alexandre Tourino Mendonça** Universidade Vale do Rio Verde. Três Corações, MG
- **Andreza Francisco Martins** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Porto Alegre, RS
- **Benício Alves de Abreu Filho** Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências de Saúde. Maringá, PR
- **Bernardo Elias Correa Soares** Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Núcleo de Biossegurança. Rio de Janeiro, RJ
- **Bianca Ramos Marins** Fundação Oswaldo Cruz, Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio. Rio de Janeiro, RJ
- **Camila Cardoso de Oliveira** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Materiais de Referência, Núcleo de Análise e Tratamento de Dados. 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
- **Cecilia Cristina Marques dos Santos** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Laboratórios Regionais de São José do Rio Preto, Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas. São José do Rio Preto, SP
- **Christiane Soares Pereira** Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Departamento de Bacteriologia. Rio de Janeiro, RJ
- **Claudia Maria Antunes Uchôa Souto Maior** Universidade Federal Fluminense, Instituto Biomédico, Departamento de Microbiologia e Parasitologia. Niterói, RJ
- **Clayton Bernardinelli Gitt** Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Veterinária, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública. Seropédica, RJ
- **Daiana Novello** Universidade Estadual do Centro-Oeste do Paraná, Departamento de Nutrição. Guarapuava, PR
- **Décio Diamant** Instituto de Infectologia Emilio Ribas, Ambulatório de Hepatologia. São Paulo, SP
- **Dennis Armando Bertolini** Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas. Maringá, PR
- **Eduardo Ramirez Asquieri** Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Farmácia, Departamento de Análises Clínicas Toxicológicas e Bromatológicas, Laboratório de Química dos Alimentos. Goiânia, GO
- **Edward José de Oliveira** Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas René Rachou. Belo Horizonte, MG
- **Elisa Yoko Hirooka** Universidade Estadual de Londrina. Londrina, PR
- **Felipe Faccini dos Santos** Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas. Manaus, AM
- **Fernanda Barbosa dos Reis** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, SP
- **Francisca Janaina Soares Rocha** Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde. Recife, PE
- **Francisco de Assis Baroni** Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Veterinária. Seropédica, RJ
- **Gerusa Maria Figueiredo** Universidade de São Paulo, Instituto de Medicina Tropical, Epidemiologia. São Paulo, SP



- **Hans Fröder** Centro Universitário Univates. Lageado, RS
- **Ivana Greice Sandri** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Campus do Vale. Porto Alegre, RS
- **Joice Neves Reis Pedreira** Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Salvador, BA
- **Josué Moraes** Universidade de Guarulhos. Guarulhos, SP
- **Karina Correia da Silveira** Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Nutrição. Recife, PE
- **Marcelo Henrique Otênio** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Gado de Leite. Juiz de Fora, MG
- **Marcelo Lancellotti** Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Departamento de Bioquímica. Campinas, SP
- **Marcia Regina Beux** Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas. Curitiba, PR
- **Márcio Sobreira Silva Araújo** Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas René Rachou. Belo Horizonte, MG
- **Maria Auxiliadora de Brito Rodas** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Alimentos, Núcleo de Química, Física e Sensorial. São Paulo, SP
- **Maria Claudia Dantas Porfirio Borges** Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Departamento de Microbiologia. Goiânia, GO
- **Maria Cristina Carvalho do Espírito Santo** Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Laboratório de Imunopatologia da Esquistossomose. São Paulo, SP
- **Maria Cristina Zborowski de Paula** Centro Universitário Filadélfia, Curso de Pós-graduação em Armazenamento de Grãos e a Segurança Alimentar. Londrina, PR
- **Maria da P Spinola Miranda** Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Departamento de Análises Bromatológicas. Salvador, BA
- **Maria Helena Wohlers Morelli Cardoso** Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Departamento de Química, Laboratório de Alimentos e Contaminantes. Rio de Janeiro, RJ
- **Marilene Fernandes de Almeida** Prefeitura do Município de São Paulo, Centro de Controle de Zoonoses, Laboratório de Zoonoses e Doenças Transmitidas por Vetores. São Paulo, SP
- **Maurício Luiz Sens** Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. Florianópolis, SC
- **Monique Ribeiro Tiba Casas** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Bacteriologia, Núcleo de Doenças Entéricas e Infecções por Patógenos Especiais, São Paulo, SP
- **Nelma de Mello Silva Oliveira** Universidade José do Rosário Vellano, Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismo. Alfenas, MG
- **Paula Cristhina Niz Xavier** Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande, MS
- **Regina Maura Cabral de Melo Abrahão** Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Laboratório de Micobactérias. São Paulo, SP

- **Rodrigo Caciano de Sena** Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, Diretoria de Metrologia Científica e Industrial, Divisão de Metrologia Química, Laboratório de Análise Inorgânica, Laboratório de Análise Inorgânica. Duque de Caxias, RJ
- **Rosemeri Maurici da Silva** Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Clínica Médica. Florianópolis, SC
- **Sílvia Maria Santos Carvalho** Universidade Estadual de Santa Cruz, Departamento de Ciências Biológicas, Ciências Biológicas. Ilhéus, BA
- **Valdeni Terezinha Zani** Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Porto Alegre, RS
- **Vera Lúcia Pereira Chioccola** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Parasitologia e Micologia, Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas e Fungos. São Paulo, SP
- **Virginia del Carmen Troncoso Valenzuela** Fundação Ezequiel Dias, Serviço de Microscopia de Produtos. Belo Horizonte, MG

#### 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

