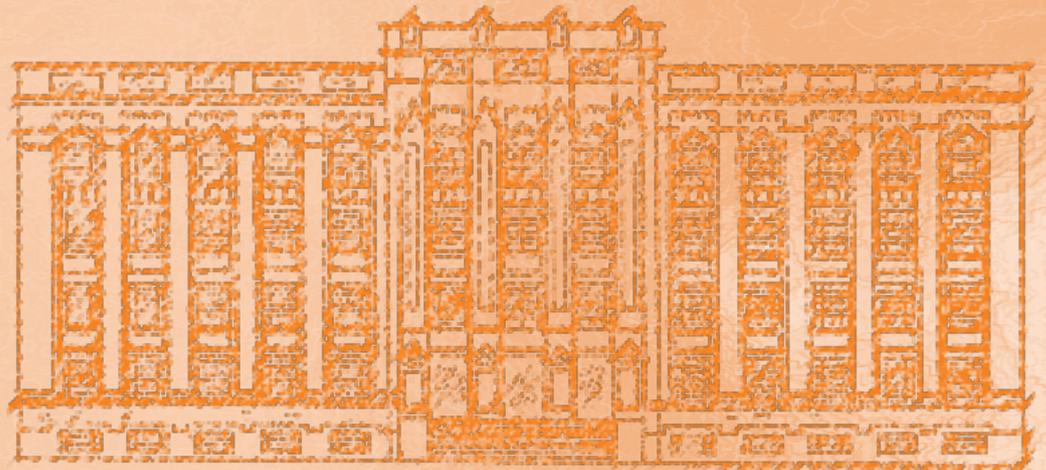


ISSN: 1983-3814 (*on-line*)  
RIALA6

# REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO  
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

**Volume 79 número único, 2020**





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

# REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Volume 79, 2020

---



## Diretor Geral do Instituto Adolfo Lutz

Laura Nogueira da Cruz

### Editores Assistentes

Adriana Aparecida Buzzo Almodovar  
Adriana Palma de Almeida  
Aurea Silveira da Cruz Garçon  
Daniela Etlinger Colonelli  
Eliete Candida de Lima Cortez  
Mahyara Markievicz Mancio Kus Yamashita  
Maria Aparecida Moraes Marciano  
Maria de Fátima Costa Pires  
Mirthes Ueda  
Paula Ordonhez Rigato  
Rosemeire Cobo Zanella Ramos  
Ruth Estela Gravato Rowlands  
Simone Alves da Silva

### Editor Chefe

Pedro Luiz Silva Pinto

### Editor Adjunto

Adriana Bugno

### Núcleo de Acervo

Rocely Aparecida Bueno Moita

### Editores/Diagramação

Irony Therezinha Pires

---

## 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. *(In memoriam)*  
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. *(In memoriam)*  
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  
2020, 79

CDD<sub>18</sub> 614.07205

RIALA 6  
ISSN 1983-3814 versão *on line*  
ISSN 0073-9855 versão impressa  
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: Index Medicus Global; LILACS; Latindex; BVS-Vet; BVS-RIC; Toxicology Abstracts; Google Acadêmico.

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

<https://periodicos.saude.sp.gov.br/index.php/RIAL/login>

Portal de Revistas em Veterinária e Zootecnia  
<https://www.bvs-vet.org.br/vetindex/periodicos/revista-do-instituto-adolfo-lutz/>

Portal de Revistas Científicas da Secretaria da Saúde - SP  
<https://ses.sp.bvs.br/periodicosp/>

Cartas ao editor:

Endereço / Address

Núcleo de Acervo

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

Tel. + 55 11 3068-2867/2869

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



## ■ ARTIGO DE REVISÃO/ REVIEW ARTICLE

e1793

### **Breve histórico da sífilis e evolução do diagnóstico laboratorial no período de 2005 a 2016**

Brief history of syphilis and evolutive diagnosis laboratory in the period 2005-2016

Regina Alexandre SILVA, Tânia Cristina Higino ESTÉCIO, Mirella Fontana Batista BINHARDI, Jaqueline Calça ASSIS, Cecília Cristina Marques dos SANTOS

e1795

### **Ocorrência de triatomíneos no Estado do Ceará, Brasil**

Occurrence of triatomines in the state of Ceará, Brazil

Léia Madeira Sabóia dos REIS, Darwin Renne Florencio CARDOSO, Jéssica Pereira dos SANTOS, Elaine Ferreira do NASCIMENTO, Clarissa Romero TEIXEIRA

## ■ ARTIGO ORIGINAL/ORIGINAL ARTICLE

e1782

### **Perfil bioquímico de pacientes diabéticos de um laboratório privado da região sul do Brasil**

Biochemical profile of diabetic patients in a private laboratory in southern Brazil

Miriã Ferrão Maciel FIUZA, Natielen Jacques SCHUCH, Ana Cláudia Cirne BERNDT, ClandioTimm MARQUES, Luciana Maria Fontanari KRAUSE

e1783

### **Incidência de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 em amendoins**

Incidence of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in peanuts

Maria Helena IHA MATIAS, Marcelo Ferreira da CRUZ, Isaura Akemi OKADA, Rita de Cássia BRIGANTI, Maria Aparecida de OLIVEIRA

e1785

### **Correlação estatística entre parâmetros microscópicos e microbiológicos em pimenta-do-reino moída (*Piper nigrum* L.) comercializada em Minas Gerais**

Statistical correlation between microscopic and microbiological parameters in ground black pepper (*Piper nigrum* L.) sold in Minas Gerais

Flaviane Cristina Lopes MATOSINHOS, Inês Helena Tristão de OLIVEIRA, Juliane Rodrigues SILVA, Gracielle Alves CARLOS, Leandro Leão FAULA, Marcos Paulo Gomes MOL, Virgínia del Carmen Troncoso VALENZUELA

---

e1787

**Esponjas de banho: promovem limpeza ou podem ser reservatório e veículo de transmissão de microrganismos?**

Bath sponges: promote cleaning or can be reservoirs and vehicles in the transmission of microorganisms?

Eliandra Mirlei ROSSI, Jéssica POSSAMAI, Jessica Fernanda Barreto HONORATO

e1789

**Avaliação físico-química e caracterização sensorial por meio de Focus Group de carne de sol**

Physical-chemical evaluation and sensory characterization by Focus Group of sun dried meat

Ricardo Targino MOREIRA, Salete Maria de Olinda Carvalho FARIAS, Edilma Pinto COUTINHO, Rafaella de Paula Paseto FERNANDES, Sonnale Silva COSTA

e1790

**Analysis of hemodialysis water quality from 2008 to 2016 in Minas Gerais, Brazil**

Análise da qualidade da água de hemodiálise durante o período de 2008 a 2016 em Minas Gerais, Brasil

Priscila da COSTA, Cláudia Aparecida de Oliveira e SILVA, Flávio Rodrigues PEREIRA, Gizele Barrozo RIBEIRO, Fabíola Cristina Aquino SILVA, João César da SILVA, Bárbara Danielle Silva LOURENÇO, Wagner Ferreira PINHEIRO, Adriana Alves Pereira WILKEN

e1792

**Occurrence and diversity of ciliated protozoa in the most commonly consumed leafy greens in Brazil: a qualitative study**

Ocorrência e diversidade de protozoários ciliados nos vegetais folhosos mais consumidos no Brasil: um estudo qualitativo

Tais Rondello BONATTI, Sandra YAMASHIRO, Pedro Ferreira de Castro Santana e FREITAS, Isabel Cristina Vidal SIQUEIRA – CASTRO, Regina Maura Bueno FRANCO

e1794

**Avaliação da adequação nutricional de cardápios escolares em uma instituição da rede pública de ensino na região Sudeste de Minas Gerais**

Evaluation of the nutritional adequacy of school menus in a public school in the Southeast region of Minas Gerais

Ana Elisa Winter ANTUNES, Ludmyla Ruffo SILVEIRA, Nathália Sernizon GUIMARÃES, Anne Danieli Nascimento SOARES

■ **COMUNICAÇÃO BREVE/ BRIEF COMMUNICATION**

e1786

**Composição química e aceitabilidade de pão sem glúten desenvolvido com mucilagem de quiabo**

Chemical composition and acceptance of gluten-free bread developed with okra mucilage

Vivian Cristina da Cruz RODRIGUES, Kellen Cristina da Cruz RODRIGUES, Cristiane Gonçalves de Oliveira FIALHO<sup>In memoriam</sup>, Maria Inês Dantas BASTIANI, Regina Célia Rodrigues Miranda MILAGRES, Eliana Carla Gomes de SOUZA

e1791

**Parâmetros microscópicos de açúcar de coco comercializados na cidade de São Paulo, Brasil: identidade e qualidade**

Microscopic parameters of coconut sugar marketed in the city of São Paulo, Brazil: identity and quality

Lais Fernanda de PAULI-YAMADA, Cinthia Iara de AQUINO, Maria Aparecida Moraes MARCIANO, Augusta Mendes da SILVA, Márcia Nogueira DIMOV

e1796

**Hygienic-Sanitary Conditions of Hospital Nutrition Services in Southern Brazil**

Condições higienicossanitárias dos serviços de nutrição e dietética em hospitais do Sul do Brasil

Larissa Slongo FACCIOLI, Ana Lúcia SERAFIM, Virgílio José STRASBURG, Janaína Guimarães VENZKE

---

## ■ NOTA CIENTÍFICA/SCIENTIFIC NOTE

**e1784**

### **Cálculo da estimativa da incerteza de medição associada ao ensaio de contagem de bactérias heterotróficas em matriz água purificada através da técnica de detecção por fluorescência**

Measurement uncertainty calculation associated with heterotrophic bacterial count in purified water matrix using the fluorescence detection technique

Ellen Gameiro HILINSKI, Fernando Pontes de Lima e SILVA, Fernanda Fernandes FARIAS, Edilene Afonso VIEIRA, Adriana Aparecida Buzzo ALMODOVAR, Terezinha de Jesus Andreoli PINTO, Adriana BUGNO

**e1788**

### **Preservação de ovos de helmintos e cistos de protozoários em iodo mercurato de potássio. Revisitando experimentos realizados há cerca de 40 anos**

Preservation of helminth eggs and protozoan cysts in potassium iodine mercurate. Revisiting experiments carried out about 40 years ago

Sansão da Rocha WESTPHALEN, Thiago Kury Moreno de SOUZA, Pedro Luiz Silva PINTO, José Eduardo TOLEZANO

## ■ COLABORADORES

## ■ INSTRUÇÕES AOS AUTORES

<https://periodicos.saude.sp.gov.br/RIAL/about/submissions>



# Breve histórico da sífilis e evolução do diagnóstico laboratorial no período de 2005 a 2016

## Brief history of syphilis and evolutive diagnosis laboratory in the period 2005-2016

RIALA6/1793

Regina Alexandre SILVA\*, Tânia Cristina Higino ESTÉCIO, Mirella Fontana Batista BINHARDI, Jaqueline Calça ASSIS, Cecília Cristina Marques dos SANTOS

\*Endereço para correspondência: Centro de Laboratório Regional, Instituto Adolfo Lutz de São José do Rio Preto, SP, Rua Alberto Sufredini Bertoni, 2325, Maceno, São José do Rio Preto, SP, Brasil, CEP: 15060-020. Tel: 17 3224 2602. E-mail: [regina.silva@ial.sp.gov.br](mailto:regina.silva@ial.sp.gov.br)

Recebido: 09.12.2019 - Aceito para publicação: 17.11.2020

### RESUMO

Essa revisão explorou dois aspectos: a evolução do diagnóstico laboratorial, quantitativamente, com análise de 12.328 dados da produção laboratorial (de 2005 a 2016) e o histórico epidemiológico, com abordagem qualitativa (descritiva). Com o objetivo de traçar um panorama e apresentar as ações laboratoriais, avaliou-se o impacto no diagnóstico com a implantação do teste treponêmico TPHA (2007) e atendimento aos fluxogramas I-A (2011) e I-B (2014), da Portaria nº 3.242/GM/MS/2011 (revogada em 2016). Para traçar a trajetória epidêmica do sífilismo no contexto social, do Brasil colonial à atualidade, buscou-se a literatura científica nas bases de dados PubMed, Scielo, Lilacs, PAHO, BVS, Google Acadêmico, elegendo os descritores isolados/agrupados: sífilis/congênita, sorodiagnóstico da sífilis, saúde pública. Das 200 publicações avaliadas por leitura exploratória, seletiva, analítica e interpretativa, 63 foram selecionadas para descrever a sífilis nos aspectos já mencionados. A ausência de dados laboratoriais e epidemiológicos dificulta o conhecimento das transformações do processo de manifestação da sífilis e adoção de medidas corretivas/preventivas para seu combate. Esse estudo detectou, com originalidade, pontos vulneráveis na execução do ensaio; necessidade de estratégias para melhoria da qualidade do diagnóstico laboratorial e, do ponto de vista epidemiológico, a inserção de políticas públicas específicas para atenção ao grupo de pessoas em idade fértil.

**Palavras-chave.** sífilis, sífilis congênita, sorodiagnóstico da sífilis, saúde pública.

### ABSTRACT

This review explored two aspects: quantitative evolution of the laboratory diagnosis with analysis of 12,328 laboratory data (2005/2016) and, epidemiological history with a qualitative (descriptive) approach. With aim of to draw a panorama and to present the laboratory actions was evaluated the impact from treponemic test (TPHA, 2007) in the diagnosis and attendance to flowcharts IA (2011)/IB (2014), of Ordinance N° 3,242 /GM/MS/ 2011 (repealed in 2016). For drawing the syphilis epidemic trajectory in the social context, since Brazil colony to the currently scientific literature was searched in the databases PubMed, Scielo, Lilacs, PAHO, BVS, Google Scholar, choosing the isolated / grouped descriptors: syphilis / congenital, serodiagnosis, public health. From 200 publications selected 63 evaluated by exploratory, selective, analytical, interpretive reading, to describe syphilis in all aspects mentioned above. The lack of epidemiological and laboratorial data makes it difficult to know the changes in the syphilis manifestation process, and to adopt corrective/preventive measures to combat it. This original study detected vulnerability in the assay execution, need for strategies formulation to improve the laboratory diagnosis quality and, from an epidemiological point of view insertion of specific public policies for attention to childbearing age people group.

**Keywords.** syphilis, congenital syphilis, syphilis serodiagnosis, public health.

## INTRODUÇÃO

A sífilis é uma doença milenar, infecciosa sistêmica de evolução crônica, de transmissão sexual, vertical e sanguínea causada pelo *Treponema pallidum* (*T. pallidum*: bactéria, em forma de espiroqueta, ordem Spirochaetales, gênero *Treponema*, da família dos *Treponemataceae*) e curável<sup>1,2</sup>.

O conhecimento histórico contribui com a saúde pública na interpretação e reflexão dos elementos atuais da doença. Embora curável, ainda traz desafios para a consolidação das políticas públicas, pesquisa científica e para estratégias de prevenção<sup>3</sup>.

Aspectos sociais, biológicos, culturais e comportamentais são fatores que podem influenciar na transmissibilidade e ocorrência da sífilis e, está associada à pobreza, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), abuso de drogas e subutilização do sistema de saúde. Incluindo ainda, fatores de riscos individuais de gestantes adolescentes, raça/cor não branca, baixa escolaridade, história de Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST), história de sífilis em gestações anteriores, múltiplos parceiros e baixa renda. É uma doença prevenível e de impacto na saúde pública no mundo<sup>4,5</sup>.

Poucos países dispõem de um sistema de vigilância epidemiológica efetiva que dimensione a real situação dessas doenças. Tal quadro é ainda mais comprometedor quando considerado a morbimortalidade materna e infantil, as sequelas da sífilis entre homens e mulheres acometendo o organismo de maneira severa e também, considerando que a presença do *T. pallidum* no organismo aumenta o risco de se contrair a infecção pelo vírus HIV, através das lesões e ainda, acelera a evolução dessa infecção<sup>6</sup>.

A mais grave ocorrência da sífilis é na gestação cujo desfecho é a sífilis congênita (SC). Deve-se considerar a possibilidade da mulher se infectar em outros momentos não abrangidos na assistência do pré-natal. Uma vez que, as mulheres ainda vivem em condições de vulnerabilidade em virtude da submissão ao parceiro, e esses se expõem mais, por acreditarem serem imunes à doença e terem a infidelidade como fato natural<sup>7,8</sup>.

No Brasil, publicam-se muitos estudos sobre sífilis gestacional (SG) e SC, mas poucos sobre grupo de pessoas sexualmente ativas. O aumento

do número de mulheres infectadas pela sífilis e as graves consequências dessa patologia, especialmente quando não tratada, evidência a necessidade de questionamentos acerca do problema.

Tem sido observado o aumento da prevalência da sífilis em países em desenvolvimento, associado ao aumento dos casos de sífilis primária e secundária em mulheres em idade fértil. Nos desenvolvidos, associado a homens que fazem sexo com homens (HSH), uso de drogas ilícitas, prática sexual sem proteção e à coinfeção com o HIV<sup>9</sup>.

A medida mais efetiva de controle da doença consiste em oferecer assistência adequada, diagnóstico e tratamento bem estabelecido e de baixo custo. Portanto, destaca-se a relevância do diagnóstico laboratorial que é fundamental para conter o aumento de casos da doença, muitas vezes, a única maneira de identificar a sífilis, considerando que ela tem fases assintomáticas e latentes com um leque de sinais e sintomas que podem confundir-se com inúmeras outras doenças e dificultar o diagnóstico<sup>5</sup>.

Novas políticas públicas visam ampliar o diagnóstico laboratorial com a introdução de novas técnicas e fluxogramas, com o objetivo de agilizar o diagnóstico e o tratamento<sup>10</sup>.

Este estudo buscou na literatura científica os aspectos históricos e epidemiológicos, clínicos, tratamento da SG e SC, suas repercussões perinatais e ainda, descreveu algumas políticas públicas de saúde na atenção à gestante com sífilis para erradicação da SC. Avaliou os relatórios referentes aos quesitos técnicos; as ações do Laboratório de Referência (Instituto Adolfo Lutz - Centro de Laboratório Regional de São José do Rio Preto - CLR-IAL-SJRP-X), para o diagnóstico; os aspectos evolutivos do sorodiagnóstico com a implantação do teste treponêmico *Treponema pallidum hemagglutination* (TPHA, 2007) e, o atendimento aos fluxogramas I-A em 2011 e I-B, em 2014, instituídos pela Portaria Ministerial (PM) nº 3.242/GM/MS/2011<sup>11</sup>, revogada pela PM nº 2.012/GM/MS/2016<sup>12</sup>, que aprova o Manual Técnico para o Diagnóstico da Sífilis (MT)<sup>10</sup>.

Tratou-se de uma revisão que integra o contexto histórico, dados laboratoriais e políticas públicas. Com o objetivo de traçar um panorama, apresentar as ações laboratoriais, avaliar os aspectos evolutivos do sorodiagnóstico e traçar a trajetória epidêmica da sífilis no contexto social do Brasil colonial à atualidade.

## Referencial histórico

Estudos científicos apontam três hipóteses geográficas referentes à América, à África Meridional e à Ásia para o surgimento da sífilis. A existência de alterações ósseas de natureza sifilítica, em fósseis americanos pré-colombianos (1492) reforça a possibilidade da origem americana. Assim, a doença foi da América para a Europa levada pelos marinheiros de Colombo. Outra possibilidade foi a introdução da doença por meio de Átila e Tarmelão (1450 d.C), conforme indícios da teoria asiática, que considerou as características relatadas pelo médico chinês Hongty (2.637 a.C)<sup>1,2</sup>.

O primeiro a registrar o aspecto contagioso da doença e usar o termo sífilis foi Girolamo Fracastoro (1530) no seu livro “*Syphilis sive morbus gallicus*” (Sífilis ou doença francesa), confirmado na 2ª metade do século XIX, com a teoria bacteriana de Pasteur<sup>13</sup>. Em 1539 surgiu o nome Mal Serpentino empregado por Diaz de Ysla. Jean Fernel, em 1579 usou o termo Lues (do latim peste ou epidemia) e no século XVI Jacques de Béthencourt, denominou-a de *Morbus Venereus*. Neste período, a sífilis era considerada a doença do estrangeiro e assim, recebeu várias denominações como: Mal Francês; Gálico; Polonês; Germânico; Espanhol; Cristão e Mal de Nápoles<sup>14</sup>. No século XV com o desbravamento de muitas regiões pelos europeus, encurtamento das distâncias entre cidades e continentes, consequente mobilidade, migrações massivas e contato entre as populações de diferentes regiões, facilitaram que a sífilis se espalhasse pelos continentes explorados<sup>2</sup>. Até o fim do século XV, quando ocorreu a primeira epidemia de sífilis, a doença era desconhecida e sua disseminação esteve diretamente relacionada com a campanha militar do exército de Carlos VIII, o que ocorreu em menos de dez anos<sup>14</sup>. No final do século XVIII grande parte da população europeia foi dizimada pelas epidemias de diversas doenças incluindo a sífilis<sup>15</sup>.

Na segunda metade do século XIX a Europa passa por intenso crescimento urbano, expansão econômica e industrial e a sífilis passa a ser considerada um problema de saúde pública. Assim, houve interesse e avanço na pesquisa científica com a conclusão de que a sífilis era transmitida por meio das relações sexuais. Tal constatação induziu a mudança

de comportamentos e regulamentações de medidas de combate e prevenção à sífilis<sup>16</sup>.

Por seu caráter venéreo foi associada aos desejos carnis, ao pecado e a punição divina. Os sifilíticos como os leprosos eram segregados e sem atendimento por falta de condições e intenções, por exemplo, o Hospital Geral de Paris incluía no tratamento: “sangrias, banhos, fricções com mercúrio, purgações, jejuns”, além de punições com chicotes. O primeiro tratamento da sífilis foi com mercúrio que se estendeu por 450 anos<sup>14</sup>. As pesquisas científicas de Louis Pasteur, na segunda metade do século XIX, relacionavam enfermidades com ação de micro-organismos, abandonando a visão miasmática e higienista e assim, introduzindo novas condutas terapêuticas. A nova visão confirma o caráter contagioso da sífilis e induz a elaboração de medidas preventivas e profiláticas, confirmando que o principal meio de transmissão ocorria pelas relações sexuais<sup>16,17</sup>.

A descoberta da penicilina por Alexander Fleming em 1928, proporcionou mudança e evolução no conceito relativo à definição de doença e também, um caráter curativo eficaz para combater várias epidemias. Embora, tal descoberta, não tenha sido suficiente para conter as epidemias as pesquisas científicas avançaram em direção ao descobrimento dos fatores associados à origem e manifestação em massa.

No final do século XIX, na Europa e no Brasil, criou-se a sifilografia focada no estudo da sífilis. Assim, surgiram as cátedras, os centros de tratamento e os congressos de sifilografia em várias faculdades de medicina<sup>18</sup>.

A colonização do Brasil pelos europeus somados aos negros africanos escravizados e trazidos para o continente interferiu na vida social e econômica do povo. A miscigenação, a troca de cultura transformou social e economicamente a colônia e demarcou traços europeus para solidificar os domínios e assim, houve um envolvimento sexual entre as raças<sup>18,19</sup>. No século XIX a sociedade do Brasil passou por um período de crise com o crescimento das cidades, modernização e industrialização. Porém, a questão da saúde pública ainda era precária. A sífilis ressurgiu como epidemia, o que agravou a situação caótica da sociedade, levando ao pânico<sup>18</sup>. Após o período imperial a medicina e

o Estado se aliaram no combate as epidemias com mais embasamentos científicos e motivados pelas descobertas da microbiologia. Surgiram as políticas públicas de saúde com caráter higienista. No início do século XIX começaram as propostas de saneamento, até então negligenciadas pelos portugueses<sup>16</sup>.

No Brasil republicano o estado e as autoridades médico-sanitárias passaram por mudanças conceituais em relação à ciência, modernização, doença, ações institucionais de controle e erradicação das doenças e saúde coletiva e individual<sup>18</sup>.

A característica deste período foi uma aliança entre estado e ciência com a intensificação das ações institucionais, visando o controle<sup>16</sup>.

O agente etiológico foi descoberto em 1905 por Fritz Richard Schaudinn e Paul Hoffmann na Alemanha. *T. pallidum* infecta exclusivamente o homem, não sendo cultivado *in vitro*<sup>20,21</sup>.

Em 1906, Wassermann, Neisserr e Brueck desenvolveram o primeiro exame sorológico, baseado na reação de fixação de complemento, detectando as reaginas no soro de pacientes com sífilis. Em 1907, foi substituída pela reação de floculação<sup>22</sup>.

A Saúde Pública teve avanços a partir de 1912, com a criação da primeira sociedade científica de âmbito nacional (Sociedade Brasileira de Dermatologia e Sifilografia) e também, a regulamentação sanitária e campanhas de combate ao “mal venéreo”.

Neste período, foi possível o isolamento da bactéria e diferenciação da sífilis de outras doenças infecciosas, sendo que no período anterior, houve a sifilização social no Brasil como consequência da abolição da escravatura, industrialização e imigração ao país. Somados a miséria, prostituição, desemprego, urbanização das cidades e crescimento populacional, o que contribuiu com a falência da saúde pública e o surgimento de endemias e epidemias de muitas outras doenças graves como a febre amarela e cólera<sup>23</sup>.

Em 1920 foi editado o Regulamento Sanitário, baseado nas ideias de Rabelo, que contemplava o planejamento e a expansão das campanhas antivenéreas, tratamento profilático e a criação da Inspeção de Profilaxia da Lepra e das Doenças Venéreas pelo Decreto nº 14.354/1920. Em 1921 foram criados os Institutos de Profilaxia das Doenças Venéreas e Asilo das Madalenas, um hospital para prostitutas sifilíticas, que desvinculado dos programas governamentais mostrou-se pouco efetivo<sup>18</sup>.

Com a comprovação da eficácia da penicilina (*Penicillium notatum*) em 1943 no tratamento da doença, o Brasil avança na política de saúde pública iniciada em 1920, em consonância com as aspirações do Estado Novo. Em 1940, promove a 1ª Conferência Nacional de Defesa Contra a Sífilis e assim, nesse período a sífilis esteve próxima à erradicação<sup>18</sup>.

Na década de 1960 com a conjuntura política mundial destaca-se o uso de drogas ilícitas, a liberalização sexual, censura e repressão política e protestos populares. Na década de 1980 a situação é agravada com o aparecimento do HIV. De 1990 a 2000 houve uma epidemia de sífilis entre HSH e aumento de casos notificados entre os heterossexuais.

Em 1998, o genoma do *T. pallidum* subespécie *pallidum Nichols* foi sequenciado e identificado à família de genes *Treponemapallidumrepeat-tpr(A-L)*, com sete subtipos. Estudos de Sutton et al<sup>24</sup> e de Pillay et al<sup>25</sup> identificaram o gene *arp* com 14 subtipos. Esses dados formaram a base para o desenvolvimento da técnica de PCR.

Fatores históricos repetem-se como a superpopulação, urbanização, transformando o cotidiano da população de tempos em tempos. Os fenômenos sociais contemporâneos como a globalização e a tecnologia refletem diretamente no modo de vida da população, que seguem paralelos ao desemprego, miséria e marginalização social. Como consequência, surgem as endemias com características semelhantes das ocorridas no passado<sup>26</sup>.

### Aspectos epidemiológicos

A OMS estima que ocorram 12 milhões/ano de novos casos de sífilis em todo o mundo, onde homens e mulheres entre 15 e 50 anos são os mais afetados<sup>27</sup>.

A África subsariana tem a mais elevada prevalência com quatro milhões/ano. Os demais continentes como: América do Sul e Central, Europa e América do Norte tem a prevalência decrescente. No Brasil a estimativa é de 967 mil casos novos/ano.

O aumento da incidência da sífilis adquirida (SA), nos países onde parecia estar controlada, teve como consequência o agravamento da situação atual da SC<sup>28</sup>.

A situação epidemiológica da sífilis no mundo é variável, sendo estimado com base no estudo da sífilis na gravidez. Dados globais de 2010 indicaram que a cobertura do pré-natal foi apenas 61%. Dados

mais otimistas foram observados nos países do Caribe (82%) e do Cone sul (76%), incluindo o Brasil<sup>29,30</sup>.

Desde 1986, no Brasil, por meio da PM 542/1986<sup>29</sup> instituiu-se a notificação compulsória da SC em todo o território nacional. A PM 33/2005<sup>31</sup>

tratou da notificação da SG e a PM nº 2.472/2010<sup>32</sup> da SA<sup>27</sup>. No Brasil a situação epidemiológica recente (2010/2017) revelou com os casos notificados o progressivo aumento nas taxas de incidência da SA, SG e SC conforme **Tabela 1**<sup>33-36</sup>.

**Tabela 1.** Casos notificados no Brasil, Estado de SP, \*DRS-XV, no período 2010-2016; Situação epidemiológica do Brasil em 2011 e 2017 da Sífilis Adquirida (SA), Sífilis Gestacional (SG), Sífilis Congênita (SC)

| SÍFILIS          | Casos notificados |                                    |                               | Situação Epidemiológica do Brasil         |      |
|------------------|-------------------|------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------------|------|
|                  | 2010-2016         |                                    |                               | 2011                                      | 2017 |
|                  | Brasil (100%)     | Estado de SP (% do total nacional) | *DRS-XV (% do total estadual) | Taxa de detecção SA /100mil habitantes    |      |
| Adquirida (SA)   | 299.540           | 117.113 (39,1)                     | 5.104 (4,4)                   | 9,4                                       | 58,1 |
|                  |                   |                                    |                               | Taxa de detecção SG /mil nascidos vivos   |      |
| Gestacional (SG) | 158.534           | 36.202 (22,8)                      | 869 (2,4)                     | 4,7                                       | 17,2 |
|                  |                   |                                    |                               | Taxa de incidência SC /mil nascidos vivos |      |
| Congênita (SC)   | 99.161            | 16.977 (17,1)                      | 491 (2,9)                     | 3,3                                       | 8,6  |

Fonte: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2018/boletim-epidemiologico-de-sifilis-2018>

<http://www.saude.sp.gov.br/centro-de-referencia-e-treinamento-dstaids-sp/publicacoes/boletins-epidemiologicos>

\*DRS-XV: Departamento Regional de Saúde de São José do Rio Preto, região de abrangência do CLR-IAL de SJRP-X

### Evolução na definição de casos

A definição de caso sob investigação reúne um conjunto específico de critérios os quais o investigado se enquadra. Porém, essa definição sofre modificações ao longo do tempo devido à evolução dos conhecimentos específicos do agravo e seus aspectos epidemiológicos.

Para a definição de caso de SC usava-se o “critério Kaufman” que era baseado nos dados clínico-sorológicos. No Brasil, esse critério foi utilizado de 1983 até 1988 como padrão para a definição de casos de SC. Porém, os estados tinham autonomia para estruturar as ações de vigilância epidemiológica da SC<sup>37</sup>.

Na década de 1980 o Centers for Disease Control and Prevention (CDC), nos Estados Unidos da América (EUA), estabeleceu outro critério para definição de caso, pela dificuldade do diagnóstico na criança e consequências do tratamento tardio<sup>38</sup>. Em 1989 essa definição foi revisada e os resultados

dos testes sorológicos, o quadro clínico e história de tratamento das mães, foram considerados para definir os casos como: confirmados e presumíveis. A adoção deste critério mais sensível aliado à busca ativa fez com que a incidência de SC passasse de 4,3 casos/100 mil nascidos vivos, em 1983, para 107 casos/100 mil nascidos vivos, em 1991, nos EUA<sup>38</sup>.

O Plano de Ação Regional nas Américas para a eliminação da SC, em 1991, foi definido pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) com base no número de casos/ano do continente americano (cerca de 240.000 casos/ano), possibilidade de transmissão vertical (prevenível e tratável), tratamento da gestante e prevenção da reinfecção. A OPAS padronizou os critérios e apresentou uma nova definição de caso proposta pelo CDC e assim, os países membros adotaram os seguintes métodos e estratégias: desenvolvimento e o fortalecimento do sistema de Vigilância Epidemiológica (VE) da SC de forma ativa e o fortalecimento da capacidade dos serviços de pré-natal<sup>30</sup>.

Em 1992 o Brasil, por meio do Ministério da Saúde (MS), assume a SC como um problema de saúde pública com vistas à eliminação. Em 1993 lançou o documento “Bases Técnicas para a Eliminação da SC”, cuja meta visava um coeficiente de incidência menor ou igual a um (01) caso por 1.000 nascidos vivos até o ano 2000. Nesse período a definição da SC era baseada nos exames físico e radiológico, resultados laboratoriais e acompanhamento de dados sorológicos<sup>37</sup>.

Para fins de vigilância epidemiológica os critérios vigentes de definição de casos de SA, SG, e SC foram estabelecidos em setembro de 2017:

1. Foram incluídas as mulheres diagnosticadas com sífilis no pré-natal<sup>30</sup>, no parto e/ou no puerpério como casos de SG e não mais como SA. Assim, devem ser notificados os casos: assintomáticos (sem registro de tratamento prévio) e sintomáticos que apresentem pelo menos um teste reagente (treponêmico ou não treponêmico com qualquer titulação) e, independentes da sintomatologia apresentem teste não treponêmico reagente com qualquer titulação e teste treponêmico reagente;

2. Foi desconsiderado o tratamento da parceria sexual da mãe e definidos como casos a serem notificados os: recém-nascidos, natimortos ou abortos de mulheres com sífilis não tratadas ou tratadas de forma inadequada e, crianças com menos de 13 anos que apresentem: (a) teste não treponêmico reagente e alteração clínica, ou líquórica ou radiológica de SC e, (b) títulos de teste não treponêmicos do lactente maiores do que os da mãe (pelo menos duas diluições de amostras de sangue periférico, coletadas simultaneamente);

3. Devem ser notificados como casos de SA os: assintomáticos que apresentem teste não treponêmico e treponêmico reagentes e, sintomáticos com pelo menos um teste reagente (treponêmico ou não treponêmico)<sup>39,40</sup>.

### **Transmissão e manifestações clínicas**

Pode ser transmitida, principalmente, por via sexual e vertical. De acordo com as diretrizes do MS para o controle da SC, desenvolvidas pelo Programa Nacional de Controle de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids (PN-DST/Aids), a probabilidade de transmissão vertical depende do estágio da doença na mãe e da duração

da exposição ao feto no útero. A transmissão será maior nas fases iniciais, quando há “espiroquetemia” na circulação. Infecção mais antiga leva à formação progressiva de anticorpos pela mãe, atenuando a infecção no conceito e produzindo lesões mais tardias na criança. Também, a presença de lesões ativas pode contaminar o feto na passagem pelo canal do parto<sup>41</sup>.

Aspectos sociais, biológicos, culturais e comportamentais são fatores que podem influenciar na transmissibilidade e ocorrência da sífilis e, está associada à pobreza, infecção pelo HIV, abuso de drogas e subutilização do sistema de saúde. Incluindo ainda, fatores de riscos individuais de gestantes adolescentes, raça/cor não branca, baixa escolaridade, história de Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST), história de sífilis em gestações anteriores, múltiplos parceiros e baixa renda<sup>5,42</sup>.

### **Manifestações clínicas mais comuns da SC:**

Aborto espontâneo/natimorto/hidropisia fetal (em 40% dos casos de sífilis contraída durante a gestação); Rinite ou descarga nasal (em 40% dos casos); Rash cutâneo (em 50% dos casos); Neurosífilis (em 50% dos casos); Alterações musculoesqueléticas (em 25% dos casos); Dentes de Hutchinson e Surdez neurosensorial<sup>43</sup>.

### **Manifestações clínicas da sífilis na gestação nos seguintes estádios:**

O período de incubação é assintomático e inicia pelo contato da espiroqueta no local da inoculação. Em seguida, ocorrem os estádios: primário - Sífilis recente, geralmente se manifesta como um nódulo indolor único no local do contato, que se ulcera rapidamente, formando o cancro duro; secundário: nessa fase da doença, são comuns sinais e sintomas sistêmicos da infecção, mimetizando manifestações clínicas de outras enfermidades e, dessa forma, sendo frequentemente confundida com outros diagnósticos. Podem ocorrer erupções cutâneas em forma de maculas (roséola) e/ou pápulas; latente período em que não se observa nenhum sinal ou sintoma clínico de sífilis, terciária: estágio menos frequente na atualidade, é comum o acometimento do sistema nervoso e cardiovascular e a formação de gomas sífilíticas<sup>6</sup>.

A infecção não confere imunidade, portanto a reinfecção é de acordo com a exposição e até o momento não há vacina. Os sinais, o tempo de apresentação, os sintomas da sífilis variam dependendo do estado imunológico do hospedeiro e da terapia antimicrobiana para outros patógenos<sup>6,44</sup>. Ressalta-se que quando não tratadas, cerca de 40% das pessoas com sífilis progredirão para a cura espontânea, outros 30% permanecerão em estado de latência por toda vida e as restantes (30%) evoluirão para sífilis terciária<sup>45</sup>.

## Evolução do diagnóstico laboratorial

### Testes Diagnósticos

O diagnóstico da sífilis é baseado na história clínica e epidemiológica, sintomatologia e exames complementares. Para o sorodiagnóstico utilizam-se exames diretos; testes imunológicos e métodos de biologia molecular<sup>46,47</sup>.

#### Princípios e Técnicas laboratoriais

##### 1. Exames diretos

###### 1.1. Exame em campo escuro

Realizado por microscopia em campo escuro, não requer coloração específica. É considerado o teste mais eficiente e de baixo custo para o diagnóstico direto da sífilis<sup>10,45,48</sup>.

###### 1.2. Pesquisa direta com material corado

Métodos microscópicos menos sensíveis que os de campo escuro: Fontana-Tribondeau; Burri; Levaduti e Giemsa.

##### 2. Testes imunológicos

###### 2.1. Não treponêmicos - Venereal Disease Research Laboratory (VDRL)

Detectam anticorpos (Ac) não treponêmicos (anticardiopina) não específicos. Floculação rápida no soro para antígeno não treponêmico na pesquisa de reaginas (Ac IgM e IgG inespecíficos contra cardiolipina liberada pelos treponemas). Possibilita a titulação que é importante no controle do tratamento. Podem ocorrer baixos títulos em pacientes corretamente tratados (cicatriz sorológica)<sup>10</sup>.

###### 2.1.1. Rapid Test Reagin (RPR)

Baseia-se no VDRL, com modificações, possibilitando a utilização no plasma. Podem ser: qualitativo - presença ou não de Ac não específico (não

reagente/reagente) realizado no soro puro e diluído 1/8 (para detectar o efeito pró-zona); quantitativo - estima a quantidade de Ac presentes em função da diluição seriada da amostra. As diluições (títulos) são informações importantes para estabelecer a fase da infecção e também, a resposta ao tratamento<sup>10,49</sup>.

##### 2.2. Treponêmicos

Detectam Ac específicos para os antígenos do *T. pallidum* (geralmente IgM e IgG)

###### 2.2.1. *Treponema pallidum* Hemagglutination Test (TPHA)

O teste de hemaglutinação indireta ou passiva baseia-se na ligação dos anticorpos treponêmico com hemácias que contém na superfície antígenos de *T. pallidum* (cepa Nichols). Aglutinação: identifica anticorpos treponêmicos (suspensão de hemácias de aves sensibilizadas com componentes solúveis de *Treponema pallidum*, usando como diluente uma solução contendo azida sódica 0,1%).

###### 2.2.2. Fluorescent treponemal antibody absorption (FTA-abs)

A reação é de absorção ou bloqueio de anticorpos não específicos presentes no soro, pela utilização de treponemas saprófitos (treponema de Reiter). Imunofluorescência indireta (microscópio de fluorescência): utiliza lâminas nas quais são fixados antígenos do *T. pallidum*; antigamaglobulina G humana marcada com isotiocianato de fluoresceína<sup>50</sup>.

###### 2.2.3. Ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA)

Os testes imunoenzimáticos utilizam suportes sensibilizados com antígenos totais de *T. pallidum* ou componentes antigênicos sintéticos de *T. pallidum*<sup>10,50</sup>.

###### 2.2.4. Quimioluminescência (variação do método ELISA)

O teste de imunoensaio mede diretamente a quantidade de luz que a reação ácido-base do marcador quimioluminescente, éster de acridina (EA), emite.

###### 2.2.5. Testes rápidos (TR)

São testes imunocromatográficos qualitativos, de execução, leitura e interpretação do resultado que ocorrem em 30 minutos, sem a necessidade de estrutura laboratorial. Utilizam antígenos do *T. pallidum* e um conjugado composto por antígenos recombinantes de *T. pallidum* que são ligados a um agente revelador<sup>10</sup>.

### 2.3. Testes Moleculares

#### 2.3.1. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Baseia-se na síntese de um fragmento específico de DNA que resulta na multiplicação exponencial do fragmento, por meio de ciclos sucessivos de repetição até que tenha quantidade suficiente de produto amplificado para sua detecção (amplificação de ácidos nucleicos)<sup>46,51</sup>.

#### 2.3.2. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (PCR-TR)

Utiliza sondas de hibridação marcadas com fluorômetros para detecção dos fragmentos amplificados. A amplificação e detecção de DNA ocorrem em uma única etapa diminuindo a possibilidade de contaminação<sup>46,47</sup>.

### Tratamento

No início do século XVIII, o tratamento era empírico utilizando mercúrio, arsênio, bismuto e iodetos. Tais tratamentos eram de baixa eficácia e alta toxicidade. Valendo-se do conceito da pouca resistência do treponema ao calor, utilizavam também, tratamentos com base no aumento da temperatura corporal (banhos quentes) e inoculação de plasmódios na circulação (malarioterapia)<sup>16</sup>. Em 1909 Sahachiro Hata e Paul Erlich (Prêmio Nobel/1913), na Alemanha, estudaram cerca de 3.000 compostos derivados de arsênio. Assim, sintetizaram o composto de número 606 que se mostrou mais potente e seguro para o tratamento (nome comercial: Salvarsan). Em 1913 sintetizaram o de número 914, denominado Neosalvarsan. Surgiu então, o primeiro quimioterápico da história da medicina<sup>49</sup>.

A história e os procedimentos começaram a mudar a partir da identificação do agente etiológico, na Europa, e a descoberta do poder bactericida do fungo *Penicillium notatus*, por Fleming em 1928. Mas, a penicilina só foi utilizada pela primeira vez com sucesso para o tratamento da enfermidade, em 1943<sup>9,49</sup>. Foi a responsável pela revolução terapêutica da sífilis e diminuição da incidência que era de 72 casos/100 mil habitantes em 1943 para quatro em 1956<sup>52</sup>.

A penicilina mudou a história da sífilis e indiretamente da medicina e da humanidade, inaugurou uma nova era, a dos antibióticos. A sífilis pode, então, ser tratada e até nos dias atuais o medicamento é utilizado com sucesso, pois, não apresenta perfil de resistência treponêmica à droga. Embora uma pequena parcela da população apresente hipersensibilidade à penicilina

existe a alternativa de utilizar seus derivados. Exceção são os fetos que devem ser tratados exclusivamente com a penicilina<sup>43,49,53</sup>.

Torna-se pertinente registrar, porém não abordando o aspecto ético da pesquisa, o famoso Estudo Tuskegee que ocorreu entre 1932 e 1972 cujo objetivo foi observar a evolução da doença, livre de tratamento. Essa pesquisa envolveu 600 homens negros, 399 com sífilis e 201 sem a doença. Ao longo do estudo 40 esposas e 19 recém-nascidos foram contaminados. Após 40 anos de acompanhamento havia 74 sobreviventes. A instituição responsável pela condução do projeto, nas suas últimas etapas, foi o CDC. Desse projeto resultaram 13 publicações fundamentando o objetivo do estudo<sup>54</sup>.

No Brasil o tratamento da sífilis é baseado nos Protocolos: Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Atenção Integral as Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis (PCDT-IST)/2015; e Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Prevenção da Transmissão Vertical de HIV, Sífilis e Hepatites Virais (PCDT-TV)/2019<sup>6,43</sup>.

### Políticas públicas

A OPAS entre 1983 e 1985 promoveu reuniões técnicas de intercâmbio que culminaram, em 1986, na constituição do Núcleo de Aids para a elaboração dos Programas nos países latino-americanos. A Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2000 propôs a meta de eliminação da SC para alcançar, em 2015, os “Objetivos de Desenvolvimento do Milênio” (ODM) com índices de 0,5 caso de SC/1.000 nascidos vivos. Em 2002 propôs um plano de ação concreto para alcançar tal índice, o que ainda não ocorreu. Assim, os objetivos continuam com a intensificação de ações e estratégias efetivas centradas principalmente na atenção básica à saúde<sup>41,44</sup>.

### Ações e estratégias no Brasil

Em 1988 foi criado o PN-DST/Aids com o objetivo de enfrentar a epidemia. Na década de 1990 a política nacional para doenças sexualmente transmissíveis (DST) estava voltada para intensificar a assistência farmacêutica, garantir o acesso universal gratuito aos medicamentos e exames laboratoriais necessários para o monitoramento do tratamento, na rede pública de saúde.

O MS por meio do PN-DST/Aids teve atuação relevante nos anos de 1992 a 1999 com os seguintes

destaques: (1992) cria um novo plano estratégico do Programa Nacional incluindo financiamento com o Banco Mundial, que se estendeu de 1998 a 2002. Tais recursos contribuíram para a melhoria da qualidade do diagnóstico, tratamento e assistência aos portadores de DST/Aids, que propiciaram condições favoráveis sem precedentes no país<sup>55</sup>; (1993) publica o “Manual de Controle das Doenças Sexualmente Transmissíveis”, revisa a Ficha de Investigação Epidemiológica da SC, e inicia a notificação da SC por meio do Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN); (1995) participa da 116ª Reunião do Comitê Executivo da OPAS, esboça o Plano de Ação para Eliminação da SC (Resolução CE 116.R3 da OPAS) com meta de 0,5 caso/1.000 nascidos vivos até 2000; (1996) implanta medidas de controle da SC; (1997) adequa a meta de eliminação à política nacional de controle e assume um 01 caso /1.000 nascidos vivos; (1999) avalia os critérios para definição de caso e inclui o parceiro no tratamento.

De 2000 a 2015 o MS realizou as seguintes ações: (2000) publica a PM nº 569/GM/MS/2000<sup>56</sup> do Programa de Humanização do Pré-natal e Nascimento preconizando exame, ofertando teste anti-HIV, com o objetivo de desenvolver ações preventivas e assistência à gestante e ao recém-nascido (RN). Pela nova proposta de intervenção já no pré-natal, muda o conceito de tratar a criança infectada que vigorava desde 1992; (2003) revisa a definição de caso de SC e estabelece critérios mais rigorosos para registro no SINAN; (2004) entra em vigor a nova definição de caso e o conceito de mãe com sífilis, como critério laboratorial, o teste não treponêmico com qualquer título, na ausência do teste treponêmico, e o histórico de tratamento inadequado<sup>37</sup>. Na sequência publica a PM nº 766/GM/MS/2004<sup>57</sup> que expande a oferta do teste VDRL para as parturientes internadas; (2005) publica a PM nº 33/GM/MS/2005<sup>31</sup> tornando a SG agravo de notificação compulsória e o PN-DST/Aids desenvolve protocolo que visa efetivar as medidas preconizadas pelo MS como a: notificação compulsória da SC, desde 1986, para todos os casos detectados, incluindo natimortos e abortos por sífilis, e intensificação das medidas de prevenção à doença<sup>29,52</sup>. Para tanto implantou triagem, diagnóstico e tratamento imediato de SC nas situações: prevenção e educação sexual (antes e durante a gravidez), exames clínicos indicados para o diagnóstico para ambos os

parceiros e, controle da SC a partir da efetividade de consultas na assistência pré-natal com exames clínicos, para ambos os parceiros, ao longo do puerpério<sup>41</sup>. De modo particular, em 2007, o estado de São Paulo (ESP) lança o Plano de Eliminação da Transmissão Vertical da Sífilis, intensificando as ações na atenção básica e incorporou em 2010, as metas para eliminação da transmissão vertical do HIV (Plano de Eliminação da Transmissão Vertical do HIV e da Sífilis)<sup>41,44</sup>. Em (2011) lança o programa “Rede Cegonha” que amplia o acesso ao diagnóstico precoce de sífilis em gestante e implanta os testes rápidos para o diagnóstico do HIV e triagem da sífilis no âmbito da Atenção Básica como estratégia para esses diagnósticos, assegurando à mulher e à criança o direito à atenção humanizada durante o pré-natal, parto/nascimento, período pós-parto, atenção infantil em todos os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde (SUS)<sup>58</sup>. Visando alcançar as metas estabelecidas, em 2010, pela OPAS e pelo Fundo das Nações Unidas para a Infância (Unicef), cujo objetivo era a redução da taxa de transmissão vertical da incidência de SC para menos de 0,5 caso por 1.000 nascidos vivos até 2015<sup>30</sup>. Em 2013, o ESP intensifica a captação precoce da gestante para o pré-natal por meio do Programa Estadual de DST-Aids de São Paulo (PE-DST/Aids-SP) visando o monitoramento sorológico; o rastreamento de sífilis em gestantes; o tratamento adequado para a fase da doença da gestante e parceiro sexual; o registro do tratamento e dos resultados dos exames no cartão do pré-natal; e o cuidado a parturiente e RN<sup>41,44</sup>; (2015) publica o PCDT-IST<sup>6</sup>, onde o termo infecções sexualmente transmissíveis passou a ser adotado acompanhando a comunidade científica, OMS e OPAS. Esse documento direcionou os gestores para estratégias de atenção integral, eficaz e resolutiva. Assim, orientou o manejo programático e operacional, as ações dos profissionais de saúde na triagem, diagnóstico e tratamento. Nas ações de prevenção enfocou a população sobre a possibilidade de ter e transmitir uma infecção, mesmo sem sinais e sintomas.

Entre 2016 e 2018 destacam-se: (2016) para a redução da prevalência da SC publica a PM nº 2.012/2016<sup>12</sup>, que preconiza a testagem para sífilis no primeiro e terceiro trimestres da gestação. Na maternidade, realizar um teste treponêmico ou não treponêmico, laboratorial ou rápido, em

toda mulher admitida para parto (nascido vivo ou natimorto) ou curetagem (após aborto). Nas gestantes positivas o controle mensal de tratamento e cura deve ser até o parto; (2016) o MS publica a PM nº 204/2016<sup>59</sup> onde define uma lista de doenças sexualmente transmissíveis de notificação compulsória, incluindo a sífilis; (2017) para fins de vigilância epidemiológica altera os critérios de definição de casos de SASG.

O conjunto das ações inseridas nos serviços de atenção básica, por meio dos programas de saúde, identifica os casos, possibilita o tratamento precoce (gestante e parceiro sexual) e desenvolve medidas de prevenção<sup>60</sup>.

### **Atuação do Laboratório de Saúde Pública**

O Laboratório de Saúde Pública (LSP) tem a missão de contribuir com as soluções pertinentes para os principais agravos que comprometem a saúde do cidadão, e alimentar o sistema de saúde com as informações para a tomada de decisões, quanto às medidas de controle a serem adotadas pela sociedade e pelos órgãos de vigilância para o bem-estar da coletividade.

Estudos laboratoriais e populacionais integrados aos órgãos de Vigilância Sanitária (VS) e Vigilância Epidemiológica (VE), conferem objetividade às ações e controle de agravos de saúde pública. Este conjunto de ações tem o reconhecimento legal do direito a integralidade da saúde, por meio do SUS, o qual dispõe de uma rede de instituições de ensino e pesquisa que interage com os serviços de saúde. Destacando o controle das IST com a fundamental atuação dos LSP.

O Instituto Adolfo Lutz, instituto de pesquisa, ensino e referência de laboratório de saúde pública do ESP tem importante papel nas ações de controle da sífilis. Realiza o diagnóstico laboratorial rápido e confiável, emite os dados para a VE e elabora ações junto aos outros serviços de saúde, conforme a PM nº 25/2011<sup>61</sup> da Coordenadoria de Controle de Doença (CCD) da Secretaria de Estado da Saúde (SES/SP), que dispõe sobre as medidas a serem seguidas em testes laboratoriais para o diagnóstico da sífilis. Para a definição dos resultados o laboratório segue o fluxograma laboratorial da sífilis descrito na PM nº 2.012/2016<sup>12</sup>.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz (CEPIAL): Parecer nº 1295964; Nº de CAAE: 49309115.7.0000.0059. Foi dispensado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), uma vez que, os dados (previamente codificados para garantir o sigilo e a confidencialidade) foram extraídos dos relatórios, tabelas, gráficos para a formação de série histórica e projeções.

Para o histórico da sífilis foram revisados artigos científicos indexados nas bases de dados PubMed-National Library of Medicine (EUA), Scielo (Scientific Electronic Library Online), Lilacs (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde), PAHO (PanAmerican Health Organization), BVS (Biblioteca Virtual em Saúde) e Google. Obtidos por meio de descritores isolados e agrupados como: sífilis, sífilis congênita, sorodiagnóstico da sífilis, saúde pública. A revisão resultou em 200 publicações analisadas e 63 selecionadas entre artigos científicos, Boletins Epidemiológicos, Manuais Técnicos e Portarias, que abordaram os temas pertinentes. A coleta desses dados foi por meio de leitura exploratória, seletiva, analítica e interpretativa.

Para o estudo retrospectivo (descritivo e quantitativo) dos dados laboratoriais foram compilados 12.328 resultados oriundos dos relatórios de produção, de março de 2005 a dezembro 2016, do CLR-IAL-SJRP-X, que é o Laboratório de Referência (LR) e, dos Laboratórios Regionais de Apoio (LRA) de: Jales, Fernandópolis, Votuporanga. Assim, foram analisados: dados quantitativos referentes aos tipos de testes, número de diluições seriadas; relatórios dos resultados sorológicos emitidos pelos LRA e, situações futuras de curtos e curtíssimos prazos (2050; 2020).

O CLR-IAL-SJRP-X realizou a confirmação dos testes sorológicos das amostras coletadas e triadas nos LRA, assistindo os 102 municípios, abrangidos por dois Grupos de Vigilância Epidemiológica (GVE-XXIX - São José do Rio Preto e GVE-XXX - Jales) que compõem os diferentes serviços do Departamento Regional de Saúde XV (DRS-XV) cujas regiões totalizam uma população de 1.493.835 habitantes<sup>33,34,62</sup>.

Evidenciou assim, que o estudo contribuiu para estabelecer um panorama do diagnóstico laboratorial da sífilis com a implantação dos fluxogramas I-A e

I-B da PM/2011<sup>11</sup> estabeleceu uma série histórica de 2005 a 2016 e formulou estratégias para a melhoria da qualidade no diagnóstico da sífilis, detectando-se os pontos vulneráveis no diagnóstico laboratorial da doença.

Tratou-se de uma revisão integrativa, que sintetizou a evolução histórica da doença (aspectos epidemiológicos, evolução do tratamento e do diagnóstico laboratorial); quantificou dados do diagnóstico laboratorial (construção da série histórica com dados dos relatórios de produção).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo apresentou limitações em relação às amostras, pois elas foram originárias dos LRA que resultaram, inicialmente, em testes indeterminados, positivos e/ou que geraram dúvidas técnicas.

Com base no Relatório da rotina laboratorial (relatórios de produção) foi possível avaliar as amostras testadas e dividir em quatro períodos cronológicos, conforme dados apresentados na **Tabela 2**.

**Tabela 2.** Distribuição do número de amostras testadas na triagem, controle de tratamento, por período estudado e teste aplicado; Resultado do Plano Piloto (implantação do teste treponêmico TPHA) com as amostras VDRL reagentes do 1º período

| Períodos            | Testes                                        | Amostras testadas |                        |                     | Conclusão do laudo |             |              |               |
|---------------------|-----------------------------------------------|-------------------|------------------------|---------------------|--------------------|-------------|--------------|---------------|
|                     |                                               | Triagem           | Controle de Tratamento | Teste não realizado | Plano Piloto       | Reagente    | Não Reagente | Indeterminado |
| 1º                  | VDRL                                          | 7601(100%)        | Sem informação         | ---                 |                    | 602 (7,9%)  | 6999(92,1%)  | ----          |
| 2º                  | VDRL+TPHA                                     | 2272(100%)        | Sem informação         | ---                 |                    | 191(8,4%)   | 2033(89,5%)  | 48(2,1%)      |
| 3º                  | VDRL + 2 testes treponêmicos (Fluxograma I-A) | 1062(100%)        | 35(3,3%)               | 31(2,9%)            |                    | 535(50,4%)  | 409(38,5%)   | 52(4,9%)      |
| 4º                  | Quimioluminescência (Fluxograma I-B)          | 1393(100%)        | 90(6,5%)               | 95(6,8%)            |                    | 872(62,6%)  | 302(21,7%)   | 34(2,4%)      |
| <b>Plano Piloto</b> | TPHA                                          |                   |                        |                     | 602 (100%)         | 474 (78,7%) | 128(21,3%)   | ---           |

Fonte: próprio autor

### Caracterização dos períodos estudados:

#### 1º Período

Março 2005 a junho 2007, quando a triagem sorológica era realizada só com o teste VDRL, no CLR-IAL-SJRP-X e nos LRA;

#### 2º Período

Julho a dezembro de 2007, com a descentralização foi acrescentado na rotina dos LRA o TPHA;

#### 3º Período

Janeiro 2012 a agosto 2014, com a consolidação da descentralização e a implantação do fluxograma I-A PM nº 3.242/2011<sup>11</sup>, introdução do segundo teste treponêmico no CLR-IAL-SJRP-X;

#### 4º Período

Setembro 2014 a dezembro 2016, com a implantação do fluxograma I-B e introdução do teste imuno ensaio quimioluminescente (IQ).

No primeiro período, na triagem, os títulos variaram de 1/1 até 1/1024 e, 45,1% (325) das diluições sucessivas necessárias para definir essa titulação, nos LRA, foram diferentes das realizadas no LR, tratando-

se da mesma amostra. Um número expressivo que denotou dificuldade para definir a reatividade do teste. A testagem sorológica só com o teste não treponêmico leva a uma perda do rastreamento da sífilis primária, latente e sífilis tardia, principalmente, devido à baixa sensibilidade do teste. A implantação conjunta do teste treponêmico (TPHA) trouxe mais rigor em relação aos resultados falso-positivos dos não treponêmicos. Com o intuito de prever o impacto da implantação do TPHA, como testagem sorológica confirmatória, a equipe do CLR-IAL-SJRP-X desenvolveu um plano piloto em junho de 2007, testando novamente amostras com resultados VDRL positivos, que originou os dados da **Tabela 2**. Assim, a partir de 2007 foi acrescentado na rotina dos LRA o teste TPHA com o objetivo de acelerar a definição do resultado, pois o fator tempo é crucial para o início do possível tratamento.

No segundo período, em termos de sorodiagnóstico observou-se que com a introdução de mais um teste treponêmico acarretou em 48 (2,1%) testes indeterminados assim denominados, pois apresentaram

resultados discordantes entre os testes treponêmicos e não treponêmicos. Tais resultados contribuíram para identificar os falso-positivos, que levaram a uma investigação mais criteriosa para a definição do caso.

Para minimizar as limitações particulares de sensibilidade/especificidade dos testes empregados foi introduzido mais um teste treponêmico, conforme PM nº 3.242/2011<sup>11</sup>, ou seja, empregou-se um teste não treponêmico, como primeiro teste, seguido por dois treponêmicos, com o objetivo de aumentar o valor preditivo positivo (VPP). A referida portaria, com uma abordagem convencional, também, padronizou a sequência dos testes por meio do fluxograma I-A<sup>11</sup>.

Para atender o fluxograma I-A<sup>11</sup> as amostras com resultados indeterminados nos testes TPHA (provenientes dos LRA) foram submetidas ao segundo teste treponêmico, FTA-abs, (no LR) para definição dos resultados. O que aumentou a possibilidade de detectar falso-negativo no teste treponêmico anterior. Essa situação, do terceiro período, está apresentada na **Tabela 2**.

A introdução do fluxograma I-B<sup>11</sup> (quarto período) trouxe o conceito da abordagem reversa à convencional, que inicia a testagem sorológica com o IQ<sup>10</sup>. Na prática, define a amostra “não reagente” com apenas um teste. Diferente da iniciada pelo VDRL, que para a mesma definição, utiliza dois procedimentos de diluição (1:1 e 1:8).

Observou-se também, que aumentou a captação dos resultados “reagentes” e diminuiu os “indeterminados”. Definiu melhor o resultado, com menos etapas de testagem e maior rapidez. A introdução do IQ teve impacto orçamentário e na triagem sorológica quanto ao maior número de amostras analisadas, menor tempo para liberação do resultado, maior sensibilidade, eficiência dos ensaios e menor custo/teste. Esta técnica apresenta objetividade e avanço tecnológico, porém podem ocorrer casos de falso-positivos.

Fato observado também foi a crescente taxa de reatividade ao longo dos períodos, que pode ser atribuída ao melhor acesso ao sistema de saúde, aumento do fluxo de amostras na rotina laboratorial, aplicação dos fluxogramas para auxiliar e padronizar o diagnóstico da sífilis. Além, da evolução tecnológica dos testes sorológicos que apresentam maior sensibilidade e especificidade com destaque ao quarto período com a consolidação da IQ (**Tabela 2**).

Dados numéricos de 2017 contabilizam 426 testes de IQ realizados no CLR-IAL-SJRP-X, encaminhados pelos LRA, para sanar dúvidas originárias dos testes VDRL e/ou TPHA. Uma vez que essas leituras são subjetivas e o teste automatizado supera essa subjetividade, pois apresenta especificidade vantajosa na triagem sorológica<sup>63</sup>.

Dentre os 426 testes automatizados, 46 (10,8%) resultaram em “não reagente” definindo como amostra não reagente para sífilis, conforme o fluxograma I-B de abordagem reversa.

Dados calculados para este estudo demonstraram que para definição do resultado, aplicando o fluxograma I-A, foram necessários em média 2,2 testes/paciente; e 1,7 teste/paciente, para o fluxograma I-B. Tal informação é importante para evitar o desabastecimento dos insumos, visto que, os fluxogramas I-A e I-B são aplicados atual e rotineiramente, de acordo com a infraestrutura do laboratório executor.

No Brasil, de 2012 a junho de 2017, com a implantação do fluxograma I-A (30.12.2011) foram diagnosticados 560.608 (100%) casos de sífilis dos quais 320.570 (57,2%) de SA; 149.227 (26,6%) de sífilis em gestante e, 90.811 (16,2%) de SC.

A tendência para 2020 com projeção de crescimento populacional de 1,9 % e mantendo a taxa de detecção de 58,1 (2017) teremos projetado 123 mil novos casos de SA no Brasil e 37 mil em São Paulo (SP) como sugere os dados da **Tabela 3**.

Esses indicadores permitem avaliar os índices de incidência e são úteis para a estimativa da magnitude do problema e da transmissão da doença. Os dados relativos à detecção de casos são também essenciais para calcular a quantidade de testes laboratoriais necessários para atender a demanda. Uma previsão otimista demandaria aproximadamente 370 mil testes/ano, dos quais 110 mil destinados ao ESP.

O Brasil segue a tendência mundial de queda gradual da população devido as variáveis como fecundidade, mortalidade e migrações<sup>34</sup>.

Nas distribuições temporal e espacial da sífilis associadas às taxas de detecção e de incidência, apontaram novos casos em todos os cenários da infecção. Esse número está associado aos impactos provocados no Brasil, ESP e DRS-XV. Em particular, a região de São José do Rio Preto (SP) foi determinante no impacto da região de abrangência do DRS-XV (**Tabela 3**).

**Tabela 3.** Projeção dos casos de sífilis no Brasil, Estado de São Paulo, DRS-XV, 2020 e 2050

| População          | Brasil                                  |                  |                  | ESP                                  |                  |                   | DRS XV                               |                  |                    |
|--------------------|-----------------------------------------|------------------|------------------|--------------------------------------|------------------|-------------------|--------------------------------------|------------------|--------------------|
|                    | 2017                                    | 2020             | 2050             | 2017                                 | 2020             | 2050              | 2017                                 | 2020             | 2050               |
| Homens             | 100.715.551                             | 103.527.689      | 113.300.060      | 22.006.254                           | 22.572.327       | 25.154.242        | 760.178                              | 772.450          | 750.729            |
| Mulheres           | 106.945.378                             | 108.228.003      | 119.633.216      | 23.143.349                           | 23.717.006       | 26.251.736        | 783.668                              | 797.971          | 779.241            |
| Total              | 207.660.929                             | 211.755.692      | 232.933.276      | 45.149.603                           | 46.289.333       | 51.405.978        | 1.543.846                            | 1.570.421        | 1.529.970          |
| Taxa de cresc.(%)  | 0,8                                     | 1,9<br>(0,6/ano) | 9,0<br>(0,3/ano) | 0,9                                  | 2,5<br>(0,3/ano) | 11,0<br>(0,4/ano) | 0,6                                  | 0,6<br>(0,2/ano) | -2,6<br>(-0,1/ano) |
| Casos              | 2016                                    | 2017             | nº de novos      | 2016                                 | 2017             | nº de novos       | 2016                                 | 2017             | nº de novos        |
|                    | Nº de casos<br>(Taxa <sup>1,2,3</sup> ) |                  |                  | Nº casos<br>(Taxa <sup>1,2,3</sup> ) |                  |                   | Nº casos<br>(Taxa <sup>1,2,3</sup> ) |                  |                    |
| SG                 | 38.144                                  | 49.013           | 10.869           | 8.389                                | 10.560           | 2.171             | 212                                  | 267              | 55                 |
| <sup>1</sup> TD-SG | (13,3)                                  | (17,2)           | (29,3)           | (13,9)                               | (17,5)           | (25,9)            | (13,3)                               | (14,5)           | (9,0)              |
| SC                 | 21.183                                  | 24.666           | 3.483            | 3.661                                | 4.073            | 412               | 71                                   | 112              | 41                 |
| <sup>2</sup> TI-SC | (7,4)                                   | (8,6)            | (16,2)           | (601)                                | (6,8)            | (11,5)            | (4,2)                                | (5,4)            | (28,6)             |
| SA                 | 90.883                                  | 119.800          | 28.917           | 31.160                               | 36.011           | 4.851             | 1.172                                | 1.515            | 343                |
| <sup>3</sup> TD-SA | (44,1)                                  | (58,1)           | (31,7)           | (69,9)                               | (80,5)           | (15,7)            | (59,5)                               | (74,8)           | (25,6)             |

Fonte: <http://produtos.seade.gov.br/produtos/projpop/index.php>

<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/sociais/populacao/9109-projecao-da-populacao.html?edicao=9116&t=resultados>

<http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2018/boletim-epidemiologico-de-sifilis-2018>

<http://www.saude.sp.gov.br/centro-de-referencia-e-treinamento-dstaid-sp/publicacoes/boletins-epidemiologicos>

Nota: <sup>1</sup>TD-SG: Taxa de detecção da sífilis em gestantes/1.000 nascidos vivos; <sup>2</sup>TI-SC: Taxa de Incidência da sífilis congênita/1.000 nascidos vivos;

<sup>3</sup>TD-SA: Taxa de detecção da sífilis adquirida/100.000 habitantes

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A sífilis embora curável exige ações efetivas das políticas públicas e desafios para a ciência. O conhecimento e a evolução da história contribuem para essas ações. Este estudo demonstrou que existem falhas entre a intenção e os resultados efetivos de ações para controle e erradicação da doença no que se refere à qualidade dos serviços, capacitação de técnicos, ampliação de acesso e educação sexual de profilaxia. Para a adoção do protocolo da PM nº 2.012/GM/MS/2016<sup>12</sup> o estudo identificou as principais barreiras: treinamento deficiente do pessoal técnico dos LRA e das unidades de atendimento; oferta insuficiente do teste rápido; interrupção do abastecimento de kits (faltas periódicas dos testes treponêmicos para o cumprimento do fluxograma) e, acesso deficitário aos serviços de saúde. Novas ações de combate à sífilis efetivadas por meio dos programas de saúde identificam os casos, possibilitam o tratamento precoce (gestante e parceiro sexual) e desenvolvem medidas de prevenção<sup>60</sup>. Para tanto, definir os casos de sífilis com base nos resultados dos testes laboratoriais são essenciais para conhecer o número de casos e sua tendência. O que fundamenta uma das

principais características do LSP que são: contribuir com estudos científicos, alimentar o sistema de saúde, elucidar e monitorar agravos para adequada tomada de decisões sobre políticas públicas.

Com relação aos aspectos evolutivos do sorodiagnóstico observou-se a crescente taxa de reatividade ao longo dos períodos estudados, que pode ser atribuída ao melhor acesso ao sistema de saúde, aumento do fluxo de amostras na rotina laboratorial, aplicação dos fluxogramas para auxiliar e padronizar o diagnóstico da sífilis. Além, da evolução tecnológica dos testes sorológicos que apresentam maior sensibilidade e especificidade com destaque a implantação e consolidação da técnica IQ.

Evidenciou-se, também, que o histórico da evolução da doença permite compreender a situação cultural e epidêmica do passado e projetar tendências. Os fenômenos sociais refletem diretamente no modo de vida da população e os contemporâneos como a globalização e a tecnologia, seguem paralelos com o desemprego, miséria e marginalização social. Como consequência, surgem as endemias com características semelhantes das do século XIX<sup>26</sup>. As políticas públicas, no passado, focavam as prostitutas e o público masculino

com campanhas específicas. Nos dias atuais essas políticas são ditadas pelo Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/Aids e das Hepatites Virais (DIAHV/SVS/MS) que avançam e ampliam o diagnóstico para gestantes, com o objetivo específico do controle da SG e SC. Assim, priorizam o gênero feminino devido sua maior vulnerabilidade e o nível de risco a que está exposto. Apesar dos esforços e da prioridade preconizada pelas políticas públicas de saúde, evidenciou o insucesso no propósito estabelecido de redução da ocorrência da SC. Paralelamente, houve expressivo aumento de casos de sífilis na população sexualmente ativa (homens, mulheres, encarcerados, usuários de droga e homossexuais). Esse grupo sexualmente ativo é de risco potencial de transmissão de sífilis para mulheres em idade reprodutiva. Além, de manifestações graves nos indivíduos acometidos e possibilidade da manifestação da fase terciária da doença. Os dados epidemiológicos corroboram a necessária ampliação dos objetivos do controle da SA com ênfase nessa população específica, para melhor controlar o aumento inevitável da transmissão. O estudo sugere a inserção de políticas públicas específicas para atenção ao grupo de pessoas em idade fértil. Assim, recomenda a inclusão do teste VDRL para o grupo sexualmente ativo em qualquer oportunidade de consulta, independente da especialidade, ampliando a assistência e priorizando o diagnóstico. Dessa forma dimensionará a real situação da doença e proporcionará a base das políticas públicas para o efetivo controle da sífilis.

## REFERÊNCIAS

1. Azulay RD. História da Sífilis. *An Bras Dermatol*. 1988;63(1):3-4.
2. Ujvari SC. A história da humanidade contada pelos vírus: Bactérias, Parasitas e Outros Microrganismos. São Paulo (SP): Editora Contexto; 2012.
3. Gribeler APD. A concepção social da sífilis no Brasil: uma releitura sobre o surgimento e a atualidade. [Trabalho de conclusão de Curso/Especialização em Saúde Pública]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2009. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/17934/000725339.pdf>
4. Rodrigues CS, Guimarães MDC e Grupo Nacional de Estudo sobre SC. Positividade para sífilis em puérperas: ainda um desafio para o Brasil. *Rev Panam Salud Publica*. 2004; 16(3):168-75. Disponível em <http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/8181/23086.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
5. Pinto VM, Tancredi MV, De Alencar HDR, Camolesi E, Holcman MM, Grecco JP et al. Prevalência de Sífilis e fatores associados a população em situação de rua de São Paulo, Brasil, com utilização de Teste Rápido. *Rev Bras Epidemiol*. 2014;341-54. <https://dx.doi.org/10.1590/1809-4503201400020005>
6. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites virais. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Atenção Integral as Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis. Brasília: Ministério da Saúde, 2015. [acesso 2018 mar 05]. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2015/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas-para-atencao-integral-pessoas-com-infecoes>
7. Araújo MAL, Silveira CB. Vivências de Mulheres com Diagnóstico de Doença Sexualmente Transmissível – DST. *Esc Anna Nery R Enferm*. 2007;11(3):479-86. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/ean/v11n3/v11n3a13.pdf>
8. Cavalcante AES, Silva MAM, Rodrigues ARM, Mourão Neto JJ, Moreira ACA, Goyanna NF. Diagnóstico e tratamento da sífilis: uma investigação com mulheres assistidas na Atenção Básica em Sobral, Ceará. *J Bras Doenças Sex Transm*. 2012;24(4):239-45. <https://doi.org/10.5533/DST-2177-8264-201224404>
9. Valderrama J, Zacarías F, Mazin R. Sífilis materna y sífilis congénita en América Latina: un problema grave de solución sencilla. *Rev Panam Salud Publica*. 2004;16(3):211-7. Disponível em: <https://www.scielosp.org/pdf/rpsp/2004.v16n3/211-217/es>
10. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Doenças Sexualmente transmissíveis, Aids e Hepatites Virais. Manual Técnico para Diagnóstico da Sífilis. Brasília: Ministério da Saúde; 2016.50p. [acesso 2018 mar 06]. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2016/manual-tecnico-para-diagnostico-da-sifilis>

11. Ministério da Saúde (BR). Gabinete do Ministro. Portaria nº 3.242, de 30 de dezembro de 2011. Dispõe sobre o Fluxograma Laboratorial da Sífilis e a utilização de testes rápidos para triagem da sífilis em situações especiais e apresenta outras recomendações. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 02 jan 2012. Seção1(1):50-2. [acesso 2018 dez 12]. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt3242\\_30\\_12\\_2011.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt3242_30_12_2011.html)
12. Ministério da Saúde (BR). Gabinete do Ministro. Portaria nº 2.012, de 19 de outubro de 2016. Aprova o Manual Técnico para o Diagnóstico da Sífilis e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 20 out 2016. Seção1(202):25-6. [acesso 2018 dez 13]. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/legislacao/portaria-no-2012-de-19-de-outubro-de-2016>
13. Ferreira LAP, Ramos FR, Assmann S. O encontro de Fracastoro com Descartes: reflexão sobre a temporalidade do método. *Texto Contexto Enferm*. 2010;19(1):168-75. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/tce/v19n1/v19n1a20.pdf>
14. Geraldino Neto B, Soler ZASG, Braile DM, Daher W. A sífilis no século XVI - o impacto de uma nova doença. *Arq Ciênc Saúde*. 2009;16(3):127-9. Disponível em: [http://repositorio-racs.famerp.br/racs\\_ol/vol-16-3/IDJ5.pdf](http://repositorio-racs.famerp.br/racs_ol/vol-16-3/IDJ5.pdf)
15. Quérel C. History of syphilis. Braddock J, Pike B. (tradutores). Baltimore (MD): Johns Hopkins University Press; 1990.
16. Cavalcante EDA. A sífilis em Cuiabá: saber médico, profilaxia e discurso moral -1870-1890.[dissertação de mestrado]. Cuiabá (MT). Universidade Federal de Mato Grosso; 2003. Disponível em: <https://docplayer.com.br/115719352-Else-dias-de-araujo-cavalcante-a-sifilis-em-cuiaba-saber-medico-profilaxia-e-discurso-moral-cuiaba.html>
17. Braga J. Luz sobre o mundo microscópico. 5.ed. São Paulo (SP):Editorial Duetto; 2008.
18. Carrara S. Tributo a vênus: a luta contra a sífilis no Brasil, da passagem do século aos anos 40. 20.ed. Rio de Janeiro (RJ): Editora FIOCRUZ;1996. 339p. Disponível em: <http://books.scielo.org/id/q6qbq/pdf/carrara-9788575412817.pdf>
19. Freyre G. Casa-Grande & senzala. 48.ed. São Paulo (SP):Global; 2003. Disponível em: [https://disciplinas.usp.br/pluginfile.php/229314/mod\\_resource/content/1/Gilberto%20Freyre%20-%20Casa-Grande%20e%20Senzala.pdf](https://disciplinas.usp.br/pluginfile.php/229314/mod_resource/content/1/Gilberto%20Freyre%20-%20Casa-Grande%20e%20Senzala.pdf)
20. Magalhães DMS, Kawaguchi IAL, Dias A, Calderon IMP. A sífilis na gestação e sua influência na morbimortalidade materno-infantil. *Com. Ciências Saúde*. 2011;22(Sup.1):543-54. Disponível em: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/artigos/sifilis\\_gestacao.pdf](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/artigos/sifilis_gestacao.pdf)
21. Souza EM. Há 100 anos, a descoberta do *Treponema pallidum*. *An Bras Dermatol*. 2005;80(5):547-8. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abd/v80n5/v80n5a17.pdf>
22. Rotta O. Diagnóstico sorológico da sífilis. *An Bras Dermatol*. 2005;80(3):299-302. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abd/v80n3/v80n3a14.pdf>
23. Carrara S. A geopolítica simbólica da sífilis: um ensaio de antropologia histórica. *Hist. Ciênc Saúde-Manguinhos*. 1996;3(3):391-408. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1590/S0104-59701996000300002>
24. Sutton MY, Liu H, Steiner B, Pillay A, Mickey T, Finelli L et al. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* in an Arizona County with increasing syphilis morbidity: use of specimens from ulcers and blood. *J. Infect. Dis*. 2001;183(11):1601-6. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1086/320698>
25. Pillay A, Liu H, Ebrahim S, Chen CY, Lai W, Fehler G, et al. Molecular typing of *Treponema pallidum* in South Africa: cross-sectional studies. *J Clin Microbiol*. 2002;40(1):256-8. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1128/jcm.40.1.256-258.2002>
26. Milanez H, Amaral E. Porque ainda não conseguimos controlar o problema da sífilis em gestantes e recém-nascidos? *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2008;30(7):325-7. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/rbgo/v30n7/a01v30n7.pdf>
27. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/Aids e das Hepatites Virais-DIAVH/SVS/MS. Boletim Epidemiológico - Sífilis; 2016;47(35):1-29. [acesso 2018 mar 07]. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2016/boletim-epidemiologico-de-sifilis-2016>

28. Lynn WA, Lightman S. Syphilis and HIV: a dangerous combination. *Lancet Infect Dis*. 2004;4(7):456-66. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(04\)01061-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(04)01061-8)
29. Ministério da Saúde (BR). Portaria nº 542 de 22 de dezembro de 1986. Inclui na relação constante da Portaria Ministerial 608/Bsb, de 28 de outubro de 1979, a síndrome de imunodeficiência adquirida SIDA/AIDS e a Sífilis Congênita, e os casos confirmados de AIDS e Sífilis Congênita deverão ser obrigatoriamente notificados às autoridades sanitárias. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 24 dez 1986. Seção 1(198):27. Disponível em: [http://www3.crt.saude.sp.gov.br/arquivos/arquivos\\_biblioteca\\_crt/Portarian542de22dez86.pdf](http://www3.crt.saude.sp.gov.br/arquivos/arquivos_biblioteca_crt/Portarian542de22dez86.pdf)
30. Organización Panamericana de La Salud - OPAS. Análisis de la situación al año 2010: eliminación de la transmisión materno-infantil del VIH y de la sífilis congénita en la Región de las Américas; 2012. [acesso 2018 mar 08]. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/49413>
31. Ministério da Saúde (BR). Portaria nº 33, de 14 de julho de 2005. Resolve incluir à Lista Nacional de Agravos de Notificação compulsória, os casos suspeitos ou confirmados de Doença de Creutzfeldt-Jacob; Sífilis em Gestantes; Síndrome Febril Ictero-hemorrágica Aguda; e Eventos Adversos Pós-Vacinação, conforme disposto no Anexo I desta Portaria. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 15 jul 2005. Seção 1(135):111. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs/2005/prt0033\\_14\\_07\\_2005.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs/2005/prt0033_14_07_2005.html)
32. Ministério da Saúde (BR). Portaria nº 2.472 de 31 de agosto de 2010. Define as terminologias adotadas em legislação nacional, conforme disposto no Regulamento Sanitário Internacional 2005 (RSI 2005), a relação de doenças, agravos e eventos em saúde pública de notificação compulsória em todo o território nacional e estabelecer fluxo, critérios, responsabilidades e atribuições aos profissionais e serviços de saúde. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 01 set 2010. Seção1(168):50-1. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2010/prt2472\\_31\\_08\\_2010.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2010/prt2472_31_08_2010.html)
33. Fundação Sistema Estadual de Análise de Dados - SEADE. Projeção populacional 2020 e 2050 - DRS XV. [acesso 2019 fev 04]. Disponível em: <http://produtos.seade.gov.br/produtos/projpop/index.php>
34. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. População estimada 2020 e 2050 - Brasil e Estado de São Paulo. [acesso 2019 fev 01]. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/sociais/populacao/9109-projecao-da-populacao.html?edicao=9116&t=resultados>
35. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/Aids e das Hepatites Virais - DIAHV/SVS/MS. *Boletim Epidemiológico - Sífilis*; 2017;48(36):1-4. [acesso 2018 abr 10]. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2017/boletim-epidemiologico-de-sifilis-2017>
36. Secretaria de Estado da Saúde (SP). Centro de Referência e Treinamento DST/Aids - CRT- ST/AIDS-SP. *Boletim Epidemiológico*. 2017;34(1):1-234. [acesso 2019 jan 07]. Disponível em: [http://www.saude.sp.gov.br/resources/crt/vig.epidemiologica/boletim-epidemiologico-crt/boletim\\_epidemiologico\\_2017.pdf?attach=true](http://www.saude.sp.gov.br/resources/crt/vig.epidemiologica/boletim-epidemiologico-crt/boletim_epidemiologico_2017.pdf?attach=true)
37. Tayra A, Matida LH, Saraceni V, Paz LC, Ramos Jr AN. Duas décadas de vigilância epidemiológica da sífilis congênita no Brasil: a propósito das definições de caso. *J Bras Doenças Sex Transm*. 2007;19(3-4):111-9. Disponível em: <http://www.dst.uff.br/revista19-3-2007/1.pdf>
38. Centers for Disease Control and Prevention - CDC. Surveillance for Geographic and Secular Trends in Congenital Syphilis - United States, 1983-1991. *MMWR Surveill Summ*. 1993;42 (SS6):59-71. Disponível em: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00031605.htm>
39. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais (DIAHV). *Boletim Epidemiológico*. 2018;49(45):1-41. [acesso 2018 abr 17]. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2018/boletim-epidemiologico-de-sifilis-2018>
40. Ministério da Saúde (BR). Nota Informativa nº 2-SEI/2017-DIAHV/SVS/MS. Departamento de

- Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis do HIV/Aids e Hepatites Virais (DIAHV). Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2017. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/legislacao/nota-informativa-no-02-sei2017-diahvsvsms>
41. Secretaria de Estado da Saúde (SP). Centro de Controle de Doenças. Centro de Referência e Treinamento DST/Aids - CRT- ST/AIDS-SP. Guia de bolso para o manejo da sífilis em gestantes e sífilis congênita. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde; 2016. 112p. [acesso 2018 dez 12]. Disponível em: [https://issuu.com/crtstaidssp/ctaidss/docs/guia\\_de\\_bolso\\_da\\_sifilis\\_-\\_2\\_\\_edi/53](https://issuu.com/crtstaidssp/ctaidss/docs/guia_de_bolso_da_sifilis_-_2__edi/53)
  42. Nonato SM, Melo APS, Guimarães MDC. Sífilis na gestação e fatores associados à sífilis congênita em Belo Horizonte-MG. 2010-2013. *Epidemiol Serv Saúde*. 2015;24(4):681-94. Disponível em: <http://scielo.iec.gov.br/pdf/ess/v24n4/v24n4a10.pdf>
  43. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Prevenção da transmissão Vertical de HIV, Sífilis e Hepatites Virais. Brasília: Ministério da Saúde; 2019. 248p. [acesso 2019 abr 24]. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2015/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas-para-prevencao-da-transmissao-vertical-de-hiv>
  44. Secretaria de Estado da Saúde (SP). Centro de Controle de Doenças. Centro de Referência e Treinamento DST/Aids - CRT - DST/Aids-SP. Guia de bolso para o manejo da sífilis em gestantes e sífilis congênita. São Paulo; 2014. 112p.
  45. Larsen SA, Steiner BM, Rudolph AH. Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. *Clin Microbiol Rev*. 1995;8(1):1-21. <http://doi.org/10.1128/CMR.8.1.1>
  46. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988;239(4839):487-91. <http://doi.org/10.1126/science.239.4839.487>
  47. Castro R, Prieto ES, Santo I, Azevedo J, Exposto F da L. Evaluation of an enzyme immunoassay technique for detection of antibodies against *Treponema pallidum*. *J Clin Microbiol*. 2003;41(1):250-3. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.1.250-253.2003>
  48. Organização Mundial da Saúde - OMS. Diagnóstico laboratorial de doenças sexualmente transmissíveis, incluindo o vírus da imunodeficiência humana. Veras NMC (tradutor). Brasília: Ministério da Saúde; 2015. [acesso 2018 jun 11]. Disponível em: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/85343/9789241505840\\_por.pdf;jsessionid=3\\_B88F247BB312DE16C603E287E5871C?sequence=7](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/85343/9789241505840_por.pdf;jsessionid=3_B88F247BB312DE16C603E287E5871C?sequence=7)
  49. Avelleira JCR, Bottino G. Sífilis: diagnóstico, tratamento e controle. *An Bras Dermatol*. 2006; 81(2):111-26. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0365-05962006000200002>
  50. Sáez-Alquézar A, Albieri D, Garrini RHC, Marques WP, Lemos EA, Alves A. Desempenho de testes sorológicos para sífilis, treponêmicos (ELISA) e não treponêmicos (VDRL e RPR), na triagem sorológica para doadores de sangue - confirmação dos resultados por meio de três testes treponêmicos (FTA ABS, WB e TPHA). *Rev Patol Trop*. 2007;36(3):215-28. <https://doi.org/10.5216/rpt.v36i3.3173>
  51. Pillay A, Liu H, Chen CY, Holloway B, Sturm AW, Steiner B et al. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum*. *Sex Transm Dis*. 1998;25(8):408-14. <https://doi.org/10.1097/00007435-199809000-00004>
  52. Tramont EC. Syphilis in the AIDS era. *N Engl J Med*. 1987;316(25):1600-1. <https://doi.org/10.1056/NEJM198706183162510>
  53. Araújo CL, Shimizu HE, Sousa AIA, Hamann EM. Incidência da sífilis congênita no Brasil e sua relação com a Estratégia Saúde da Família. *Rev Saude Publica*. 2012;46(3):479-86. <http://dx.doi.org/10.1590/s0034-89102012000300010>
  54. Goldim JR. O caso Tuskegee: quando a ciência se torna eticamente inadequada; 1999. [acesso em 15 de maio de 2018]. Disponível em: <https://www.ufrgs.br/bioetica/tueke2.htm>
  55. Galvão J. AIDS no Brasil: a agenda de construção de uma epidemia. Rio de Janeiro, São Paulo: ABIA, Editora 34; 2000. 256p.

56. Ministério da Saúde (BR). Portaria nº 569/GM, de 1º de junho de 2000. Institui o Programa de Humanização no PN e Nascimento. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 08 jun 2000 (republicação). Seção 1(110-E):4-6. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2000/prt0569\\_01\\_06\\_2000\\_rep.html](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2000/prt0569_01_06_2000_rep.html)
57. Ministério da Saúde (BR). Portaria nº 766/GM, de 21 de dezembro de 2004. Resolve expandir, para todos os estabelecimentos hospitalares integrantes do Sistema Único de Saúde, a realização do exame de VDRL para todas as parturientes internadas e inclui o teste rápido para o HIV na tabela SIA/SIH. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 22 dez 2004. Seção 1 (245):71. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2004/prt0766\\_21\\_12\\_2004.html](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2004/prt0766_21_12_2004.html)
58. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Boletim Epidemiológico - Sífilis; 2015;4(1):1-28. [acesso 2018 jul 09]. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/node/88>
59. Ministério da Saúde (BR). Portaria nº 204, de 17 de fevereiro de 2016. Define a Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional, nos termos do anexo, e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 18 fev 2016. Seção1(32):23-4. Disponível em: [http://www.in.gov.br/materia/-/asset\\_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/22311994](http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/22311994)
60. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Política nacional de atenção integral à saúde da mulher: princípios e diretrizes. Brasília: Ministério da Saúde; 2004. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica\\_nac\\_atencao\\_mulher.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nac_atencao_mulher.pdf)
61. Secretaria de Estado da Saúde (SP). Portaria CCD-25 de 18 de julho de 2011. Dispõe sobre as recomendações a serem utilizados em testes laboratoriais para o diagnóstico da sífilis revogando a Portaria CCD de 24/09/2010. Diário Oficial do Estado de São Paulo, São Paulo, SP, 30 jul 2011. Seção1, 121(143):42. Disponível em: [http://www.saude.sp.gov.br/resources/crt/testes-rapidos/c-material-de-apoio-para-capacitacoes/legislacao/sifilis/sifilisdagnostico\\_180711.pdf](http://www.saude.sp.gov.br/resources/crt/testes-rapidos/c-material-de-apoio-para-capacitacoes/legislacao/sifilis/sifilisdagnostico_180711.pdf)
62. Secretaria de Estado da Saúde (SP). Decreto nº 51.433, de 28 de dezembro de 2006. Cria unidade na Coordenadoria de Regiões de Saúde, da Secretaria da Saúde, altera a denominação e dispõe sobre a reorganização das Direções Regionais de Saúde. Diário Oficial do Estado de São Paulo, São Paulo, SP, 29 dez 2006. Seção1, 116(246):1. [acesso 2019 jan 02]. Disponível em: <https://governo-sp.jusbrasil.com.br/legislacao/93006/decreto-51433-06>
63. Sandes, VS. Análise de nova metodologia na triagem sorológica para sífilis em doadores de sangue. [dissertação de mestrado]. Niterói (RJ). Universidade Federal Fluminense; 2016. Disponível em: <https://app.uff.br/riuff/bitstream/1/3050/1/Sandes%2C%20Valcieny%20de%20Souza%20%5BDisserta%C3%A7%C3%A3o%2C%202015%5D.pdf>



# Ocorrência de triatomíneos no Estado do Ceará, Brasil

## Occurrence of triatomines in the state of Ceará, Brazil

RIALA6/1795

Léia Madeira Sabóia dos REIS<sup>1\*</sup>, Darwin Renne Florencio CARDOSO<sup>1</sup>, Jéssica Pereira dos SANTOS<sup>1</sup>, Elaine Ferreira do NASCIMENTO<sup>2</sup>, Clarissa Romero TEIXEIRA<sup>3</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Magalhães Filho, 519, Centro (Norte), Teresina, PI, Brasil, CEP: 64001-350. Tel: 86 3326 2101. E-mail: [leiamadeirasaboiareis@gmail.com](mailto:leiamadeirasaboiareis@gmail.com)

<sup>2</sup>Escritório Regional da Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz, Piauí

<sup>3</sup>Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz, Ceará

Recebido: 20.01.2020 - Aceito para publicação: 26.11.2020

### RESUMO

Esta revisão integrativa tem como objetivo analisar as publicações científicas nos últimos doze anos sobre triatomíneos encontrados no Estado do Ceará. Para tal, nos bancos de dados da Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) foi realizada uma busca com associação dos descritores “Doença de Chagas”, “Triatomíneos” e “Brasil”. Após aplicação dos critérios de inclusão, exclusão e da análise dos seus conteúdos, oito artigos realizados no Estado do Ceará foram selecionados para a análise do estudo. Algumas espécies de triatomíneos encontradas no Nordeste são de extrema importância epidemiológica para o homem, pois estão associadas com domicílios humanos. As espécies mais predominantes com maior importância epidemiológica, com distribuição ampla no Ceará e presente no ambiente peridoméstico foram: *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma pseudomaculata*, *Panstrongylus megistus*, *Panstrongylus lutzi* e *Rhodnius nasutus*. Várias espécies de triatomíneos tem a capacidade de transmitir *Trypanosoma cruzi* e de se adaptar com o ambiente peridoméstico e doméstico tornando o homem mais suscetível a infecção, sendo assim necessário estratégias de vigilância e controle do vetor.

**Palavras-chave.** doença de Chagas, triatominae, *Trypanosoma cruzi*, saúde pública.

### ABSTRACT

This integrative review aims to analyze the scientific publications in the last twelve years on triatomines found at Ceará State. For this, a search was performed in the Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) databases with association of the descriptors “Chagas Disease”, “Triatomines” and “Brazil”. After applying the inclusion, exclusion criteria and analysis of their content, eight articles were selected for the analysis and discussion. Some species of triatomines found in the Northeast region are of extreme epidemiological importance since they are associated with human households. The most prevalent species with epidemiological importance due to their large distribution in Ceará and presence in the peridomestic environment are: *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma pseudomaculata*, *Panstrongylus megistus*, *Panstrongylus lutzi* and *Rhodnius nasutus*. Several species of triatomines have the capacity to transmit *T. cruzi* and the ability to adapt to the peridomestic and domestic environment turning humans more susceptible to infection, thus requiring surveillance and vector control strategies.

**Keywords.** Chagas disease, triatominae, *Trypanosoma cruzi*, public health.

## INTRODUÇÃO

*Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da Doença de Chagas transmitido por insetos vetores hematófagos da subfamília *Triatominae* (Hemiptera: Reduviidae)<sup>1</sup>. Estes insetos podem ser encontrados nos ambientes silvestre, peridoméstico e doméstico, assim ocorrendo a transmissão por *T. cruzi* nos diversos tipos de ambientes, em que o homem e os animais de convívio doméstico ou silvestres passam a integrar o ciclo de transmissão<sup>2</sup>.

A Doença de Chagas é endêmica no nordeste brasileiro, tornando-se a área de maior importância do país, e nele se encontra uma vasta quantidade de espécies de vetores para *T. cruzi*, com grande importância para a saúde pública<sup>3</sup>. Algumas espécies de triatomíneos são nativas do bioma da Caatinga, das zonas semiáridas e principais responsáveis pela transmissão da Doença de Chagas no Estado do Ceará<sup>3,4</sup>.

Alguns fatores influenciam a dispersão dos triatomíneos do habitat silvestre para o ambiente peridomiciliar e domiciliar, e exemplo disso são fontes de alimento, tipos de vegetação, luz e abrigos, principalmente aqueles compostos por madeiras<sup>5,6</sup>. A procura por fonte de alimento é um dos principais fatores que facilita a dispersão desses vetores para os ecótopos artificiais, assim também, como a eliminação total ou parcial do habitat natural dos mesmos, levando ao deslocamento para o ambiente doméstico<sup>7</sup>.

Portanto, é necessário a vigilância constante dessas áreas que tem a possibilidade de abrigar vetores transmissores da Doença de Chagas, com implantação de medidas de controle eficazes que visem combater o vetor, além de educar os residentes dessas áreas endêmicas sobre como combater os vetores e o risco da doença.

## MATERIAL E MÉTODOS

A revisão integrativa da literatura foi o método escolhido para a execução deste estudo. Utilizamos artigos científicos relacionados à temática publicados e disponíveis na Biblioteca Virtual em Saúde - BVS.

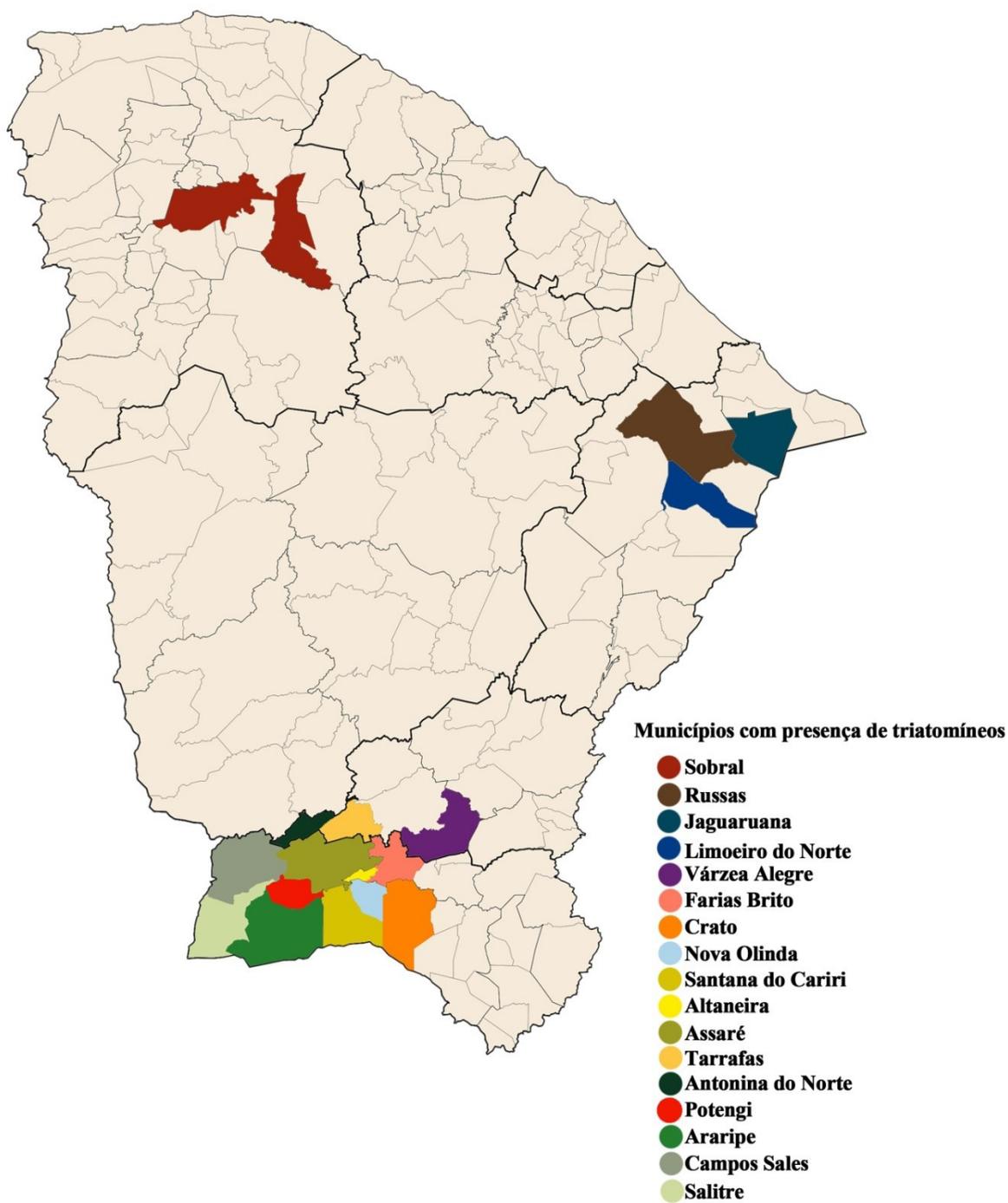
Para a triagem dos artigos a serem analisados, realizamos uma busca no portal da BVS a partir dos seguintes descritores disponíveis em saúde “Doença de Chagas”, “triatomíneos” e “Brasil”, e também com

o operador booleano AND entre cada descritor, em que obtivemos um total de 413, dos quais destes 346 eram artigos científicos. Em seguida, aplicamos os critérios de inclusão e exclusão, em que os critérios de inclusão adotados foram: artigos publicados e indexados entre os anos de 2007 e 2019 nas principais bases de dados da BVS (LILACS, MEDLINE, BDENF - Enfermagem, Secretaria Estadual de Saúde de São Paulo e Coleção SUS); nas línguas portuguesa e inglesa; no qual os assuntos principais foram: Doença de Chagas, *Triatominae*, insetos vetores, *Trypanosoma cruzi*, *Triatoma*, habitação, controle de insetos, controle de vetores, ecossistema, entomologia, árvores, vetores de doenças, reservatório de doenças, comportamento alimentar, *Trypanosoma*, *Rhodnius*, *Panstrongylus*, doença endêmica e parasitemia; estudos realizados no nordeste brasileiro. E os critérios de exclusão foram: documentos com formatos diferentes (tese, documento de projetos, anais de eventos científicos), artigos publicados fora do período indicado acima e estudos realizados fora da região Nordeste. Assim, obtivemos um total de dezenove artigos com estudos realizados no nordeste brasileiro, dos quais, oito foram realizados no Estado do Ceará e foram incluídos nesta revisão.

Posteriormente, utilizamos um roteiro de coleta de dados, criado pelos autores do estudo, visando obter informações de identificação do periódico, objetivos, material e métodos, principais resultados e conclusão. Após esta etapa, realizamos uma análise crítica dos artigos, através da utilização da metodologia qualitativa para se obter as ideias centrais dos artigos e, assim, copilar em eixos temáticos e, posteriormente, realizar as discussões.

## RESULTADOS

Nesta revisão integrativa identificamos dezoito artigos obtidos após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão. Destes, oito foram realizados no Estado do Ceará e foram os artigos incluídos nesta revisão. Os trabalhos foram realizados nos municípios cearenses de: Altaneira, Antonina do Norte, Araripe, Assaré, Campo Sales, Crato, Farias Brito, Jaguaruana, Limoeiro do Norte, Nova Olinda, Potengi, Russas, Salitre, Santana do Cariri, Sobral, Tarrafas e Várzea Alegre (**Figura**).



**Figura.** Municípios cearenses com a detecção de diferentes espécies de triatomíneos, segundo os artigos publicados no período de 2007 a 2019

**Quadro.** Estudos selecionados para a amostra contendo o ano de publicação, autor, objetivo, principais resultados e conclusão

|                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>2007<br/>Freitas et al<sup>8</sup>.</p>     | <p><b>Objetivo:</b> Descrever a situação entomológica do Programa de Controle da Doença de Chagas Humana no município de Farias Brito, Estado do Ceará, no período de 2001-2002.<br/><b>Resultados:</b> Das cinco espécies vetoras autóctones, <i>T. brasiliensis</i>, <i>T. pseudomaculata</i>, <i>P. megistus</i>, <i>P. lutzi</i> e <i>R. nasutus</i> encontradas, as espécies <i>T. brasiliensis</i> e <i>T. pseudomaculata</i> vem mantendo altos níveis de infestação e de colonização tanto no domicílio quanto no peridomicílio no município. <i>T. pseudomaculata</i> foi a espécie com o maior número de capturas. A taxa de infecção natural por <i>T. cruzi</i> foi detectada em apenas três espécimes de <i>T. pseudomaculata</i> capturadas no peridomicílio.<br/><b>Conclusão:</b> Um trabalho de vigilância epidemiológica e controle de caráter contínuo se faz necessário principalmente no que diz respeito às duas espécies (<i>T. pseudomaculata</i> e o <i>T. brasiliensis</i>) nativas, que têm o potencial invasivo e de difícil controle. Torna-se importante para as autoridades sanitárias do município manter a continuidade do Programa de Controle de Doença de Chagas.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <p>2009<br/>Gonçalves et al<sup>3</sup>.</p>   | <p><b>Objetivo:</b> Analisar as taxas de infestação da habitação e a distribuição e as taxas naturais de infecção pelo <i>T. cruzi</i>, entre triatomíneos capturados nos 13 municípios do estado do Ceará.<br/><b>Resultados:</b> Entre os triatomíneos capturados nos municípios estudados, <i>T. brasiliensis</i> apresentou a maior incidência de intradomicílio e <i>T. pseudomaculata</i> no peridomicílio e alguns foram positivos para a infecção por <i>T. cruzi</i>.<br/><b>Conclusão:</b> Enfatizou-se que é importante ter uma vigilância epidemiológica sustentável na região, uma vez que, quando as medidas de controle diminuíram, a incidência de <i>T. pseudomaculata</i> capturados no intradomicílio cresceu.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| <p>2013<br/>Vasconcelos et al<sup>9</sup>.</p> | <p><b>Objetivo:</b> Avaliar o índice de infecção dos triatomíneos por <i>T. cruzi</i>, a infestação nas unidades domiciliares por ninfas e adultos e identificar as localidades com maior índice de infestação e infecção.<br/><b>Resultados:</b> Durante os quatro anos de estudo foram capturados 2.863 exemplares de triatomíneos, ninfas e adultos distribuídos no intradomicílio e peridomicílio. O <i>T. pseudomaculata</i> foi a espécie mais capturada (60,2%). Foram e examinados 2.756 (96,3 %) exemplares. O índice de infecção dos triatomíneos foi de 7,9 % nos quatro anos de estudo. <i>R. nasutus</i> foi a espécie como maior índice de infecção (19,4%). O número de ninfas capturadas foi cerca de três vezes maior que o número de adultos; no entanto, o número de ninfas infectadas (5,30 %) foi inferior aos adultos (15,85 %).<br/><b>Conclusão:</b> O distrito de Limoeiro do Norte apresenta alto risco de transmissão para doença de Chagas, portanto, sugere-se que as ações de controle sejam intensificadas neste município para evitar a ocorrência de transmissão da doença e dispersão do vetor.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| <p>2014<br/>Coutinho et al<sup>6</sup>.</p>    | <p><b>Objetivo:</b> Investigar a infestação de triatomíneos em áreas peridomiciliares e intradomiciliares e a infecção da doença de Chagas entre os moradores em uma localidade rural de uma área afetada pela ação humana no Vale do Jaguaribe, Estado do Ceará.<br/><b>Resultados:</b> Os triatomíneos foram pesquisados nos domicílios, nos períodos de seca e de chuva, com predomínio das capturas no peridomicílio. Um total de 658 (86,5%) triatomíneos foram encontrados nas proximidades das residências. Um total de 761 triatomíneos foram capturados em colônias compostas de ninfas e insetos adultos: <i>T. brasiliensis</i> (77.1%); <i>T. pseudomaculata</i> (19.8%); <i>P. megistus</i> (2.9%) e <i>Rhodnius nasutus</i> (0.1%). Foi detectada uma predominância de <i>T. brasiliensis</i>, especialmente no período de seca. A avaliação da presença de <i>T. cruzi</i> nos triatomíneos capturados revelou 28,6% de positividade. O acúmulo de madeira no peridomicílio foi o principal fator associado a alta taxa de infestação na região.<br/><b>Conclusão:</b> Os resultados sugerem que os abrigos de animais e armazenamento inadequado de materiais no peridomicílio, particularmente amontoados de madeiras, bem como moradias desabitadas, contribuem para o alto índice de infestação de triatomíneos na localidade.</p>                                                                                                                                                                                    |
| <p>2015<br/>Lima et al<sup>10</sup>.</p>       | <p><b>Objetivo:</b> Descrever a prevalência de doença de Chagas em dois cenários distintos de transição sociodemográfica no município de Jaguaruana, Ceará. Foram avaliadas duas novas localidades de trabalhadores sem-terra que vivem em casas pré-fabricadas, enquanto a outra é composta por quatro comunidades antigas estabelecidas com a tradicional casa de pau a pique.<br/><b>Resultado:</b> Foram pesquisadas 148 casas/famílias nos dois novos assentamentos e 47 casas/famílias nas quatro localidades mais antigas. A soroprevalência atingiu 0,6% (3/466) nos novos assentamentos e 0,8% (1/115) em comunidades mais velhas. Os triatomíneos não foram encontrados nos novos assentamentos, enquanto <i>T. brasiliensis</i> (7), <i>T. pseudomaculata</i> (4), <i>P. lutzi</i> (1) e <i>R. Nasutus</i> (145) foram coletados nas localidades mais antigas. Além disso, uma colônia de <i>T. brasiliensis</i> (55) foi encontrada dentro de uma escola frequentada por crianças da região. As cepas de parasitas isoladas dos insetos foram caracterizadas com <i>T. cruzi</i> I.<br/><b>Conclusão:</b> Apesar da baixa prevalência da doença de Chagas em ambos os cenários, sugerindo a interrupção da transmissão, a vigilância entomológica deve ser fortalecida e a melhoria da habitação reforçada para controlar a transmissão do parasita. O risco de infecção pelos vetores foi menor nos assentamentos de casas melhoradas, onde as condições de colonização do ambiente peridoméstico não foram observadas.</p> |

Continua na página 5/7

Continuação

|                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>2015<br/>Valença-Barbosa et al<sup>11</sup>.</p> | <p><b>Objetivo:</b> Utilizar os conteúdos intestinais de triatomíneos coletados em áreas rurais do Estado do Ceará, para identificar seus hospedeiros putativos via sequenciamento do gene <i>cytb</i> de vertebrados.<br/><b>Resultados:</b> Sequenciamento direto foi obtido para 48% dos insetos, compreendendo <i>T. brasiliensis</i> (50), <i>T. pseudomaculata</i> (7) e <i>R. nasutus</i> (1). O procedimento básico de pesquisa de alinhamento local (BLAST) revelou que os animais domésticos, como galinhas (<i>Gallus gallus</i>) e cabras (<i>Capra hircus</i>), são a principal fonte de alimento, inclusive no ambiente silvestre. Os hospedeiros nativos também foram detectados em triatomíneos capturados em ambientes domésticos, como os répteis <i>Tropidurus</i> sp. e <i>Iguana iguana</i> e o <i>Galea spixii</i> (<i>Rodentia: Caviidae</i>).<br/><b>Conclusão:</b> O papel das cabras e da <i>Galea spixii</i> na epidemiologia da doença de Chagas requer novos estudos, pois esses mamíferos provavelmente associam os ciclos silvestres e domésticos do <i>T. cruzi</i>.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| <p>2017<br/>Parente et al<sup>12</sup>.</p>         | <p><b>Objetivo:</b> Explorar o risco potencial de doença de Chagas transmitida por vetores em bairros urbanos no município de Sobral, Ceará, analisando as distribuições espaço-temporais e taxas de infecção com <i>T. cruzi</i> de espécies de triatomíneos capturadas no período de 2010 a 2014.<br/><b>Resultados:</b> O total de 191 triatomíneos foi coletado, constituído por 82,2% de <i>T. pseudomaculata</i>, 7,9% de <i>R. nasutus</i>, 5,8% de <i>T. brasiliensis</i>, 3,7% de <i>P. lutzi</i> e 0,5% de <i>P. megistus</i>, com índice de infecção natural geral de 17,8%. A maioria das infestações foi relatada nos bairros Dom José (36,2%), Padre Palhano (24,7%) e Alto do Cristo (10,6%). A maioria de insetos (185/96,9%) foram capturados dentro das casas coletada em picos intermitentes. Além disso, os triatomíneos capturados tendem a constituir colônias. O caso agudo relatado em 2008 foi encontrado dentro de um <i>hotspot</i> de <i>T. pseudomaculata</i>. Cerca de um quinto dos espécimes de <i>T. pseudomaculata</i> capturadas estavam infectadas.<br/><b>Conclusão:</b> Os resultados sugerem que os triatomíneos são introduzidos artificialmente e de forma intermitente para a zona urbana, possivelmente por migração acidental de seus reservatórios naturais caracterizando a área urbana de Sobral como de alto risco de transmissão da doença de Chagas. A taxa de infecção de <i>T. cruzi</i> relativamente alta indica uma circulação considerável do parasita nessas áreas, aumentando o risco de infecção. Esses dados sugerem a necessidade de fortalecer a vigilância epidemiológica e integrar ações de controle adequadas visando triatomíneos, reservatórios de <i>T. cruzi</i> e populações humanas.</p> |
| <p>2019<br/>Bernardo-Pedro et al<sup>13</sup>.</p>  | <p><b>Objetivos:</b> Determinar a distribuição espaço-temporal das taxas de dispersão de triatomíneos na região do Cariri, Sul do Ceará e verificar a possível associação dessas taxas com fatores socioeconômicos e ambientais.<br/><b>Resultados:</b> As taxas de dispersão (número de localidades positivas/número de localidades pesquisadas × 100) foram analisadas em 13 municípios do Estado do Ceará, no período de 2009 a 2013. Variáveis socioeconômicas e ambientais coletadas de institutos de pesquisa nacionais foram associadas às taxas de dispersão e suas estimativas empíricas Bayesianas locais. Todos os municípios registraram taxas de dispersão superiores a 10% em todos os anos, e 11 municípios apresentaram taxas médias superiores a 40% no período de estudo. Diferenças significativas foram observadas entre as médias do município. As maiores taxas foram observadas em Antonina do Norte e Potengi. De acordo com a análise de correlação, a proporção entre a população ocupada e a população total apresentou correlação negativa significativa, assim como o percentual da população que vive em condições sanitárias adequadas. Ambos, o percentual de receitas de fontes externas e o percentual de domicílios urbanos em blocos reflorestados tiveram uma correlação positiva significativa.<br/><b>Conclusão:</b> Os resultados mostram que variáveis socioeconômicas e ambientais podem ser fatores que contribuem tanto para a manutenção quanto para a redução das elevadas taxas de dispersão observadas na área de estudo. Pesquisas semelhantes, que englobem mais municípios daquela região, podem reforçar a vigilância e o controle da doença de Chagas no Nordeste do Brasil.</p>                            |

O **Quadro** mostra um resumo sinóptico dos estudos selecionados para a amostra contendo o ano de publicação, autor, objetivo, principais resultados e conclusão.

## DISCUSSÃO

Algumas espécies de triatomíneos são de extrema importância epidemiológica para o homem, pois estão associados com domicílios humanos. Mais de vinte e sete espécies ou subespécies de triatomíneos

transmissores de *T. cruzi* já foram descritas no nordeste brasileiro, sendo as espécies mais predominantes, no bioma da Caatinga são: *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma pseudomaculata*, *Triatoma sordida*, *Panstrogylyus megistus*, *Panstrogylyus lutzi* e *Rhodnius nasutus*<sup>3,4,6,8,14</sup>. A grande diversidade de espécies na região se explica devido às particularidades que cada bioma possui, assim também, como a invasão do homem no ambiente silvestre para exploração e urbanização. Neste caso, as espécies vão se adaptando as modificações e passam a integrar o ambiente peridoméstico e doméstico<sup>8</sup>.

No entanto, é importante lembrar que existe uma dinâmica destes vetores na natureza que pode ser alterada por fatores ambientais ou resultantes da ação humana que podem influenciar na presença e dispersão de algumas espécies de triatomíneos no ambiente.

No Estado do Ceará, espécies nativas como *Triatoma brasiliensis* e *Triatoma pseudomaculata* apresentam grande distribuição e uma importância na circulação do *T. cruzi* nesta região. *T. brasiliensis* é uma espécie que habita abrigos rochosos, ecossistemas xerófitos, exemplo da caatinga, em associação com mamíferos e répteis e no ambiente peridoméstico. Foi encontrado em todos os Estados do Nordeste brasileiro, sendo conceituado o vetor mais importante desta região devido a sua capacidade de invadir e colonizar ambientes domésticos, contribuindo com o ciclo doméstico de transmissão da Doença de Chagas<sup>1,10</sup>.

*T. pseudomaculata* é encontrado em árvores, como catingueira (*Caessalpinia pyramidalis*), jurema preta (*Mimosa hostilis*) e dentre outras árvores presentes na caatinga em associação a aves, e o mesmo também possui uma ampla distribuição no Estado, mas este pode ser encontrado tanto no ambiente peridomiciliar e intradomiciliar<sup>4,5,15</sup>. Estudos recentes evidenciaram que este se adaptou, satisfatoriamente, aos ambientes artificiais, neste caso, ambientes peridoméstico e doméstico. É comum no Nordeste, assim quanto no Estado do Ceará, alguns tipos de edificações possuem currais, galinheiros, pocilgas, viveiros ou aglomerados de madeira, tijolos e telhas e casas de pau-a-pique, que favorecem a colonização por triatomíneos. Tem sido demonstrado que esta espécie é constantemente infectada por *T. cruzi* e a migração desta espécie para o ambiente doméstico<sup>7</sup>.

Os triatomíneos se transferem do habitat natural para o habitat artificial em busca de alimentos, estes vindo a se adequar ao ambiente propício para alimentação, moradia e reprodução<sup>5</sup>. *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata* tem como suprimento alimentar os animais domésticos (galinhas e mamíferos) que vivem no ambiente peridomiciliar e domiciliar<sup>5,6</sup>. Os estudos que avaliam a prevalência de triatomíneos de importância epidemiológica em áreas endêmicas são de grande importância sendo necessário também a investigação do papel destes vetores na manutenção da transmissão da Doença de Chagas nas regiões.

O controle vetorial tem sido realizado através do uso de inseticidas a base de piretroides, embora

muitas vezes não se tenha sucesso absoluto, além do melhoramento das condições de moradia que tem contribuído para a interrupção da transmissão da Doença de Chagas em muitas regiões<sup>10</sup>. Após um período de redução dos casos ocorreu a mudança para uma fase de monitoramento, onde a vigilância entomológica é essencial. Os artigos aqui analisados enfatizaram a vulnerabilidade da população a Doença de Chagas em determinadas regiões do Ceará que ocorre como consequência da interação entre mudanças sociodemográficas e fatores ecológicos caracterizados pela circulação natural de parasitas, vetores e reservatórios.

## CONCLUSÃO

O Estado do Ceará apresenta características essenciais para a colonização de triatomíneos tanto no intradomicílio quanto no peridomicílio, como: ambientes rochosos que servem de abrigos, vegetação xerófito e ambientes de criações de animais que facilitam a alimentação, reforçando a necessidade da continuidade das estratégias de vigilância e controle do vetor. Vários estudos avaliados nesta revisão demonstraram que as espécies de triatomíneos encontradas na região possuem capacidade de adaptação a novos ambientes na busca de abrigo e fonte alimentar e, assim, passam a ficar mais próximos ao homem (domicílio e peridomicílio) aumentando o risco de infecção. Estudos que caracterizem os fatores ambientais associados a infestação e infecção de triatomíneos em áreas com maior vulnerabilidade e a confirmação do papel destas espécies na transmissão local são necessários para o controle efetivo da Doença de Chagas no Estado do Ceará.

## REFERÊNCIAS

1. Sarquis O, Carvalho-Costa FA, Oliveira LS, Duarte R, D'Andrea PS, De Oliveira TG et al. Ecology of *Triatoma brasiliensis* in northeastern Brazil: Seasonal distribution, feeding resources, and *Trypanosoma cruzi* infection in a sylvatic population. *J Vector Ecol*. 2010;35(2):385-94. <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2010.00097.x>
2. Araújo CAC, Waniek PJ, Xavier SCC, Jansen AM. Genotype variation of *Trypanosoma cruzi* isolates

- from different Brazilian biomes. *Exp Parasitol*. 2011;127(1):308-12. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.07.013>
3. Gonçalves TCM, Freitas ALC, Freitas SPC. Surveillance of Chagas disease vectors in municipalities of the state of Ceará, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(8):1159-64. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000800013>
  4. Sarquis O, Carvalho-Costa FA, Toma HK, Georg I, Burgoa MR, Lima MM. Eco-epidemiology of Chagas disease in northeastern Brazil: *Triatoma brasiliensis*, *T. pseudomaculata* and *Rhodnius nasutus* in the sylvatic, peridomestic and domestic environments. *Parasitol Res*. 2012;110(4):1481-5. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2651-6>
  5. Carbajal de la Fuente AL, Minoli SA, Lopes CM, Noireau F, Lazzari CR, Lorenzo MG. Flight dispersal of the Chagas disease vectors *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* in northeastern Brazil. *Acta Trop*. 2007;101(2):115-9. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2006.12.007>
  6. Coutinho CF de S, Souza-Santos R, Teixeira NFD, Georg I, Gomes TF, Boia MN et al. An entomoepidemiological investigation of Chagas disease in the state of Ceará, Northeast Region of Brazil. *Cad Saude Publica*. 2014;30(4):785-93. <https://dx.doi.org/10.1590/0102-311X00176512>
  7. Lima AFR, Jeraldo V LS, Silveira MS, Madi RR, Santana TBK, Melo CM. Triatomines in dwellings and outbuildings in an endemic area of Chagas disease in northeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2012;45(6):701-6. <https://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822012000600009>
  8. Freitas ALC, Freitas SPC, Gonçalves TCM, Lima Neto AS. Vigilância Entomológica dos Vetores da Doença de Chagas no Município de Farias Brito, estado do Ceará. *Cad Saúde Colet*. 2007;15(2):231-40. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-520086>
  9. Vasconcelos ASOB, Freitas EC, Andrade MC, Lima MM, Pereira LS, Gomes KCMS et al. Doença de Chagas: situação vetorial no município de Limoeiro do Norte CE, no período de 2006 a 2009. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2013;72(4):295-301. Disponível em: [http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/10/rial72\\_4\\_completa/arquivos-separados/1577.pdf](http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/10/rial72_4_completa/arquivos-separados/1577.pdf)
  10. Lima MM, Carvalho-Costa FA, Toma HK, Borges-Pereira J, de Oliveira TG, Sarquis O. Chagas disease and housing improvement in northeastern Brazil: a cross-sectional survey. *Parasitol Res*. 2015;114(5):1687-92. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4350-1>
  11. Valença-Barbosa C, Fernandes FA, Santos HLC, Sarquis O, Harry M, Almeida CE et al. Molecular identification of food sources in triatomines in the Brazilian northeast: roles of goats and rodents in Chagas disease epidemiology. *Am J Trop Med Hyg*. 2015;93(5):994-7. <https://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.15-0156>
  12. Parente CC, Bezerra FSM, Parente PI, Dias-Neto RV, Xavier SCC, Ramos AN et al. Community-based entomological surveillance reveals urban foci of Chagas disease vectors in Sobral, State of Ceará, Northeastern Brazil. *PLoS One*. 2017;12(1):e0170278. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0170278>
  13. Bernardo-Pedro T, Sousa DM, Freitas SPC, Freitas ALC, Santos-Mallet JR, Tassinari W S. Triatomine dispersion rates and their association with socioeconomic and environmental conditions in Northeastern Brazil, from 2009 to 2013. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2019;61:e47. <https://dx.doi.org/10.1590/s1678-9946201961047>
  14. Silva MBA, Barreto AVMS, Silva HA da, Galvão C, Rocha D, Jurberg J et al. Synanthropic triatomines (Hemiptera, Reduviidae) in the state of Pernambuco, Brazil: geographical distribution and natural *Trypanosoma* infection rates between 2006 and 2007. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2012;45(1):60-5. <https://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822012000100012>
  15. Sarquis O, Borges-Pereira J, Mac Cord JR, Gomes TF, Cabello PH, Lima MM. Epidemiology of Chagas disease in Jaguaruana, Ceará, Brazil. I. Presence of triatomines and index of *Trypanosoma cruzi* infection in four localities of a rural area. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004;99(3):263-70. <https://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762004000300004>



# Perfil bioquímico de pacientes diabéticos de um laboratório privado da região sul do Brasil

## Biochemical profile of diabetic patients in a private laboratory in southern Brazil

RIALA6/1782

Miriã Ferrão Maciel FIUZA<sup>1</sup>, Natielen Jacques SCHUCH<sup>2</sup>, Ana Cláudia Cirne BERNDT<sup>3</sup>, Clandio Timm MARQUES<sup>4</sup>, Luciana Maria Fontanari KRAUSE<sup>5</sup>\*

\*Endereço para correspondência: <sup>5</sup>Universidade Franciscana. Rua dos Andradas, 1614, Santa Maria, RS, Brasil, CEP: 97010-032. Tel: 55 3220 1200. E-mail: lfontanari@yahoo.com.br

<sup>1</sup>Laboratório de Biociências, Curso de Biomedicina, Universidade Franciscana, Santa Maria, RS, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Biociências, Curso de Nutrição e Mestrado em Ciências da Saúde e da Vida, Universidade Franciscana, Santa Maria, RS, Brasil

<sup>3</sup>Laboratório de Análises Clínicas Pasteur

<sup>4</sup>Área Tecnológica, Curso de Matemática e Programa de Pós-Graduação em Ensino de Ciências e Matemática, Universidade Franciscana, Santa Maria, RS, Brasil

<sup>5</sup>Laboratório de Biociências, Curso de Biomedicina e Mestrado em Ciências da Saúde e da Vida, Universidade Franciscana, Santa Maria, RS, Brasil

Recebido: 14.06.2019 - Aceito para publicação: 02.01.2020

### RESUMO

O diabetes é uma doença crônica decorrente de hiperglicemia permanente. A hemoglobina glicada (HbA1c) resulta da ligação não enzimática entre a hemoglobina e a glicose. A dosagem da mesma é o principal determinante para avaliação do controle glicêmico em pacientes diabéticos. Este estudo objetivou correlacionar idade, perfil glicêmico e lipídico em uma amostra de prontuários de portadores de Diabetes Mellito (DM), em um laboratório privado da região sul do Brasil. Foram analisados 776 prontuários no período entre janeiro a março de 2018, sendo que os prontuários foram obtidos a partir de registros dos meses entre março de 2016 a março de 2018. Analisamos HbA1c, glicose, triglicerídeos, colesterol total, LDL-colesterol e HDL-colesterol. Nossos resultados mostram predominância de mulheres idosas (61%), não havendo variação de idade entre os gêneros, em ambos foi possível observar correlação negativa e significativa entre idade e LDL-C. Não houve clara associação entre HbA1c e perfil lipídico na amostra estudada. Os resultados demonstraram aumento nos níveis de HbA1c e redução no colesterol total e LDL-C nos pacientes acima de 60 anos. Encontramos uma forte correlação positiva entre os parâmetros HbA1c e glicose, em ambos os gêneros. As correlações entre idade e demais variáveis foram fracas, entre ambos.

**Palavras-chave.** colesterol, diabetes, epidemiologia, glicemia, HbA1c.

### ABSTRACT

Diabetes is a chronic disease characterized by the presence of permanent hyperglycemia. Glycated Hemoglobin (HbA1c) is formed through the non-enzymatic binding of hemoglobin and glucose. Its dosage in blood is one of the most relevant factors in the evaluation of the glycemic control. The aim of this study is to correlate age, glycemic and lipid profiles in a sample of 776 patients diagnosed with Diabetes Mellitus (DM), from a laboratory in southern Brazil. A total of 776 medical records were analyzed between January and March 2018, and the records were obtained from the records of the months between March 2016 and March 2018. HbA1c, glucose, triglyceride, total cholesterol, LDL-cholesterol and HDL-cholesterol values were analyzed. Our results show a predominance of elderly women (61%), with no age variation between genders, in both it was possible to observe negative and significant correlation between age and LDL-C. There was no clear association between HbA1c and lipid profile. The results showed increased levels of HbA1c and a reduction in total cholesterol and LDL-C in patients over 60 years. A strong positive correlation was found between HbA1c and glucose parameters in both genders. The correlations between age and other variables were weak between both.

**Keywords.** cholesterol, diabetes, epidemiology, blood glucose, HbA1c.

## INTRODUÇÃO

O diabetes caracteriza-se por ser uma doença crônica derivada de hiperglicemia permanente. Os sintomas são a poliúria, polidipsia, perda de peso, sendo associada a complicações micro e macrovasculares, bem como, danos a diversos órgãos<sup>1</sup>. Estima-se que um em cada 11 adultos é portador da doença, fortalecendo-a como uma das maiores emergências de saúde pública globais. Calcula-se que 700 milhões de pessoas no mundo serão acometidas pela diabetes em 2045<sup>2</sup>. No Brasil, o número de diagnosticados aumentou 61,8% nos últimos 10 anos, passando de 5,5% da população em 2006 para 8,9% em 2016<sup>3</sup>. Em razão disso, o país ocupa a quarta posição no ranking de nações com o maior número de adultos com a doença, 14,3 milhões, correspondendo a aproximadamente 7% da população<sup>1,2</sup>.

O diabetes pode ser classificado em quatro grupos: Tipo 1, Tipo 2, Latente Autoimune do Adulto e Gestacional. Entretanto, a maior parte dos casos da doença condiz com duas dessas categorias, o tipo 1, tem como causa a deficiência absoluta de secreção de insulina, resultante da destruição autoimune de células  $\beta$ , ocorrendo predominantemente na infância e adolescência<sup>3</sup>. O tipo 2, responsável por 90% dos casos, relaciona-se à resistência à ação da insulina combinada a uma resposta secretora inadequada. Os fatores relacionados ao desenvolvimento da doença são, especialmente, a obesidade ou sobrepeso, a idade, a hipertensão arterial, o sedentarismo e a tolerância diminuída à glicose<sup>2-4</sup>. A reação não enzimática entre a glicose e o aminoácido valina N-terminal da cadeia beta da hemoglobina A dá origem a hemoglobina glicada (HbA1c)<sup>1,2</sup>. A dosagem da mesma é o principal determinante para avaliação do controle glicêmico em pacientes diabéticos e manter seus níveis abaixo de 7% reduz consideravelmente o risco de desenvolver complicações microvasculares da doença<sup>5,6</sup>. Os níveis de HbA1c tendem a aumentar com a idade e variar de acordo com raça/etnia, independentemente da glicemia, porém não existem valores especificados<sup>7-9</sup>.

A Dislipidemia geralmente está relacionada à doença e configura-se por baixos níveis de

lipoproteínas de alta densidade (HDL), altos níveis de triglicerídeos, lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e colesterol total (CT)<sup>3</sup>. Sendo assim, o monitoramento do perfil lipídico no diagnóstico e acompanhamento de pacientes diabéticos faz-se necessário, independentemente da idade, pois alterações na dislipidemia diabética aumentam potencialmente o risco de doenças aterotrombóticas<sup>3,10</sup>.

Apesar de pesquisas envolvendo a HbA1c e o perfil populacional terem sido desenvolvidas no país, as informações da região sul ainda são escassas. Portanto, estudos envolvendo o estabelecimento e descrição de uma população loco-regional podem contribuir para a compreensão dos dados e da epidemiologia local. Desta maneira, o presente artigo teve como objetivo correlacionar idade, perfil glicêmico e lipídico em uma amostra de prontuários de portadores de Diabetes Melito (DM), em um laboratório privado da região sul do Brasil.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados 776 prontuários, de pacientes de ambos os gêneros autodeclarados portadores de diabetes, provenientes do banco de dados de um laboratório privado de análises clínicas da região sul do Brasil. Os resultados foram coletados de todos os prontuários de exames que foram realizados entre março de 2016 a março de 2018, sendo que o período de análise estatística, do banco de dados, compreendeu os meses entre janeiro a março de 2018. Este trabalho foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) Institucional da Universidade Franciscana (CAAE: 88811118.6.0000.5306. Parecer número:2.643.067).

Analisaram-se os seguintes parâmetros laboratoriais: HbA1c, glicose, triglicerídeos, colesterol total (CT), LDL-colesterol (LDL-C) e HDL-colesterol (HDL-C). As metodologias utilizadas nos exames dos quais foram obtidos os prontuários são, cromatografia líquida de alta pressão de permuta iônica (HPLC), Detergente Seletivo Acelerador, Glicerol Fosfato Oxidase, Colesterol esterase/oxidase e Hexoquinase/G-6-PDH, para HbA1c, HDL, Triglicerídeos, Colesterol e Glicose, respectivamente. O LDL-C é obtido pela fórmula de Friedewald,  $[LDL] = \text{Colesterol Total} - \text{HDL} - \text{VLDL}$ .

Foram excluídos pacientes que se submeteram ao exame de glicose pós-prandial. Os intervalos de referência utilizados foram: CT (190 mg/dL), LDL-C (<130 mg/dL), HDL-C (>40 mg/dL), triglicerídeos (150 mg/dL), glicose (100 mg/dL) e HbA1c (6,5%)<sup>11</sup>. Todas as dosagens foram realizadas por métodos padronizados, por meio de coleta de sangue venoso, após jejum de 12 horas.

Os dados foram analisados utilizando-se os programas Excel 2013 e *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) versão 25.0. Utilizou-se estatística descritiva, mediante distribuição de frequência e gráficos, teste não paramétrico de Mann-Whitney e teste de correlação de Spearman, sendo considerados estatisticamente significativos resultados com valor  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

Dentre os 776 prontuários de pacientes analisados na pesquisa, 477 (61,5%) eram do gênero feminino e 299 (38,5%) do gênero masculino, sendo que 450 (58%) apresentaram idade entre 60 e 90 anos.

Ao analisar o perfil lipídico de todos os pacientes verificamos que a média geral dos triglicerídeos foi superior ao desejável,  $159,6 \pm 82,3$ mg/dL, no entanto os demais parâmetros não apresentaram alteração em relação aos valores de referências, sendo  $182,1 \pm 46,1$  mg/dL,  $51,3 \pm 12,2$ mg/dL e  $99,1 \pm 40,1$ mg/dL, para CT, HDL-C E LDL-C, respectivamente. Os níveis médios de glicose foram  $135,1 \pm 51,1$ mg/dL e os de HbA1c foram 7,2%, valores acima do recomendado, mesmo para pacientes diabéticos.

Os pacientes foram estratificados por gênero e idade para se analisar os parâmetros bioquímicos acima mencionados, como apresentado na **Tabela**.

Não houve diferença significativa entre HbA1c ( $p=0,400$ ) e triglicerídeos ( $p=0,399$ ) entre homens e mulheres. Nas mulheres, os valores de colesterol total ( $p < 0,001$ ), HDL-C ( $p < 0,001$ ) e LDL-C ( $p=0,001$ ) foram superiores. Os pacientes masculinos apresentaram valores superiores de glicose ( $p < 0,001$ ) em relação às mulheres. Sendo assim, o gênero é capaz de influenciar nos níveis de colesterol total, HDL-C, LDL-C e glicose dos pacientes.

**Tabela.** Variáveis dos parâmetros considerados com distribuições entre o gênero e idade dos pacientes

| Variáveis           | Sexo             |                  |          | Idade            |                  |          |
|---------------------|------------------|------------------|----------|------------------|------------------|----------|
|                     | Masculino        | Feminino         | <i>p</i> | Até 60 anos      | Mais de 60 anos  | <i>p</i> |
| Hemoglobina Glicada | $7,2 \pm 1,6$    | $7,1 \pm 1,5$    | 0,400    | $7,1 \pm 1,7$    | $7,2 \pm 1,4$    | 0,006    |
| Glicose             | $143,9 \pm 55,4$ | $129,4 \pm 47,5$ | < 0,001  | $135,3 \pm 57,2$ | $134,8 \pm 46,4$ | 0,118    |
| Colesterol Total    | $172,1 \pm 45,2$ | $188,3 \pm 45,7$ | < 0,001  | $190,6 \pm 47,7$ | $175,8 \pm 43,9$ | < 0,001  |
| HDL-C               | $46,5 \pm 11,9$  | $54,3 \pm 11,5$  | < 0,001  | $51,2 \pm 12,6$  | $51,5 \pm 11,9$  | 0,709    |
| LDL-C               | $92,8 \pm 38,1$  | $103,1 \pm 40,8$ | 0,001    | $109,5 \pm 41,1$ | $93,1 \pm 38,2$  | < 0,001  |
| Triglicerídeos      | $164,8 \pm 89,7$ | $156,4 \pm 77,4$ | 0,399    | $164,1 \pm 93,7$ | $156,4 \pm 72,9$ | 0,764    |

Valores expressos em média e desvio padrão

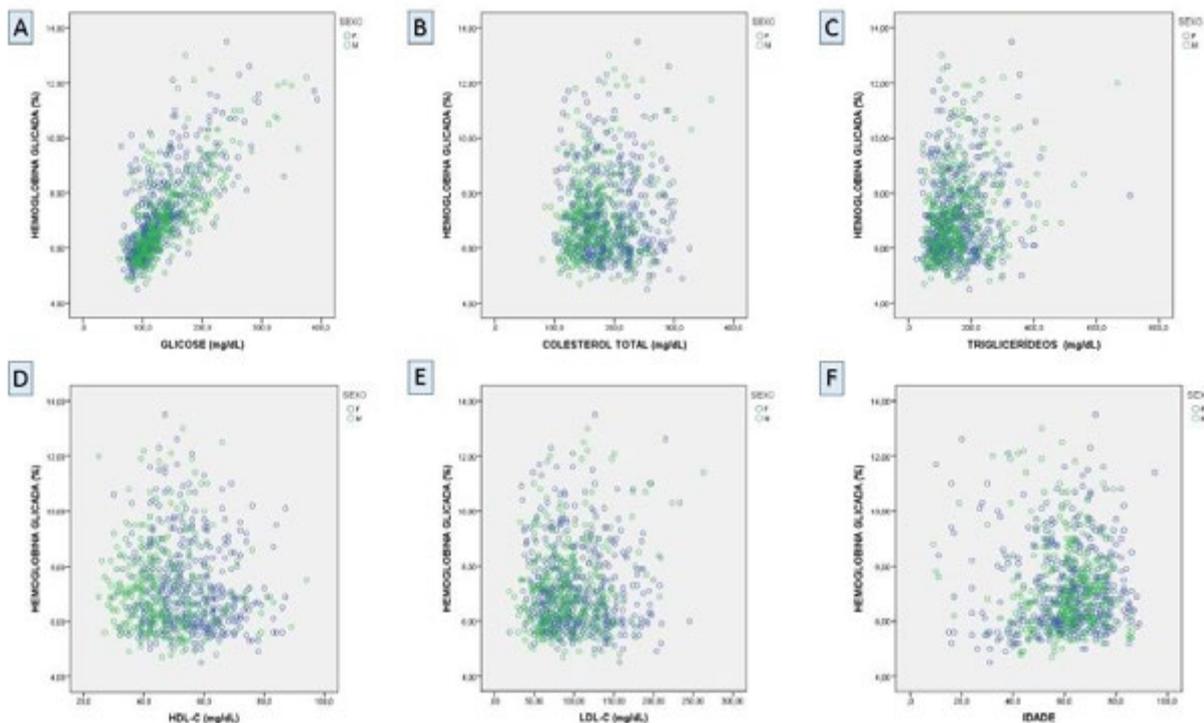
Com relação à idade, a média foi de  $60,7 \pm 12,8$  anos para homens e  $61 \pm 14,7$  anos para mulheres. Foram evidenciadas diferenças significativas entre HbA1c ( $p=0,006$ ), colesterol ( $p < 0,001$ ) e LDL-C ( $p < 0,001$ ) com relação à idade dos pacientes. Houve um aumento do HbA1c e uma redução no colesterol e LDL-C nos pacientes com faixa etária superior a 60 anos. Portanto, a faixa etária influencia nos parâmetros bioquímicos dos mesmos. No entanto, não houve evidências estatísticas para se afirmar que a

glicose ( $p=0,118$ ), o HDL-C ( $p=0,709$ ) e os triglicerídeos ( $p=0,764$ ) sejam diferentes entre os pacientes mais idosos, sugerindo que tais parâmetros não sofrem influência da idade.

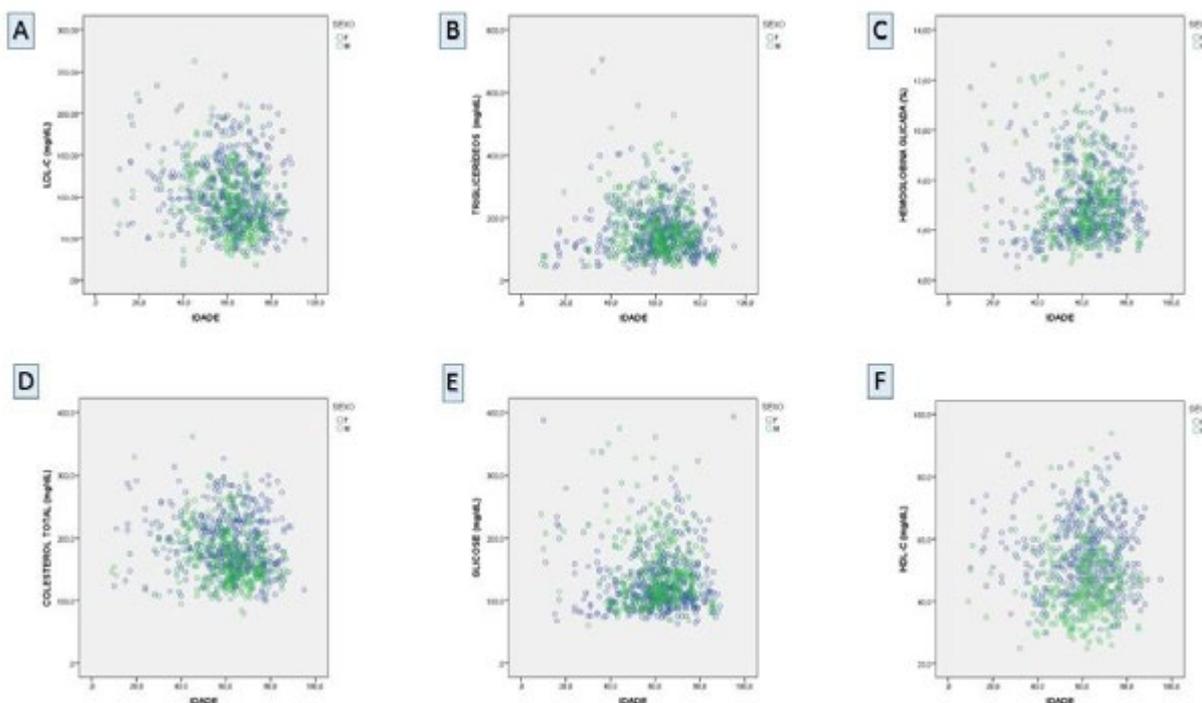
Foram correlacionados a HbA1c com a glicose e o perfil lipídico, sendo possível identificar uma forte correlação positiva entre HbA1c e glicose, em ambos os gêneros,  $r_s=0,738$ ;  $p < 0,001$  (masculino) e  $r_s=0,724$ ;  $p < 0,001$  (feminino), representadas na **Figura 1A**, ou seja, o aumento da glicose faz com que ocorra um aumento da HbA1c

tanto nos homens como nas mulheres. Todas as demais relações, entre os parâmetros avaliados, foram classificadas como correlações fracas, conforme demonstrado entre as **Figuras 1B a 1E**.

Na análise de correlação entre idade e as demais variáveis, as correlações demonstraram ser fracas em ambos os gêneros, conforme demonstrado nos gráficos da **Figura 2 (A a F)**.



**Figura 1.** Correlação entre a HbA1c com a glicose, determinadas variáveis do perfil lipídico e idade, relacionadas com o gênero



**Figura 2.** Correlação entre a idade, determinadas variáveis do perfil lipídico, HbA1c e glicose, relacionadas com o gênero

## DISCUSSÃO

Na população estudada verificamos um maior percentual de idosos diabéticos, dentre estes houve superioridade de mulheres em relação aos homens. A maior frequência de DM no gênero feminino, encontrada neste trabalho, está de acordo com o relatado em outro estudo<sup>12</sup>. Ainda é importante ressaltar que a expectativa de vida dos homens brasileiros é de 72,8 anos, enquanto a das mulheres é de 79,9 anos<sup>13</sup>. Assim, a prevalência de doença crônica entre as mulheres tende a ser maior. Além disso, houve maior predomínio de pacientes ginecológicas atendidas pelo laboratório onde foram feitas as análises. Em relação à idade observamos que mais da metade da população encontrava-se acima dos 60 anos, contrastando a estudos realizados nos estados de Minas Gerais, Bahia e Piauí, com o objetivo de descrever o perfil dos pacientes diabéticos, nos quais um maior percentual da população pertencia à faixa etária entre 40 e 59 anos<sup>14-16</sup>. A diferença de idade entre a população deste estudo e as demais pesquisas citadas, pode estar relacionada a dois fatores: o período em que foram realizados, entre 2005 e 2017 e, principalmente, ao envelhecimento acelerado da população brasileira, pois segundo pesquisa do IBGE, o grupo de pessoas com 60 anos ou mais cresceu 18% entre 2012 e 2017<sup>17</sup>. Por se tratar de uma análise retrospectiva a partir de banco de dados contendo informações restritas, não foi possível determinar se havia predominância de DM2 ou, se houve neste grupo, maior correspondência ao envelhecimento da população brasileira, pois não havia informação de data do diagnóstico.

Silva et al<sup>15</sup> verificaram que a variável que apresentou maior frequência de alteração foi o LDL-C (84%), a partir de uma pesquisa, a qual investigou os fatores de risco para doenças cardiovasculares, em idosos com DM2. Em nosso estudo, a glicose apresentou maior alteração em relação ao valor de referência, estando 34,5% acima do desejável, seguido de HbA1c e triglicerídeos, correspondendo a 10,8% e 9,8%, respectivamente.

Quanto à distribuição das variáveis entre os gêneros (**Tabela**), pode-se observar que não houve alterações significativas quanto à hemoglobina glicada, resultados que concordam com estudo

anterior<sup>18</sup>. Porém, discordam de Silva et al<sup>15</sup>, os quais identificaram níveis elevados de HbA1c entre os homens. Quanto à glicose, foi possível observar níveis mais elevados nos homens, resultado que difere do encontrado em outros estudos<sup>19-21</sup>, que fizeram investigações semelhantes, não encontrando diferença significativamente estatística de glicose entre os gêneros.

Analisando o perfil lipídico, as mulheres apresentaram valores elevados de colesterol total e LDL-C, esses achados diferem dos resultados encontrados por Silva et al<sup>15</sup>, onde foram identificados níveis alterados somente de HDL-C e colesterol no sexo feminino. Além desses, De Oliveira et al<sup>22</sup> encontraram valores elevados de HDL-C e LDL-C em mulheres. Nas últimas décadas, tem se identificado uma associação entre o início da menopausa e o aumento da prevalência de fatores de risco cardiovascular, relacionado a um perfil lipídico mais aterogênico. Estudos indicam que a falta de estrogênio favorece o desenvolvimento de diabetes, hipertensão, obesidade e dislipidemia. Além disso, algumas pesquisas indicam que a produção de estrogênio é associada a baixos níveis de LDL-C e HDL-C e, que mulheres na pós-menopausa tem níveis significativamente aumentados de triglicerídeos e LDL-C<sup>21</sup>.

A forte correlação encontrada entre HbA1c e glicose, ratifica os achados da literatura a respeito da utilização da HbA1c como diagnóstico de diabetes, por refletir os níveis glicêmicos do indivíduo, situando a população deste estudo no contexto estudado e descrito anteriormente<sup>1-3</sup>. Atualmente, a diretriz do Colégio Americano de Medicina<sup>23</sup> sugere alteração dos valores de referência da HbA1c para o intervalo entre 7% a 8%, devido a evidências, baseadas em estudos de coorte, como o estudo Sueco, conduzido por Lind et al<sup>24</sup>, que observaram níveis significativos de complicações microvasculares, entre outras, acima de 7%.

A correlação negativa entre idade e LDL-C, corrobora os achados de Russo et al<sup>25</sup>, que identificaram valores inferiores em indivíduos com idade abaixo de 65 anos, em relação aqueles com idade mais avançada. Os pacientes idosos deste estudo apresentaram valores mais elevados de glicose, HDL-C e triglicerídeos, corroborando o descrito por Tinsley et al<sup>26</sup>, que encontraram

similaridade de níveis desses parâmetros em 1904 pacientes entre 50 e 85 anos.

Este estudo foi realizado em uma população limitada compreendendo pacientes que, em sua maioria, possuíam convênio médico. Portanto, os achados desta investigação não excluem a relação entre HbA<sub>1c</sub> e perfil lipídico, onde um maior controle dos níveis glicêmicos representa um maior controle no perfil lipídico, reduzindo o risco de doenças cardiovasculares. Assim como, por suas limitações, os achados não são representativos de outros laboratórios. Sendo assim, um registro mais detalhado da população da região sul, abrangendo dados demográficos, frequência de sedentarismo, sobrepeso, complicações crônicas e comorbidades seria útil para a melhor compreensão do perfil epidemiológico de diabetes na região, auxiliando no desenvolvimento de ações de saúde mais direcionadas à realidade do DM na região central do RS. Panarotto et al<sup>27</sup> demonstraram, por meio de estudo comparativo entre o tratamento de pacientes diabéticos do tipo 2 de um serviço público de saúde e os provenientes de uma clínica privada, que os pacientes atendidos pelo serviço público apresentavam pior controle metabólico, embora somente os valores de HbA<sub>1c</sub> e colesterol tenham alcançado significância estatística.

## CONCLUSÃO

De acordo com os achados deste estudo, pode-se concluir que, foi possível observar uma maior prevalência de pacientes idosos, acima de 60 anos de idade, e do gênero feminino. Não houve uma clara associação entre HbA<sub>1c</sub> e perfil lipídico na amostra estudada. Os valores de colesterol e LDL-C apresentaram-se elevados na população feminina. Os níveis de glicose na população masculina apresentaram resultados elevados comparados ao valor de referência. O estudo mostrou uma correlação negativa entre idade e LDL-C. Os resultados demonstraram aumento nos níveis de HbA<sub>1c</sub> e redução no colesterol total e LDL-C, nos pacientes acima de 60 anos de idade. Encontrou-se uma forte correlação positiva entre os parâmetros HbA<sub>1c</sub> e glicose, em ambos os gêneros. As correlações entre idade e demais variáveis foram fracas, entre ambos os gêneros.

## REFERÊNCIAS

1. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2014;37 (Suppl 1):S81-90. <http://dx.doi.org/10.2337/dc14-S081>
2. International Diabetes Federation 2017. [acesso 2018 Jun 16]. Disponível em: <https://www.idf.org>
3. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care*. 2017;40(Suppl 1):S11-24. <http://dx.doi.org/10.2337/dc17-S005>
4. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018. Oliveira, JEP, Montenegro Junior R, Vencio S, Organizadores. São Paulo: Editora Clannad; 2017 [acesso 2018 Jun 18]. Disponível em: <https://www.diabetes.org.br/profissionais/images/2017/diretrizes/diretrizes-sbd-2017-2018.pdf>
5. Agência Brasil - Brasília (BR). Número de brasileiros com diabetes cresceu 61,8% em 10 anos. [acesso 2018 Jun 10]. Disponível em: <http://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2017-04/pesquisa-revela-que-diabetes-no-brasil-cresceu-618-em-dez-anos>
6. Bem A F, Kunde J. A importância da determinação da hemoglobina glicada no monitoramento das complicações crônicas do diabetes mellitus. *J Bras Patol Med Lab*. 2006;42(3):185-91. <http://dx.doi.org/10.1590/S1676-24442006000300007>
7. Netto AP, Andriolo A, Filho FF, Tambascia M, Gomes MB, Melo M et al. Atualização sobre hemoglobina glicada (HbA<sub>1c</sub>) para avaliação do controle glicêmico e para o diagnóstico do diabetes: aspectos clínicos e laboratoriais. *J Bras Patol Med Lab*. 2009;45(1):31-48. <http://dx.doi.org/10.1590/S1676-24442009000100007>
8. International Expert Committee. International Expert Committee report on the role of the A<sub>1c</sub> assay in the diagnosis of diabetes. *Diabetes Care*. 2009;32(7):1327-34. <https://doi.org/10.2337/dc09-9033>
9. Roberts WL, Safa-Pour S, De BK, Rohlfing CL, Weykamp CW, Little RR. Effects of hemoglobin C and S traits on glycohemoglobin measurements by eleven methods. *Clin Chem* 2005;51(4):776-8. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2004.047142>
10. Pani L N, Korenda L, Meigs JB, Driver C, Chamany S, Fox CS et al. Effect of aging on A<sub>1c</sub> levels in individuals without diabetes: evidence from the Framingham Offspring Study and the National Health and Nutrition Examination Survey 2001-2004. *Diabetes Care*. 2008; 31(10):1991-6. <https://doi.org/10.2337/dc08-0577>

11. Magalhães MEC. Novas Metas de Colesterol da Diretriz de Dislipidemia da SBC. *Int J Cardiovasc Sci*. 2017;30(6):466-8. <https://doi.org/10.5935/2359-4802.20170090>
12. Davidson MB. How our current medical care system fails people with diabetes: lack of timely, appropriate clinical decisions. *Diabetes Care*. 2009; 32(2):370-2. <https://doi.org/10.2337/dc08-2046>
13. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE. Estatística de gênero. [acesso 2019 Dez 22]. Disponível em: [https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv101551\\_informativo.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv101551_informativo.pdf)
14. Silva AB, Engroff P, Sgnaolin V, Ely LS, Gomes I. Prevalência de diabetes *mellitus* e adesão medicamentosa em idosos da Estratégia Saúde da Família de Porto Alegre/RS. *Cad Saúde Colet*. 2016; 24(3):308-16. <https://doi.org/10.1590/1414-462x201600030017>
15. Silva RCP, Simões, MJS, Leite, AA. Fatores de risco para doenças cardiovasculares em idosos com diabetes mellitus tipo 2. *Rev Ciên Farm Básica Apl*. 2009;28(1):113-21.
16. Pазze L, Guimarães RAB, Pimenta RGE, Paiva SLS, Bueno H, Faria TA. Perfil dos pacientes diabéticos da unidade básica de saúde do Santana-Paracatu - MG. [Monografia]. Paracatu (MG): Faculdade Atenas; 2014.
17. Palmeira CS, Pinto SR. Perfil epidemiológico de pacientes com diabetes *mellitus* em Salvador, Bahia, Brasil (2002-2012). *Rev Baiana Enferm*. 2005; 29(3): 240-9. <http://dx.doi.org/10.18471/rbe.v29i3.13158>
18. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Agência de Notícias IBGE. Número de idosos cresce 18% em 5 anos e ultrapassa 30 milhões em 2017. [acesso 2018 Jun18]. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/20980-numero-de-idosos-cresce-18-em-5-anos-e-ultrapassa-30-milhoes-em-2017.html>
19. Filho ACAA, Almeida PD, Araújo AKL, Sales IMM, Araújo TME et al. Perfil epidemiológico do Diabetes *Mellitus* em um estado do nordeste brasileiro. *Rev Fund Care*. 2017 9(3):641-7. [acesso 2018 Jun 15]. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/5057/505754116006.pdf>
20. Barbosa JB, dos Santos AM, Barbosa MM, Barbosa MM, de Carvalho CA, Fonseca PCA et al. Síndrome metabólica, resistência insulínica e outros fatores de risco cardiovascular em universitários. *Ciênc Saúde Coletiva*, 2016; 21(4):1123-36. <http://dx.doi.org/10.1590/1413-81232015214.10472015>
21. Berlese DB, da Silva LC, dos Santos GA, da Cunha GL, Berlese DB, Feksa LR et al. Perfil sociodemográfico, bioquímico e hematológico de idosos residentes do município de Ivoti/RS. *Rev Conhecimento Online*, 2018;1:120-7. <https://doi.org/10.25112/rco.v1i0.1145>
22. de Oliveira Alvim R, Mourao-Junior, CA, Magalhaes GL, de Oliveira CM, Krieger JE, Mill JG et al. Non-HDL cholesterol is a good predictor of the risk of increased arterial stiffness in postmenopausal women in an urban Brazilian population. *Clinics (Sao Paulo)*. 2017;72(2):106-10. [http://dx.doi.org/10.6061/clinics/2017\(02\)07](http://dx.doi.org/10.6061/clinics/2017(02)07)
23. Qaseem A, Wilt TJ, Kansagara D, Horwitch C, Barry MJ, Forciea MA. Hemoglobin A<sub>1c</sub> targets for glycemic control with pharmacologic therapy for nonpregnant adults with Type 2 Diabetes Mellitus: a guidance statement update from the American College of Physicians. *Ann Intern Med*. 2018;168(8):569-76. <https://doi.org/10.7326/M17-0939>
24. Lind M, Pivodic A, Svensson AM, Ólafsdóttir AF, Wedel H, Ludvigsson J. HbA1c level as a risk factor for retinopathy and nephropathy in children and adults with type 1 diabetes: Swedish population based cohort study. *BMJ*;2019, 366:I4894. <https://doi.org/10.1136/bmj.l4894>
25. Russo GT, Cosmo S, Viazzi F, Mirijello A, Ceriello A, Guida P et al. Diabetic kidney disease in the elderly: prevalence and clinical correlates. *BMC Geriatr*. 2018;8(1):38. <https://doi.org/10.1186/s12877-018-0732-4>
26. Tinsley LJ, Kupelian V, D'Eon SA, Pober D, Sun JK, King GL et al. Association of glycemic control with reduced risk for large-vessel disease after more than 50 years of type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017; 102(10): 3704-11. <https://doi.org/10.1210/jc.2017-00589>
27. Panarotto D, Träsel HAV, de Oliveira MS, Gravina LB, Teles AR. Controle glicêmico de pacientes diabéticos tipo 2 nos serviços público e privado de Saúde. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2009;53(6):733-40. <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-27302009000600007>



# Incidência de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> em amendoins

## Incidence of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> in peanuts

RIALA6/1783

Maria Helena IHA MATIAS\*, Marcelo Ferreira da CRUZ, Isaura Akemi OKADA, Rita de Cássia BRIGANTI, Maria Aparecida de OLIVEIRA

\*Endereço para correspondência: Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas, Centro de Laboratório Regional, Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto VI. Rua Minas, 877, Campos Elíseos, Ribeirão Preto, SP, Brasil, CEP: 14085-410, Tel: 16 3625 5046. E-mail: maria.matias@ial.sp.gov.br

Recebido: 03.12.2018 - Aceito para publicação: 11.03.2020

### RESUMO

Micotoxinas são substâncias tóxicas produzidas por fungos e encontradas nos alimentos. As micotoxinas mais tóxicas são as aflatoxinas, produzidas, principalmente por *Aspergillus flavus*. Estudos realizados no país demonstraram alta incidência dessas micotoxinas em produtos de amendoim, que representa risco à saúde da população. O objetivo do estudo foi avaliar a incidência de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> em amostras de amendoins comercializados na região Nordeste do Estado de São Paulo nos períodos de 1994-2001 e 2016-2017. O método utilizado para analisar as amostras no primeiro período foi extração líquido-líquido e cromatografia em camada delgada e no segundo foi utilizando colunas de imunoafinidade, cromatografia líquida com derivatização pós-coluna e detector por fluorescência. No levantamento de 1994-2001 das 82 amostras, 39% tiveram contaminação de aflatoxinas variando de 11 a 1556 µg/kg com 37% das amostras contendo níveis maiores que 20 µg/kg, enquanto na pesquisa de 2016-17, das 56 amostras, 38% apresentaram contaminação destas toxinas variando de 0,09 a 60,40 µg/kg com 13% das amostras contendo níveis maiores que 20 µg/kg. Os resultados dos dois períodos estudados indicam que houve uma diminuição na incidência e nível das aflatoxinas estudadas, embora esta contaminação em amendoim permaneça um problema de saúde pública.

**Palavras-chave.** aflatoxinas, *Arachis hypogaea* (amendoim), incidência.

### ABSTRACT

Mycotoxins are toxic compounds produced by fungi found in food. The most toxic mycotoxins are the aflatoxins produced mainly by *Aspergillus flavus*. Studies carried out in Brazil showed a high incidence of these mycotoxins in peanut products, a fact that represents public health problems. The aim of the study was to evaluate aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> in samples of peanuts sold in cities of the Northeast of the State of São Paulo in the period from 1994 to 2001 and from 2016 to 2017. The samples of the first period were analyzed using liquid-liquid extraction and thin-layer chromatography and the second using immunoaffinity columns, post-column derivative liquid chromatography and fluorescence detector. In the 1994-2001 survey, among 82 samples, 39% presented aflatoxins contamination ranging from 11 to 1556 µg/kg with 37% with levels greater than 20 µg/kg whereas, in the 2016-17 survey, 38% of the 56 samples presented contamination of aflatoxins ranging from 0.09 to 60.40 µg/kg and 7 samples 13% containing aflatoxins levels higher than 20 µg/kg. The results indicated there was a decrease in the incidence and level of aflatoxins, but the contamination of aflatoxins in peanuts remains a public health problem.

**Keywords.** aflatoxins, *Arachis hypogaea* (peanuts), incidence.

## INTRODUÇÃO

As micotoxinas são compostos naturais de baixo peso molecular produzidas por fungos. As aflatoxinas (AFs), constituem o principal grupo de micotoxinas, são tóxicas e carcinogênicas para humanos e animais. Sob condições climáticas adversas ou condições de armazenamento precárias, as AFs são produzidas por *Aspergillus* (principal produtor *A. flavus*) em uma grande variedade de produtos agrícolas, como milho, algodão, amendoim e certas nozes<sup>1</sup>.

A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer<sup>2</sup> classificou a aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) como um carcinógeno do grupo 1. A AFB<sub>1</sub> induz a fosforilação da proteína reguladora Src quinase e estimula a migração de células do câncer de pulmão<sup>3</sup>. A exposição de fetos no útero à AFB<sub>1</sub> está associada à metilação do DNA nos glóbulos brancos<sup>4</sup>. A exposição crônica a AFs pode levar à ocorrência de câncer hepático e para portadores do vírus da hepatite, pode haver uma sinergia entre o vírus e a toxina, que desencadeia mais facilmente o câncer. Em áreas de alta exposição a AFB<sub>1</sub>, esta micotoxina interage sinérgica e multiplicativamente com o vírus da hepatite B para induzir o carcinoma hepatocelular<sup>5</sup>. Segundo Liu et al<sup>6</sup>, reduzir a exposição às AFs a níveis não detectáveis poderia reduzir os casos de carcinoma hepatocelular em áreas de alto risco em cerca de 23%.

Existem muitos relatos de contaminação por AFs em amendoins, incluindo artigos científicos da República Democrática do Congo<sup>7</sup>, Quênia<sup>8</sup>, Costa do Marfim<sup>9</sup>, e no Brasil. Nos últimos anos inúmeras pesquisas demonstraram a presença de micotoxinas nos alimentos, sendo, o amendoim, o alimento que apresenta as concentrações mais elevadas de AFs. A contaminação por AFs em amendoins e produtos de amendoim tem sido considerado por muitos autores como problema de saúde pública no Brasil<sup>10-13</sup>.

Dentre os métodos analíticos para analisar as AFs, a etapa de limpeza da amostra é a mais demorada, e geralmente consiste na extração com solvente<sup>14</sup> ou a utilização de colunas de imunoafinidade (CIA)<sup>15</sup>. A cromatografia em camada delgada (CCD) está entre os métodos analíticos mais antigos, e é uma técnica simples e

barata, especialmente útil para análise de AFs em países em desenvolvimento. Com os avanços na instrumentação, começou-se a utilização da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector por fluorescência, para a análise de AFs. Métodos hifenizados, como cromatografia acoplada a espectrometria de massa (MS) ou CLAE-MS/MS, também foram desenvolvidos para quantificação e confirmação de AFs. Novas tecnologias analíticas para a purificação e isolamento de AFs incluem o uso de extração assistida ultrassônica e QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*)<sup>16</sup>. Neste estudo, a CCD foi utilizada para amostras analisadas no período de 1994 a 2001 e CLAE para as amostras pesquisadas no período de 2016 a 2017.

O objetivo deste estudo foi verificar a incidência e nível de aflatoxinas em amendoins durante o período de 2016 a 2017 e comparar com os resultados obtidos de 1994 a 2001 no mesmo tipo de produto.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras

Oitenta e duas amostras de amendoins foram coletadas pela Vigilância ou enviadas por consumidores ao Laboratório Regional do Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto no período de 1994 a 2001 e analisadas pelo método de CCD. Durante o período de 2016 a 2017, 56 amostras de amendoim foram adquiridas em supermercados de municípios da região Nordeste do Estado de São Paulo: Ribeirão Preto e Araraquara, e analisadas por CLAE. As amostras de amendoim, a granel ou embaladas, eram compostas de: amendoim cru (com e sem casca), torrado, japonês, salgado, crocante, doce, com chocolate e confeitado.

### Materiais, reagentes e solventes

Os reagentes químicos e suprimentos utilizados no estudo foram: padrões de AFs (A6636, A9887, A0138, A0263, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO); metanol e acetonitrila (grau cromatografia, EM Science, Gibbstown, NJ, EUA); coluna de imunoafinidade (Afla Star Fit 3 Romer Labs, Tulln, Áustria); cloreto de sódio, fosfato monopotássico, fosfato dissódico, cloreto de potássio (KCl), sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>), celite, clorofórmio,

tolueno, ácido fórmico, acetato de etila, acetona, benzeno e acetonitrila (grau PA, Merck, Alemanha ou Rio de Janeiro); cromatoplacas de alumínio (20x20cm, Merck, Alemanha), microseringa de 10, 100 e 1000 µL (Hamilton, Reno, EUA); béqueres, provetas, erlenmeyers e balões volumétrico de diversos volumes.

Soluções estoque de cada uma das AFs foram preparadas em acetonitrila, e suas concentrações foram determinadas de acordo com o método da AOAC 971.22<sup>17</sup>. Uma solução padrão estoque da mistura das quatro AFs foi preparada na concentração de AFB<sub>1</sub>, 200 ng/mL; AFB<sub>2</sub>, 50 ng/mL; AFG<sub>1</sub>, 100 ng/mL; e AFG<sub>2</sub>, 50 ng/mL em acetonitrila. Porções apropriadas da solução padrão estoque das AFs foram diluídas em fase móvel para preparar as soluções padrão de calibração com as seguintes concentrações: AFB<sub>1</sub>, 0,40; 1,00; 2,00; 4,00 e 10,00 ng/mL; AFB<sub>2</sub> e AFG<sub>2</sub>, 0,10; 0,25; 0,50; 1,00 e 2,50 ng/mL; e AFG<sub>1</sub>, 0,20; 0,50; 1,00; 2,00 e 5,00 ng/mL. A solução padrão utilizada para a contaminação das amostras para o estudo de recuperação apresentou uma concentração de AFs totais de 400 ng/mL.

### Equipamentos

Os equipamentos usados foram: cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector por fluorescência (Shimadzu Instruments, Kyoto, Japão), injetor Rheodyne LP com loop de 50 µL (Rheodyne, Cotati, CA, EUA) e coluna C<sub>18</sub> de 4,6 x 250 mm, 5 µm (Shimadzu, Kyoto, Japão); sistema de derivatização pós coluna para AFT, PHRED célula (célula de derivação fotoquímica pós coluna; AURA Industries, Nova York, NY, EUA), espectrofotômetro (Hach, Loveland, CO); vortex (Fanem, São Paulo, Brasil); centrífuga (Fanem, São Paulo, Brasil); suporte de colunas (Supelco, Bellefonte, PA); agitador (Tecnal, Piracicaba, Brasil); balança analítica (Mettler Toledo, Suíça); liquidificador (Philips, São Paulo); banho-maria (Fanem, São Paulo); câmara escura de luz UV (λ=366nm, Linsa, São Paulo).

### Análise de AFB<sub>1</sub> e AFG<sub>1</sub> pelo método CCD - amostras coletadas de 1994 a 2001

As amostras foram analisadas de acordo com Soares e Rodrigues-Amaya<sup>14</sup>. A amostra foi

extraída com metanol: KCl 4% (9:1, v/v), filtrada, juntamente com CuSO<sub>4</sub> 10%, através de celite seguida de partição duas vezes com clorofórmio. A CCD foi usada para separar as AFs dos interferentes da matriz, a fase móvel foi tolueno:acetato de etila: ácido fórmico (60:40:0,5, v/v/v). A quantificação foi por comparação visual das intensidades de fluorescência das manchas de AFB<sub>1</sub> e AFG<sub>1</sub> nas amostras com os pontos correspondentes dos padrões. As amostras positivas foram confirmadas com ácido trifluoracético.

### Análise de AFs pelo método CLAE

#### *Preparação e extração de amostras*

O procedimento para análise de AFs em amostras de amendoim foi de acordo com Iha et al<sup>15</sup>. Um quilo de cada uma das amostras foi triturado e homogeneizado. Foram adicionados 20 mL de solução de extração (metanol:água, 6:4, v/v) em tubo contendo 5 g da amostra, esta mistura foi agitada durante 60 min e depois centrifugada durante 10 min a 600 g. Oito mililitros do sobrenadante foram utilizados para a purificação em CIA, como descrito no próximo item. Todas as amostras foram analisadas em duplicata.

#### *Purificação e isolamento utilizando CIA*

Oito mililitros de sobrenadante filtrado foram adicionados a 24 mL de tampão fosfato, 10 mM, pH 7,4 e foram misturados. A mistura foi transferida para uma CIA. Depois esta CIA foi lavada duas vezes com 10 mL de água. As AFs foram eluídas utilizando 0,7 mL de metanol, duas vezes. O eluato contendo as AFs foi coletado em um frasco volumétrico de 2 mL e completado com água imediatamente antes da injeção cromatográfica.

#### *Condições cromatográficas*

A fase móvel utilizada foi uma mistura de água:acetonitrila:metanol (60:17:25, v/v/v) com vazão de 0,8 mL/min, temperatura da coluna 35°C. O detector de fluorescência foi ajustado em comprimento de onda de excitação de 362 nm e comprimento de onda de emissão de 440 nm, com derivatização pós-coluna, injeção cromatográfica de 50 µL. Os picos das AFs na amostra foram identificados comparando os tempos de retenção com os dos padrões. Após passar pela célula

PHRED, a AFG<sub>1</sub> e a AFB<sub>1</sub> são derivatizados para formar G<sub>2a</sub> (derivado de G<sub>1</sub>) e B<sub>2a</sub> (derivado de B<sub>1</sub>).

### Estudo de Recuperação

Para o estudo de recuperação do método de CCD foi adicionado padrão de AFB<sub>1</sub> na amostra de amendoim livre de AFs, a concentração final foi de 17 µg/kg, em triplicata. Após 2 h, as amostras contaminadas artificialmente foram analisadas de acordo com o método.

Para o estudo de recuperação do método de CLAE, uma quantidade apropriada de solução padrão de AFs foi adicionada à amostras livre de AFs em diferentes níveis, AFB<sub>1</sub>, 2,56; 5,20; 10,00 µg/kg; AFB<sub>2</sub> e AFG<sub>2</sub>, 0,64; 1,30; 2,50 µg/kg; e AFG<sub>1</sub>, 1,28; 2,60; 5,00 µg/kg, em triplicata. Após 2 h, as amostras contaminadas artificialmente foram analisadas de acordo com o método.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período de 1994-2001, apenas AFB<sub>1</sub> e AFG<sub>1</sub> foram quantificados, pois a legislação brasileira,

de 1976 a 2002, estabelecia a tolerância de 30 µg/kg para soma de AFB<sub>1</sub> e AFG<sub>1</sub><sup>18</sup>. A recuperação média de AFB<sub>1</sub> em concentração de 17,4 µg/kg (análise triplicata) foi de 90% e o limite de detecção (LD) foi de 2 µg/kg para as AFB<sub>1</sub> e AFG<sub>1</sub>.

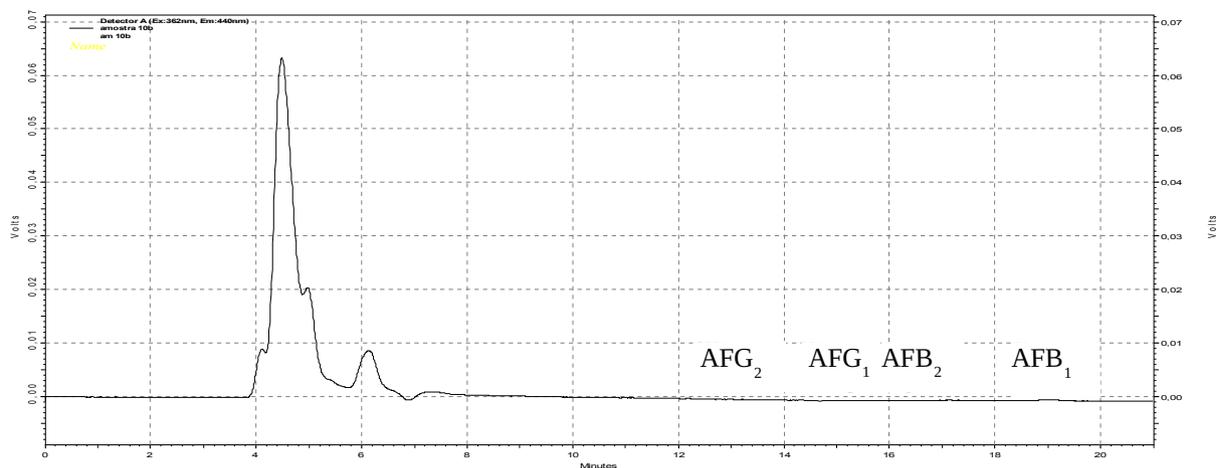
A **Tabela** mostra a ocorrência frequente e os altos níveis de contaminação das AFs em amostras coletadas de 1994 a 2001. Trinta e nove por cento (32 de 82 amostras) de amostras de amendoins continham AFs variando de 11 a 1556 µg/kg. Trinta amostras (37%) estavam contaminadas em níveis acima do limite máximo permitido pela legislação brasileira (somatório de AFs = 20 µg/kg)<sup>19</sup>. A maior incidência de contaminação de AFs em amendoim (67%) ocorreu em 1999, enquanto o maior nível foi encontrado em 1996, 1556 µg/kg.

De 2016-2017 foi utilizado CIA, esta coluna tem sido amplamente utilizado para análise de AFs, sendo observados bons resultados. Os cromatogramas obtidos de amostras de amendoim livre de AFs e naturalmente contaminados com AFs são mostrados na **Figura**.

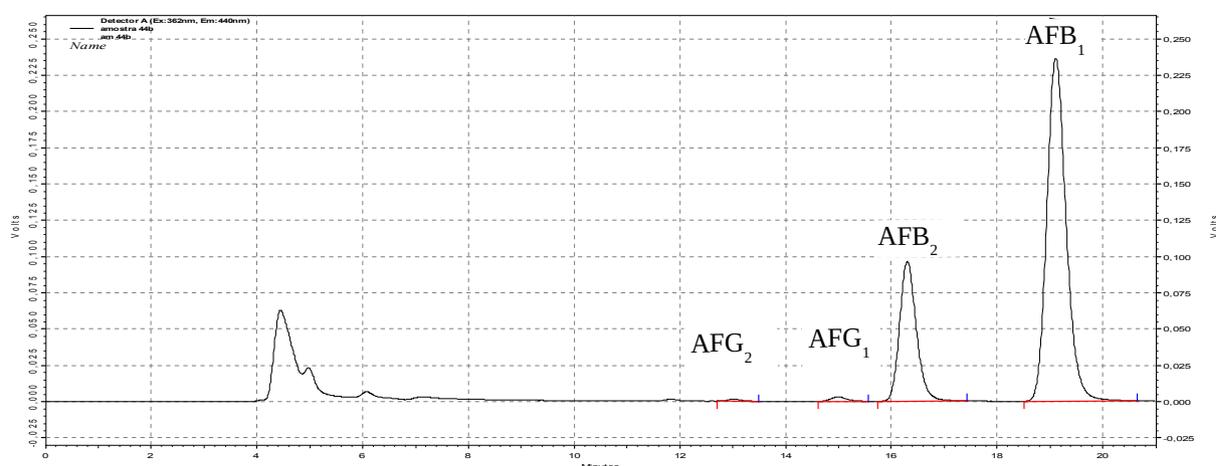
**Tabela.** Resultados do estudo de incidência de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> em amostras de amendoins

| Ano       | Detectado (n) | Intervalo de concentração (µg/kg) | Concentração média (µg/kg) |
|-----------|---------------|-----------------------------------|----------------------------|
| 1994*     | 2/10          | 11-39                             | 25                         |
| 1995*     | 4/13          | 27-995                            | 511                        |
| 1996*     | 6/12          | 49-1556                           | 803                        |
| 1997*     | 3/10          | 163-522                           | 317                        |
| 1998*     | 2/3           | 301-372                           | 336                        |
| 1999*     | 8/12          | 54-968                            | 307                        |
| 2000*     | 4/10          | 50-423                            | 236                        |
| 2001*     | 3/12          | 15-101                            | 48                         |
| 2016-17** | 21/56         | 0,09-60,40                        | 25                         |

\*soma de AFB<sub>1</sub> e AFG<sub>1</sub>, amostras analisadas por CCD; \*\*soma de AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, amostras analisadas por CLAE; n = número de amostras analisadas



(a)



(b)

**Figura.** Cromatogramas das amostras de amendoim. (a) amostra de amendoim livre de AFs e (b) naturalmente contaminados com AFs

A recuperação média das AFs utilizando o método de CLAE, nos níveis adicionados variando de 0,64 a 10 µg/kg, foi de 88,6%, e a média do desvio padrão foi de 7,9%. O LD foi de 0,04 µg/kg para AFB<sub>1</sub>, 0,02 µg/kg para AFG<sub>1</sub> e 0,01 µg/kg para AFG<sub>2</sub> e AFB<sub>2</sub>, e foram determinados usando o valor médio das concentrações de AFs das amostras livres de AFs mais 2 desvios padrão. O limite de quantificação foi de 0,15 µg/kg para AFB<sub>1</sub>, 0,07 µg/kg para AFG<sub>1</sub> e 0,04 µg/kg para AFG<sub>2</sub> e AFB<sub>2</sub> (cerca de 3 vezes o LD).

Os resultados dos níveis de AFs totais nas amostras de amendoins coletadas em 2016-17 são mostrados na [Tabela](#). Apesar dos dados terem sido obtidos com métodos diferentes, com diferenças nos limites de detecção e quantificação,

podemos observar que houve uma diminuição na incidência e nos níveis de AFs com relação ao período de 1994-2001. Vinte e uma amostras (38%) apresentaram contaminação de AFs em níveis variando de 0,09 a 60,40 µg/kg e 7 amostras (13%) em níveis acima de 20 µg/kg, limite máximo tolerado pela legislação brasileira<sup>19</sup>.

Durante este intervalo que separa os 2 períodos do estudo alguns fatores podem ter contribuído para a diminuição nos níveis de AFs nos amendoins, como por exemplo: o desenvolvimento de técnicas mais sofisticadas para a análise de AFs em amendoins, o que permitiu a quantificação destas toxinas em níveis mais baixos, com maior precisão e exatidão, melhorando o seu monitoramento, tanto pela própria indústria como pelos órgãos

fiscalizadores; alteração do valor máximo tolerado de AFs pela legislação, de 30 µg/kg (soma das AFB<sub>1</sub> e AFG<sub>1</sub>)<sup>18</sup> para 20 µg/kg (soma das AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>)<sup>20</sup>; e em 2001 a Associação Brasileira das Indústrias de Chocolates, Amendoim e Balas (ABICAB), implementou o Programa Pró-Amendoim. As empresas que possuem o selo “Qualidade Certificada Pró-Amendoim-ABICAB”, atendem os requisitos da legislação em relação aos níveis de aflatoxina nos produtos que fabricam à base de amendoim<sup>21</sup>. Segundo Facca e Dalzoto<sup>22</sup>, esta diminuição nos níveis de AFs em amendoim deve-se, principalmente, às estratégias adotadas pelos produtores para manter a qualidade do processo de produção destes alimentos.

O estudo foi realizado com diversos tipos de amendoim, amendoim cru com e sem casca e os amendoins processados: torrado, japonês, salgado, crocante, doce, com chocolate e confeitado. Todos estes amendoins processados passaram por um aquecimento através da torração. No período de 1996 a 2001, 56% de amendoim cru e 27% do amendoim processado apresentaram contaminação por AFs, e no período de 2016-2017, 46% de amendoim cru e 31% do amendoim processado apresentaram contaminação por AFs, e esta diferença na quantidade de amostras contaminadas mostra que existe uma tendência de diminuição de AFs com o processamento do amendoim. Este resultado está de acordo com a revisão publicada por Kaushik<sup>23</sup> a respeito dos efeitos dos processamentos sobre as micotoxinas em grãos, o autor cita que geralmente os processos que utilizam as temperaturas mais elevadas ocasionam a redução na concentração de micotoxinas. Porém, mais estudos precisam ser realizados, pois existem controvérsias sobre este assunto.

Existem estudos no Brasil os quais mostram que a incidência de AFs em amendoim continua sendo um problema de saúde pública. Santos et al<sup>10</sup> pesquisaram a presença de aflatoxinas em 104 amostras de amendoim comercializados no município de Maringá, 24% das amostras estavam contaminadas, com média de concentração de 13,4 µg/kg, sendo que 20 amostras estavam com níveis acima do máximo tolerado pela legislação brasileira. Martins et al<sup>11</sup> coletaram 119 amostras de amendoim no Estado de São Paulo, 12 amostras

apresentavam contaminação por AFs na faixa de 0,3 – 100 µg/kg. Silva et al<sup>13</sup> detectaram a presença de aflatoxinas em amendoim cru e paçoca na cidade de Marília, e 5,3% das amostras de amendoim cru apresentaram AFB<sub>1</sub> acima do valor permitido pela legislação. Outro estudo sobre a incidência de AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub> foi conduzido por Moreira et al<sup>12</sup>, das 23 amostras analisadas 3 eram amendoins. Os autores encontraram 1 amostra de amendoim contaminada com AFB<sub>1</sub>, 317,1 e AFB<sub>2</sub>, 317,1 µg/kg, valor superior ao tolerado pela legislação.

## CONCLUSÃO

Embora os resultados deste estudo indicaram uma diminuição da concentração das AFs, a contaminação por estas toxinas permanece um problema de saúde pública na região Nordeste do Estado de São Paulo.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

1. Council for Agricultural Science and Technology (CAST). *Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems*. Ames (IA): CAST; 2003.
2. International Agency for Research on Cancer (IARC). *Evaluation of carcinogenic risks of chemicals to humans. Some naturally occurring substances. Food items and constituents. Heterocyclic aromatic amines and mycotoxins*. Monographs, vol. 56. Lyon (France): IARC; 1993.
3. Cui A, Hua H, Shao T, Song P, Kong Q, Luo T et al. Aflatoxin B<sub>1</sub> induces Src phosphorylation and stimulates lung cancer cell migration. *Tumour Biol*. 2015;36(8):6507-13. <https://dx.doi.org/10.1007/s13277-015-3341-2>
4. Hernandez-Vargas H, Castelino J, Silver MJ, Dominguez-Salas P, Cros MP, Durand G et al. Exposure to aflatoxin B<sub>1</sub> in utero is associated with DNA methylation in white blood cells of infants in The Gambia. *Int J Epidemiol*. 2015;44(4):1238-48. <https://doi.org/10.1093/ije/dyv027>

5. Kew MK. Aflatoxins as a Cause of Hepatocellular Carcinoma. *J Gastrointestin Liver Dis*. 2013;22(3):305-10.
6. Liu Y, Chang CCH, Marsh GM, Wu F. Population attributable risk of aflatoxin-related liver cancer: systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2012;48(14):2125-36. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.02.009>
7. Kamika I, Takoy LL. Natural occurrence of Aflatoxin B<sub>1</sub> in peanut collected from Kinshasa, Democratic Republic of Congo. *Food Control*. 2011;22(11):1760-4. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.04.010>
8. Mutegi CK, Ngugi HK, Hendriks SL, Jones RB. Prevalence and factors associated with aflatoxin contamination of peanuts from Western Kenya. *Int J Food Microbiol*. 2009;130(1):27-34. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12.030>
9. Kouadio JH, Lattanzio VM, Ouattara D, Kouakou B, Visconti A. Assessment of mycotoxin exposure in Côte d'Ivoire (Ivory Coast) through multi-biomarker analysis and possible correlation with food consumption patterns. *Toxicol Int*. 2014;21(3):248-57. <https://doi.org/10.4103/0971-6580.155336>
10. Santos AC, Souza AA, Silva MV, Nerilo SB, Souza APM, Bando E et al. Occurrence and exposure assessment to aflatoxins in peanuts commercialized in the northwest of Parana, Brazil. *Ciênc Rural*. 2018 48(6):e20170615. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20170615>
11. Martins LM, Sant'Ana AS, Fungaro MHP, Silva JJ, Nascimento MS, Frisvad JC et al. The biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins in the Brazilian peanut production chain. *Food Res Int*. 2017;94:101-7. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.02.006>
12. Moreira MF, Oliveira TR, Vieira IGP, Freire FCO, Silva SC, Ribeiro LM et al. Occurrence of fungi and aflatoxins B in nuts and products marketed the Brazilian northeastern regions. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2016;75:e1698. Disponível em: [http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/10/rial75\\_completa/artigos-separados/1698.pdf](http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/10/rial75_completa/artigos-separados/1698.pdf)
13. Silva RA, Yakamoto IT, Ferreira LO, Marques LRM. Detecção e quantificação de aflatoxinas em amostras de grãos de amendoim e derivados comercializados na região de Marília- SP, 2002-2009. *Braz J Food Nutr* 2013;24(1):61-4. Disponível em: <http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/view/2030/2030>
14. Soares LM, Rodriguez-Amaya DB. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. *J Assoc Off Anal Chem*. 1989;72(1):22-6.
15. Iha MH, Okada IA, Briganti RC, Mini CA, Trucksess MW. Aflatoxins in Brazilian peanut confection. *J AOAC Int*. 2016;99(3):830-4. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.15-0256>
16. Berthiller F, Cramer B, Iha MH, Krska R, Lattanzio VMT, MacDonald S et al. Developments in mycotoxin analysis: an update for 2016-2017. *World Mycotoxin J*. 2018;11(1):5-32. <https://doi.org/10.3920/WMJ2017.2250>
17. AOAC International. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. 18th ed., Gaithersburg (MD); 2010, Chapter 49, p. 1-51.
18. Ministério da Saúde (BR). Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Resolução - CNNPA nº 34, de 1976. Fixar para os alimentos, tolerâncias de 30ppb (trinta partes por bilhão) para as Aflatoxinas, calculada pela soma dos conteúdos das aflatoxinas B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub>. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 19 jan 1977. Seção 1.
19. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, Seção 1(46):66.
20. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 7, 274, de 15 de outubro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico Sobre Limites Máximos de Aflatoxinas Admissíveis no Leite, no Amendoim, no Milho, constante do Anexo desta Resolução. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, [acesso 2019 Ago 27]. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2002/res0274\\_15\\_10\\_2002.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2002/res0274_15_10_2002.html)
21. Associação Brasileira da Indústria de Chocolates, Amendoim e Balas. A ABICAB e o Programa Pró-Amendoim. [acesso 2019 Ago 27]. Disponível em: <http://proamendoim.com.br/>
22. Facca MCL, Dalzoto PR. Aflatoxinas: um perfil da situação do amendoim e derivados no cenário brasileiro. *Biológico*. 2010;72(1):25-9.
23. Kaushik G. Effect of processing on mycotoxin content in grains., *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2015;55(12):1672-83. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.701254>



# Correlação estatística entre parâmetros microscópicos e microbiológicos em pimenta-do-reino moída (*Piper nigrum* L.) comercializada em Minas Gerais

## Statistical correlation between microscopic and microbiological parameters in ground black pepper (*Piper nigrum* L.) sold in Minas Gerais

RIALA6/1785

Flaviane Cristina Lopes MATOSINHOS<sup>1</sup>, Inês Helena Tristão de OLIVEIRA<sup>1</sup>, Juliane Rodrigues SILVA<sup>1</sup>, Gracielle Alves CARLOS<sup>2</sup>, Leandro Leão FAULA<sup>2</sup>, Marcos Paulo Gomes MOL<sup>3</sup>, Virgínia del Carmen Troncoso VALENZUELA<sup>1\*</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Serviço de Microscopia de Produtos, Instituto Octávio Magalhães, Fundação Ezequiel Dias, Rua Conde Pereira Carneiro, 80, Gameleira, Belo Horizonte, MG, Brasil, CEP: 30510-010. Tel: 31 3314 4681. E-mail: [virginia.delcarmen@funed.mg.gov.br](mailto:virginia.delcarmen@funed.mg.gov.br)

<sup>2</sup>Serviço de Microbiologia de Produtos, Instituto Octávio Magalhães, Fundação Ezequiel Dias

<sup>3</sup>Divisão de Ciência e Inovação, Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento, Fundação Ezequiel Dias

Recebido: 01.11.2019 - Aceito para publicação: 23.04.2020

### RESUMO

A ausência de Boas Práticas de Fabricação durante a colheita, processamento e manuseio da pimenta-do-reino pode acarretar a contaminação do produto com sujidades microscópicas e microrganismos. Foram analisadas 227 amostras de pimenta-do-reino, comercializadas em Minas Gerais, coletadas entre 2008 e 2018, quanto à presença de fragmentos de pelo de roedor e de insetos, coliformes a 45°C ou *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. Para verificar se havia correlação entre os contaminantes, foi empregado método estatístico de regressão linear múltipla. As análises microscópicas evidenciaram presença de fragmentos de pelo de roedor e de insetos em 26,0% e 30,5% das amostras, respectivamente, em valores superiores ao limite tolerado pela RDC 14/2014. Quanto às análises microbiológicas, 10% das amostras apresentaram coliformes a 45°C ou *E. coli* acima dos limites tolerados pela RDC 12/2001 e em 8,8% das amostras foi detectada presença de *Salmonella* spp. A avaliação estatística mostrou que houve correlação entre presença de fragmentos de insetos e de pelos de roedor e a contaminação por *Salmonella* spp. em pimenta-do-reino. Os resultados demonstraram a importância das análises microscópica e microbiológica simultaneamente para detecção dos contaminantes presentes bem como das possíveis relações existentes entre eles e a melhor compreensão dos fatores que favorecem as contaminações.

**Palavras-chave.** controle de qualidade, *Salmonella*, microbiologia de alimentos, análise de alimentos, pelo de roedor, insetos.

### ABSTRACT

The absence of Good Manufacturing Practices during harvesting, processing and handling of black pepper can lead to contamination of the product with microscopic dirt and microorganisms. Two hundred and twenty seven black pepper samples, commercialized in Minas Gerais, collected between 2008 and 2018, were analyzed for the presence of rodent and insect fragments, coliforms at 45°C or *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. To verify whether there was a correlation between the contaminants, a statistical method of multiple linear regression was used. Microscopic analysis showed the presence of rodent and insect fragments in 26.0% and 30.5% of the samples, respectively, in values above the limit tolerated by RDC14/2014. As for the microbiological analysis, 10% of the samples presented coliforms at 45°C or *E.coli* above the limits tolerated by the RDC 12/2001 and in 8.8% of the samples *Salmonella* spp. were detected. The statistical evaluation showed that there was a relationship between the presence of insect fragments and rodent hair and contamination by *Salmonella* spp. in black pepper. The results demonstrated the importance of simultaneous microscopic and microbiological analysis to detect the contaminants present, as well as the possible relationships between them and better understanding of the factors that favor contamination.

**Keywords.** quality control, *Salmonella*, food microbiology, food analysis, rodent hair, insects.

## INTRODUÇÃO

A pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) é originária da Índia e cultivada em várias regiões tropicais e subtropicais do planeta, sendo o Brasil um dos maiores produtores. É a mais importante especiaria comercializada mundialmente, sendo usada em larga escala como condimento em indústrias de carnes e conservas e na indústria cosmética e de aromas. Na indústria alimentícia, pode ser utilizada na forma de grãos inteiros, moídos, ou misturados com outros condimentos<sup>1</sup>.

A cadeia produtiva da pimenta-do-reino, bem como de outras especiarias, geralmente começa com pequenos produtores, que fazem a secagem do produto a céu aberto, deixando-o exposto à poeira, insetos, excretas de animais e outras sujidades, caso não sejam adotadas práticas de higiene. Depois de secas, as especiarias geralmente passam por múltiplas etapas de estocagem, processamento, empacotamento e re-empacotamento, que podem durar anos. Sendo assim, patógenos podem ser introduzidos em qualquer ponto ao longo da cadeia de produção e distribuição, se as Boas Práticas de Fabricação não forem seguidas<sup>2</sup>.

Além de análises microbiológicas para avaliação da qualidade de condimentos e especiarias, deve-se recorrer a testes macroscópicos, microscópicos, físicos e químicos, para a comprovação de eventuais adulterações<sup>3</sup>. Diferentes técnicas analíticas espectroscópicas, análises de espectrometria de massa, diversos tipos de cromatografia gasosa ou líquida e diferentes técnicas de análise de DNA têm sido empregadas na detecção de adulterações não intencionais e fraudes em ervas e especiarias<sup>4</sup>.

A presença de sujidades representa um impacto negativo para a qualidade do alimento, com diminuição do sabor e aroma do produto, associado a uma redução da sua vida de prateleira, bem como, à repercussão negativa da marca no mercado<sup>5,6</sup>. Ressalta-se que a pimenta-do-reino é muitas vezes utilizada diretamente sobre os alimentos prontos, sem nenhum processamento adicional que elimine os contaminantes presentes, sendo, portanto capaz de favorecer potencial risco de saúde ao consumidor<sup>7</sup>.

Até 2013, as análises macro e microscópica da pimenta-do-reino eram respaldadas pela Resolução RDC ANVISA/MS n° 175/2003<sup>8</sup>. Atualmente, estas são orientadas pela Resolução RDC ANVISA/MS n° 14/2014<sup>9</sup> que dispõe sobre matérias estranhas macroscópicas e microscópicas em alimentos e bebidas, seus limites de tolerância e dá outras providências. Já os parâmetros microbiológicos sanitários, para alimentos em geral, são contemplados pela Resolução RDC ANVISA/MS n° 12/2001<sup>10</sup>.

Considerando os riscos oferecidos pela utilização em larga escala de pimenta-do-reino contaminada por sujidades e microrganismos patogênicos, tanto na culinária familiar quanto na indústria alimentícia, esse trabalho teve por objetivo avaliar a série histórica de contaminação microscópica e microbiológica desse produto, de acordo com a legislação sanitária, bem como verificar a correlação entre os contaminantes detectados, a partir das análises de amostras comercializadas em Minas Gerais no período de 2008-2018.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção das amostras

Por meio das ações da Vigilância Sanitária Estadual, 227 amostras de pimenta-do-reino em pó de 83 marcas diferentes, foram coletadas no varejo de municípios em Minas Gerais, entre os anos 2008 e 2018. Após a coleta, as amostras foram encaminhadas à Fundação Ezequiel Dias (FUNED) para análises microscópica de sujidades leves e microbiológica (contagem de coliformes a 45°C ou *Escherichia coli* e *Salmonella* spp.).

### Análises microscópicas e microbiológicas

Para a pesquisa de matérias estranhas microscópicas utilizou-se o método de flutuação n° 972.40A (AOAC, 2016)<sup>11</sup>. A determinação de coliformes a 45°C foi realizada por meio do método de Número Mais Provável (NMP), de acordo com APHA<sup>12</sup>. Alternativamente à contagem de coliformes a 45°C, utilizou-se a contagem de *Escherichia coli* pelos métodos rápidos Petrifilm® EC (AOAC, 2016)<sup>13</sup> e SimPlate® EC (AOAC, 2016)<sup>14</sup>. Para a pesquisa de *Salmonella* spp. empregou-se método de triagem ELFA (*Enzyme Linked*

Fluorescent Assay), no sistema automatizado VIDAS® (AOAC, 2016)<sup>15</sup> e método confirmatório tradicional (BAM, 2018)<sup>16</sup>.

#### Análises estatísticas

Utilizaram-se análises univariadas, por meio da seleção dos potenciais preditores, para explicar a ocorrência dos desfechos (presença de *Salmonella* e presença de coliformes). O nível de significância para seleção dos potenciais preditores foi de 25%. Na análise univariada para as variáveis categóricas foi utilizado o teste exato de Fisher e teste Qui-Quadrado<sup>17</sup>, enquanto que para as variáveis quantitativas foi utilizado o teste de Mann-Whitney<sup>18</sup>. Quando utilizado o teste exato de Fisher, os intervalos de confiança para as razões de chance foram ajustados para pequenas amostras<sup>19</sup>.

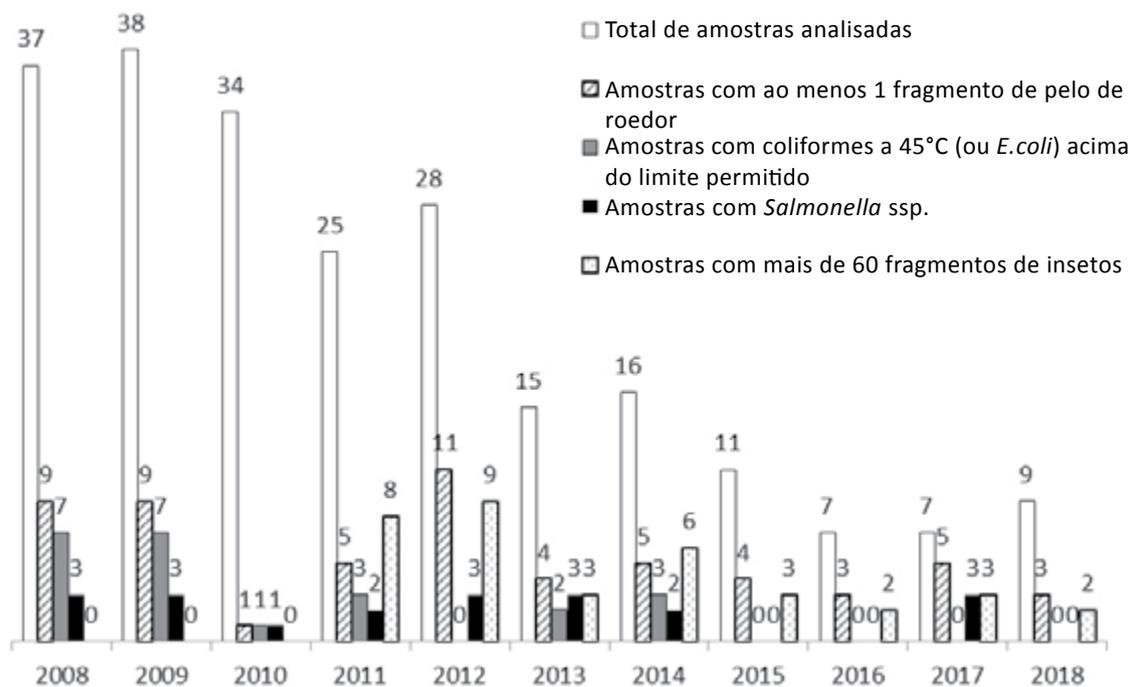
A partir da seleção realizada pelas análises univariadas foi ajustada uma regressão logística<sup>17</sup> com todas variáveis selecionadas, sendo aplicado, em seguida, o método Backward<sup>20</sup> e adotado um nível de 10% de significância. A qualidade do ajuste da regressão logística foi verificada por meio do teste de Hosmer-Lemeshow<sup>21</sup> e pseudo R<sup>2</sup> de Nagelkerke<sup>22</sup>. O software utilizado na análise foi o R versão 3.5.3.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Análises microscópicas e microbiológicas

A **Figura 1** apresenta a distribuição, por ano, do número de amostras de pimenta-do-reino analisadas no período de 2008 a 2018, contendo um ou mais fragmentos de pelo de roedor, mais de 60 fragmentos de insetos, coliformes a 45°C ou *E. coli* acima do limite tolerado, e presença de *Salmonella* spp. Vale ressaltar que no ano de 2016, foram realizadas análises microbiológicas apenas para detecção de coliformes a 45°C, todas com resultado satisfatório. De 2011 em diante, os resultados de fragmentos de insetos são apresentados de acordo com o limite máximo tolerado pela RDC ANVISA/MS 14/2014<sup>9</sup>, ou seja, presença de mais de 60 fragmentos de insetos.

Os dados revelam que, apesar da redução no número de amostras analisadas ao longo dos anos, de modo geral, houve um aumento na proporção de amostras em desacordo com os limites dos parâmetros microscópicos e microbiológicos avaliados, indicando que as condições higiênico-sanitárias permaneceram deficientes no processo produtivo.

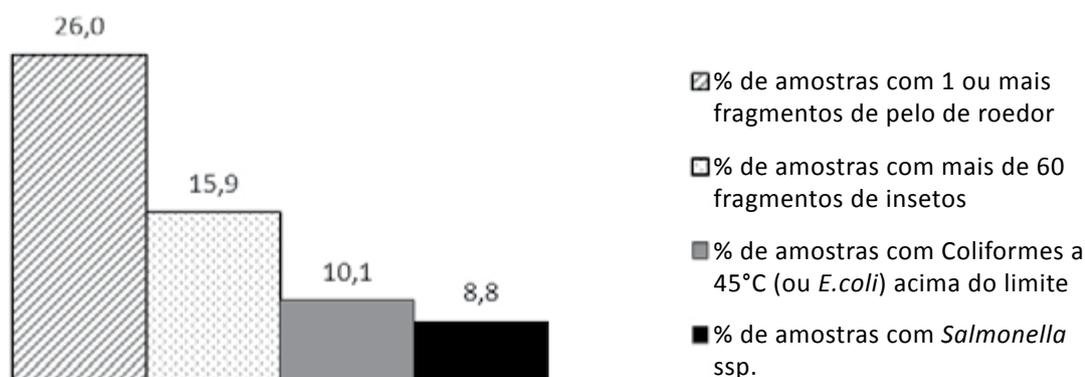


**Figura 1.** Distribuição das amostras de pimenta-do-reino analisadas no período de 2008 a 2018 de acordo com os parâmetros microscópicos e microbiológicos avaliados

Durante a vigência da RDC ANVISA/MS nº 175/03<sup>8</sup>, os anos de 2008, 2009 e 2012 foram aqueles com maiores prevalências de amostras contendo fragmentos de pelo de roedor, ressaltando que nesse período, a legislação preconizava a ausência de qualquer matéria estranha com risco à saúde no produto. A partir de 2014, quando passa-se a tolerar a presença de 1 fragmento de pelo de roedor em 50 g de pimenta-do-reino de acordo com a RDC ANVISA/MS nº 14/2014<sup>9</sup>, 65% das 20 amostras analisadas que apresentaram pelo de roedor continham apenas um fragmento sendo, portanto, consideradas satisfatórias. Embora, a nova resolução RDC ANVISA/MS 14/2014<sup>9</sup> tenha se tornado mais tolerante quanto aos critérios microscópicos, o que se observou em 2016 e 2017 foi a permanência de elevado percentual (28,6 %) de amostras reprovadas por conter mais de um pelo de roedor. A presença de fragmentos de pelo de roedor no alimento indica que houve contato com roedores, importantes vetores mecânicos de diversos patógenos causadores de doenças ao homem<sup>23</sup>. Santos et al<sup>24</sup> comprovaram essa associação, após a identificação concomitante de *Salmonella* spp. e pelo de roedor em amostras de pimenta-do-reino.

Quanto à presença de fragmentos de insetos, a RDC ANVISA/MS nº 14/2014<sup>9</sup> atualmente em vigor, estabelece um limite de 60 fragmentos de insetos em 50g de amostra de pimenta-do-reino. Anteriormente, durante a vigência da RDC ANVISA/MS 175/2003<sup>8</sup>, apenas amostras com fragmentos de insetos considerados de risco à saúde, como baratas e moscas, eram consideradas insatisfatórias. A partir de 2011, o laboratório passou a registrar a contagem de fragmentos de insetos nas amostras analisadas, todavia não se observou um aumento significativo no percentual de amostras reprovadas após esta modificação. Isso se deve ao fato de que só foram encontrados fragmentos de insetos próprios da cultura e em quantidade permitida e não foram encontrados fragmentos de insetos considerados de risco à saúde em todo o período.

A análise dos parâmetros microscópicos das 227 amostras de pimenta-do-reino demonstrou que 26% tinham um ou mais fragmentos de pelo de roedor e 15,9% continham mais de 60 fragmentos de insetos, valor limite estabelecido pela RDC ANVISA/MS nº 14/2014<sup>9</sup> para este contaminante (**Figura 2**).



**Figura 2.** Percentuais totais de amostras de pimenta-do-reino avaliadas de acordo com os parâmetros microscópicos e microbiológicos no período de 2008 a 2018 (exceto para amostras com mais de 60 fragmentos de insetos, cujo período foi de 2011 a 2018)

Fonte: Funed, Belo Horizonte-MG

Estudos realizados em amostras de pimenta-do-reino, entre outros condimentos, coletadas pelo FDA nos Estados Unidos num período de 3 anos mostraram um alto índice de contaminação por

matérias estranhas<sup>3</sup>. Estes autores verificaram que das 1.523 amostras de pimenta-do-reino analisadas, 98,4% estavam contaminadas com fragmentos de insetos e 20%, com pelos de roedor. Resultados

obtidos a partir de pimenta-do-reino coletada no estado de São Paulo revelaram que 98,5% das amostras analisadas continham fragmentos de insetos e 23,2% apresentaram pelos de roedor, além de outras sujidades<sup>25</sup>. A avaliação de 75 amostras de pimenta-do-reino coletadas em São José do Rio Preto evidenciou que 30,67% continham pelos de roedor e 92% apresentaram fragmentos de insetos, sendo que em 14 delas a quantidade detectada foi superior a 60 fragmentos<sup>24</sup>. Na avaliação das condições higiênicas da pimenta-do-reino em pó, coletadas na cidade de São Paulo, 100% das amostras analisadas apresentaram fragmentos de insetos<sup>26</sup>. No presente estudo foram encontrados fragmentos de pelo de roedor em 26% das amostras, valor bastante próximo aos encontrados por Graciano et al<sup>25</sup> (23,2%), Santos et al<sup>24</sup> (30,67%) e por Gecan et al<sup>3</sup> (20%). Quanto ao número de fragmentos de insetos, registrou-se 15,9% de amostras com mais de 60 fragmentos de insetos, sem considerar as amostras com qualquer número de fragmentos de insetos. Isso explica o baixo índice de fragmentos de insetos comparados com os estudos anteriores. Entretanto, 96% de todas as amostras analisadas nesse período (2008 a 2011) continham fragmentos de insetos, demonstrando que a frequência é elevada e constante no produto analisado neste trabalho e também pelos outros autores citados acima.

Diversos trabalhos relatam a presença de coliformes a 45°C e *Salmonella* spp. em pimenta-do-reino. Estudo realizado por Santos et al<sup>24</sup>, na região de São José do Rio Preto (SP), no qual foram analisadas 75 amostras de pimenta-do-reino moída de 19 marcas diferentes, relatou a presença de *Salmonella* spp. e de coliformes a 45°C em 14,67% e 33,33% das amostras, respectivamente. Moreira et al<sup>27</sup> verificaram 18,2% das amostras analisadas de pimenta-do-reino contaminadas com *Salmonella* spp.; 36,3%, com coliformes e 60,6%, com bactérias mesófilas. Neto et al<sup>28</sup> relataram a presença de *Salmonella* spp. (10,5%) e coliformes a 45°C (18,4%) em amostras de pimenta-do-reino e Oliveira e Teshima<sup>29</sup> verificaram que 66,7% das amostras de pimenta-do-reino analisadas encontravam-se contaminadas por *Salmonella* spp. Silva et al<sup>30</sup> reportaram a presença deste patógeno em 57% das amostras de pimenta-

do-reino coletadas em uma feira tradicional de Campina Grande. Michelin et al<sup>31</sup> avaliaram a contaminação por enteropatógenos em pimenta-do-reino e detectaram a presença de coliformes a 45°C, com identificação de *Escherichia coli* e de *Salmonella* spp. No presente estudo, evidenciou-se que 8,8% das amostras estavam contaminadas com *Salmonella* spp. e 10,1% continham coliformes a 45°C ou *E. coli* em níveis acima dos limites tolerados pela RDC ANVISA/MS n°12/2001<sup>10</sup> (**Figura 2**).

A detecção de *Salmonella* spp. em pimenta-do-reino moída é um dado preocupante, já que esse patógeno é capaz de sobreviver em amostras desse produto por até um ano<sup>2</sup>. A porcentagem relativamente baixa de amostras contendo *Salmonella* spp. observada no presente estudo (8,8%) pode estar relacionada ao fato destas amostras terem sido coletadas diretamente no comércio e terem um prazo de validade muito extenso, de aproximadamente dois anos. De acordo com Germano<sup>32</sup> o tempo de estocagem pode interferir no nível de contaminação microbiana, como ficou demonstrado com amostras frescas de pó para *curry*, contendo  $5,4 \times 10^7$  bactérias/g que, após dois meses de estocagem em temperatura ambiente, apresentaram contagem de  $4,0 \times 10^5$  bactérias/g. A pimenta-do-reino, apesar de possuir óleos essenciais com conhecida ação antimicrobiana *in vitro*, apresenta alguns fatores que dificultariam esta ação direta, tais como baixa atividade de água, alta contaminação por bactérias Gram-negativas e capacidade de interferência do tempo de estocagem na contagem final de bactérias, após estocagem à temperatura ambiente<sup>33</sup>. Estes fatores podem explicar o isolamento de *Salmonella* spp., coliformes a 45°C ou *Escherichia coli* em amostras de pimenta-do-reino.

Tendo em vista a importância e a carência de trabalhos de pimenta-do-reino que tenham realizado as mesmas análises simultaneamente e em longos períodos, o presente estudo destaca-se pela avaliação da série histórica de monitoramento de 10 anos. Além disso, os resultados do mesmo corroboram com os encontrados nos estudos citados anteriormente<sup>24-28</sup>, evidenciando a importância do monitoramento da qualidade sanitária desse alimento, bem como indicando a necessidade de mudanças nas práticas agrícolas

e de beneficiamento da pimenta-do-reino para a obtenção de um produto de melhor qualidade, sem risco à saúde do consumidor.

#### Análise estatística

A análise de correlação, por meio da regressão logística, entre a presença de “pelos de roedor”, o “número de fragmentos de insetos” e a influência destes na presença de *Salmonella* spp. revelou uma associação positiva (Tabela). Observou-se que a cada unidade de pelo que se acrescenta, aumenta a chance de encontrar contaminação por *Salmonella* spp. em 1,148 vezes, enquanto que para cada unidade de número de fragmentos de insetos que se acrescenta, aumenta-se a chance de encontrar *Salmonella* spp. em 0,005 vezes. Pelo método de Backward, as variáveis “presença de coliformes” e “satisfatório para presença de insetos” foram eliminadas, nesta sequência, devido à baixa associação com o desfecho.

**Tabela.** Resultado da regressão logística apontando as relações das variáveis significativas.

|                   | Estimado | Erro padrão | Valor z | Valor p |
|-------------------|----------|-------------|---------|---------|
| (Intercepto)      | -3,088   | 0,585       | -5,276  | 0,000   |
| Presença de pelos | 1,148    | 0,679       | 1,692   | 0,091   |
| Número de insetos | 0,005    | 0,004       | 1,254   | 0,210   |

Pseudo R<sup>2</sup> (Nagelkerke) = 10,43%; Valor-p (Hosmer Lemeshow) = 0,86

As variáveis “presença de pelos de roedor” e “número de insetos” foram capazes de explicar 10,43% da presença de *Salmonella* spp. nas amostras. Pelo teste de Hosmer-Lemeshow o modelo está adequado (valor-p > 0,05), portanto, os dados obtidos nesse estudo sugerem que a presença de pelo de roedor e fragmentos de insetos aumentam a probabilidade de se encontrar *Salmonella* spp. em pimenta-do-reino. A presença de pelos de roedor em um alimento sugere contaminação fecal e uma fonte potencial de doenças como a leptospirose, salmonelose, pestes e viroses, entre outras<sup>23,34</sup>.

As análises estatísticas, juntamente com a técnica de regressão logística, demonstraram uma boa aplicabilidade para investigar relações entre indicadores de qualidade e alimento, sendo esta a maior contribuição do estudo. Estas são

comumente utilizadas em epidemiologia, quando são investigados determinantes do processo saúde-doença para mensurar as relações lineares entre duas ou mais variáveis<sup>35</sup>. Na avaliação de parâmetros de qualidade em alimentos essa metodologia foi utilizada no estudo de Aleixandre-Tudó et al<sup>36</sup>, que avaliaram a correlação da qualidade sensorial de vinhos com parâmetros de qualidade das uvas.

## CONCLUSÃO

As amostras de pimenta-do-reino moída apresentaram um alto índice de matérias estranhas consideradas de risco à saúde (fragmentos de pelo de roedor) e presença de contaminantes microbiológicos (*Salmonella* spp. e coliformes a 45°C acima do limite tolerado), representando potencial risco à saúde do consumidor. Quanto à presença de fragmentos de insetos, os resultados das análises mostraram possíveis falhas das Boas Práticas de Fabricação. A análise estatística dos contaminantes encontrados, diferencial do estudo, demonstrou uma correlação entre a presença de fragmentos de insetos e de pelos de roedor e a probabilidade de contaminação por *Salmonella* spp. em pimenta-do-reino moída e alerta para a importância da análise simultânea dos resultados microbiológicos e microscópicos para uma melhor compreensão dos fatores que favorecem as contaminações. Os resultados deste trabalho confirmam a importância do monitoramento contínuo da pimenta-do-reino moída para garantir a oferta de um produto de melhor qualidade sanitária ao consumidor.

## REFERÊNCIAS

1. Duarte MLR, Poltronieri MC, Chu EY, Oliveira RF, Lemos OF, Benchimol RL et al. A cultura da pimenta-do-reino/Embrapa Amazônia Oriental. 2.ed. rev. Amp. Brasília(DF): Embrapa Informação Tecnológica; 2006. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/140722/1/PLANTAR-Pimernta-do-reino-2a-ed-3a-impresao-2013.pdf>
2. Keller SE, Van Doren JM, Grasso EM, Halik LA. Growth and survival of *Salmonella* in ground black pepper (*Piper nigrum*). *Food Microbiol.* 2013;34(1):182-8. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.12.002>

3. Gecan SJ, Bandler R, Glaze LE, Atkinson JC. Microanalytical quality of ground and unground marjoram, sage and thyme, ground allspice, black pepper and paprika. *J Food Prot*. 1986;49(3):216-21. Disponível em: <http://jfoodprotection.org/doi/pdf/10.4315/0362-028X-49.3.216>
4. Galvin-King P, Haughey SA, Elliot CT. Herb and spice fraud; the drivers, challenges and detection. *Food Control*. 2018;88:85-97. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.12.031>
5. Moy GG and Todd ECD. Foodborne diseases – Overview of chemical, physical, and other significant hazards. *In: Encyclopedia of Food Safety*, vol.1. Academic Press; 2014.p.243-252 Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/referencework/9780123786135/encyclopedia-of-food-safety>
6. Reinholds I, Bartkevics V, Silvis ICJ, Van Ruth SM, Esslinger S. Analytical techniques combined with chemometrics for authentication and determination of contaminants in condiments: A review. *J Food Compost Anal*. 2015;44:56-72. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.05.004>
7. Ristori CA, Pereira MAS, Gelli DS. Behavior of *Salmonella* Rubislaw on ground black pepper (*Piper nigrum* L.). *Food Control*. 2007;18:268-72. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.10.015>
8. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 175 de 8 de julho de 2003. Aprova o Regulamento Técnico de Avaliação de Matérias Macroscópicas e Microscópicas Prejudiciais à Saúde Humana em Alimentos Embalados. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 10 jul 2003. Seção 1(130):32. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2003/res0175\\_08\\_07\\_2003.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2003/res0175_08_07_2003.html)
9. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 14, de 28 de março de 2014. Dispõe sobre matérias estranhas macroscópicas e microscópicas em alimentos e bebidas, seus limites de tolerância e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 31 março 2014. Seção 1(61):58. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0014\\_28\\_03\\_2014.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0014_28_03_2014.pdf)
10. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 10 jan 2001. Seção 1(7):45. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2001/res0012\\_02\\_01\\_2001.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2001/res0012_02_01_2001.html)
11. AOAC Official Methods of Analysis. Extraneous Materials: Isolation N° 972.40 A (16.14.23). 20.ed.; 2016.
12. APHA. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 5.ed. Washington; 2015.
13. AOAC Official Methods of Analysis. Coliform and *Escherichia coli* counts in foods Chapter 17 N° 991.14, 20.ed.; 2016.
14. AOAC Official Method 2005.03 Detection and Confirmed Quantitation of Coliforms and *E.coli* in Foods, 20.ed.; 2016.
15. AOAC Official Method 2011.03. VIDAS® *Salmonella* (SLM) Easy Salmonella Method, 20.ed.; 2016.
16. Bacteriological Analytical Manual Online. Food and Drug Administration. Version: Chapter 5: *Salmonella*. 8.ed. Arlington: FDA; 2018. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bacteriological-analytical-manual-bam-chapter-5-salmonella>
17. Agresti A. Categorical data analysis. 2.ed. New York: Wiley; 2002.
18. Hollander M e Wolfe DA. Nonparametric Statistical Methods. New York: John Wiley & Sons; 1999.
19. Jewell NP. Statistics for Epidemiology. New York: Chapman & Hall /CRC; 2004.
20. Efron MA. Multiple regression analysis - Mathematical Methods for Digital Computers; Ralston A and Wilf HS (eds.). New York: Wiley; 1960.
21. Hosmer DW, Lemeshow S. Applied Logistic Regression. New York: Wiley; 2000.
22. Nagelkerke NJD. A note on a general definition of the coefficient of determination. *Biometrika*. 1991; 78(3): 691-2. Disponível em: [https://www.cesarzamudio.com/uploads/1/7/9/1/17916581/nagelkerke\\_n.j.d.\\_1991\\_-\\_a\\_note\\_on\\_a\\_general\\_definition\\_of\\_the\\_coefficient\\_of\\_determination.pdf](https://www.cesarzamudio.com/uploads/1/7/9/1/17916581/nagelkerke_n.j.d._1991_-_a_note_on_a_general_definition_of_the_coefficient_of_determination.pdf)

23. Silva ERA, Martini MH. The presence of rodent hair in food: a risk of human health. Proceedings of the 9th International Working Conference on Stored Product Protection; 2006. Disponível em: <http://spiru.cgahr.ksu.edu/proj/iwcspp/pdf2/9/6216.pdf>
24. Santos CCM, Graciano RAS, Peresi JTM, Ribeiro AK, Carvalho IS, Quirino GK et al. Avaliação dos padrões de identidade e qualidade da pimenta-do-reino comercializada na região de São José do Rio Preto, SP. 5º Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos; 1999; Foz de Iguaçu: Hig Aliment. 1999;13(61):101-4. Disponível em: <http://higienealimentar.com.br/61-2/>
25. Graciano RAS, Atui MB, Dimov NM. Avaliação das condições higiênico-sanitárias de cominho e pimenta do reino em pó comercializados em cidades do Estado de São Paulo, Brasil, mediante a presença de matérias estranhas. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2006;65(3):204-8. Disponível em: [http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/2000/rial65\\_3\\_completa/1090.pdf](http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/2000/rial65_3_completa/1090.pdf)
26. Atui MB, Castejon MJ, Yamashiro R, De Lucca T, Flinn PW. Condições higiênico-sanitárias da pimenta-do-reino em pó (*Piper nigrum* L.) com o emprego de duas diferentes técnicas para detecção de sujidades leves. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2009;68(1):96-101. Disponível em: [http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/2000/rial68\\_1\\_completa/1195.pdf](http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/2000/rial68_1_completa/1195.pdf)
27. Moreira PL, Lourenção TB, Pinto JPAN, Rall VLM. Microbiological quality of spices marketed in the city of Botucatu, São Paulo, Brazil. *J Food Prot*. 2009;72(2):421-4. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.2.421>
28. Neto MCV, Vieira CA, Ferreira ACB, Silva MCC, Valenzuela VCT, Matosinhos FCL et al. Qualidade microbiológica e microscópica de amostras comerciais de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.). *Gest Cienc Saude - Rev Fund Ezequiel Dias*. 2009;5(2):93-97.
29. Oliveira NEG, Teshima E. Avaliação de microrganismos patogênicos na pimenta-do-reino. V Congresso latino americano e XI Congresso brasileiro de higienistas de alimentos; abril de 2011; Salvador, BA.: Anais do V Congresso Latino Americano e XI Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos; 2011. p.1116 [resumo].
30. Silva JF, Melo BA, Leite DT, Cordeiro MFR, Pessoa EB, Barreto CF et al. Análise microbiológica de condimentos comercializados na feira central de Campina Grande – PB. *Agropecu Cient Semi-árido*. 2013;9(2):83-7. Disponível em: <http://revistas.ufcg.edu.br/acsa/index.php/ACSA/article/view/370/pdf>
31. Michelin AF, Araújo, MJ, Kimura, RS, Bronharo TM. Contaminação por enteropatógenos em pimenta-do-reino moída. *Bol Inst Adolfo Lutz*. 2016; 26(U): 1-3. Disponível em: [http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/bial/bial\\_26/26u\\_art-1.pdf](http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/bial/bial_26/26u_art-1.pdf)
32. Germano PML e Germano MIS. Higiene e vigilância sanitária de alimentos. São Paulo (SP): Livraria Varela; 2003.
33. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review *Int J Food Microbiol*. 2004;94(3):223-53. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
34. Zimmerman ML, Friedman SL. Identification of rodent filth exhibits. *J Food Sci*. 2000;65(8):1391-4. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb10618.x>
35. Hair-Jr JF, Black WC, Babin BJ, Anderson RE, Tatham MRL. Análise multivariada de dados. 6.ed. Porto Alegre(RS): Bookman; 2009.
36. Aleixandre-Tudó JL, Alvarez I, García MJ, Lizama V, Aleixandre JL. Application of multivariate regression methods to predict sensory quality of red wines. *Czech J Food Sci*. 2015;33(3):217-27. <https://doi.org/10.17221/370/2014-CJFS>



# Esponjas de banho: promovem limpeza ou podem ser reservatório e veículo de transmissão de microrganismos?

## Bath sponges: promote cleaning or can be reservoirs and vehicles in the transmission of microorganisms?

RIALA6/1787

Eliandra Mirlei ROSSI<sup>1</sup>, Jéssica POSSAMAI<sup>1</sup>, Jessica Fernanda Barreto HONORATO<sup>1</sup>

\*Endereço para correspondência: Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico em Microbiologia, Universidade do Oeste de Santa Catarina, Rua Oiapoc, 211, Bairro Agostini, São Miguel do Oeste, SC, Brasil, CEP: 89900-000. Tel: 055 49 3631 1066. E-mail: [eliandra\\_bio@yahoo.com.br](mailto:eliandra_bio@yahoo.com.br)

Recebido: 28.06.2019 - Aceito para publicação: 23.08.2020

### RESUMO

As esponjas de banho podem carrear contaminação, pois sua estrutura favorece a multiplicação microbiana. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi verificar a eficiência de dois métodos de desinfecção para diminuir a quantidade de microrganismos de importância clínica nas esponjas de banho. Foram analisadas 30 esponjas de banho (15 vegetais e 15 sintéticas) que foram cortadas em três partes iguais. Uma delas serviu como controle. As demais partes foram submetidas à desinfecção por fervura durante cinco minutos e à imersão em hipoclorito de sódio 200 ppm. Os resultados demonstraram média de contaminação de bactérias heterotróficas de 4,1 LogUFC/mL e 4,7 LogUFC/mL, para as vegetais e sintéticas, respectivamente. A maioria (80%) das esponjas (10 sintéticas e 14 vegetais) apresentou contaminação por microrganismos de importância clínica. Os métodos de desinfecção reduziram as contagens de bactérias heterotróficas em 3,3 LogUFC/mL com fervura durante cinco minutos e 1,8 LogUFC/mL com desinfecção em hipoclorito de sódio 200 ppm. Conclui-se, portanto, que as esponjas de banho possuem contaminação microbiológica de importância clínica e que a fervura por cinco minutos é um método de fácil execução, baixo custo e capaz de controlar a quantidade de bactérias nas esponjas utilizadas para banho, reduzindo a disseminação de doenças.

**Palavras chave.** bactéria, produtos de higiene pessoal, desinfecção, patógenos.

### ABSTRACT

Bath sponges can carry contamination, because their structure favors microbial multiplication. Thus, the objective of this work was to verify the efficiency of two disinfection methods to decrease the number of microorganisms of clinical importance in bath sponges. Thirty bath sponges (15 loofah and 15 synthetic) were analyzed and cut in three equal parts. One served as control. The other parts were boiled disinfected for five minutes and immersed in 200 ppm sodium hypochlorite. The results showed a mean contamination of heterotrophic bacteria of 4.1 LogUFC/mL and 4.7 LogUFC/mL, for plants and synthetic, respectively. The majority (80%) of the sponges (10 synthetic and 14 loofah) presented contamination by microorganisms of clinical importance. Disinfection methods reduced the counts of heterotrophic bacteria by 3.3 LogUFC/mL with boiling for five minutes and 1.8 LogUFC/mL with disinfection with 200 ppm sodium hypochlorite. It is concluded, therefore, that bath sponges present microbiological contamination of clinical importance and that boiling for five minutes is an easily executed low-cost method that is able to control the amount of bacteria in sponges used for bathing, reducing the risk of dissemination of disease.

**Keywords.** bacteria, personal hygiene products, disinfection, pathogens.

## INTRODUÇÃO

Existem dois tipos principais de esponjas de banho, vegetais e sintéticas. As esponjas vegetais são provenientes de espécies vegetais da família *Cucurbitaceae* e tornam-se comercializáveis após um processo de secagem que resulta na formação de uma fina rede de fibras. As buchas vegetais tornaram-se populares como agentes esfoliantes, pois promovem a remoção das camadas superficiais de células epiteliais, antes e durante o banho, sendo destinadas, portanto, à revigoração da pele, tornando-a mais lisa. Já as esponjas sintéticas utilizadas no banho, em sua grande maioria, são confeccionadas em poliéster<sup>1-3</sup>.

Independente de sua origem, as esponjas podem acumular vários tipos de bactérias e fungos após o banho, pois apresentam constituição que favorece a multiplicação de microrganismos, servindo tanto como reservatório, quanto veículo de transmissão. Entre os principais fatores que contribuem para esta ocorrência estão a temperatura e a umidade<sup>2,4</sup>.

Estudos nacionais e internacionais<sup>1,2,4</sup> demonstraram que as esponjas de banho podem carrear vários microrganismos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus sp.*, *Serratia liquefaciens*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Hafnia alvei*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter diversus*, entre outras espécies.

Atualmente existem poucos trabalhos científicos que discutam métodos de controle da contaminação microbiológica dessas esponjas, uma vez que podem ser veículo de transmissão de microrganismos e, conseqüentemente, a causa de infecções principalmente para indivíduos que possuem lesões na pele.

Para evitar que ocorra a proliferação desses microrganismos, é proposto por Bottone et al<sup>3</sup> a desinfecção das esponjas de banho pela imersão em solução contendo hipoclorito de sódio.

Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar a eficiência de dois métodos de desinfecção para diminuir a quantidade de microrganismos nas esponjas de banho estabelecendo comparações entre as esponjas vegetais e as sintéticas, além de avaliar o hábito dos entrevistados quanto ao uso das esponjas de banho, tendo em vista que estas são

frequentemente utilizadas e, na maioria das vezes, mantidas constantemente em áreas úmidas de banho, fator que contribui para o desenvolvimento de microrganismos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas aleatoriamente 30 esponjas de banho em uso, 15 esponjas vegetais e 15 esponjas sintéticas, de doadores voluntários escolhidos aleatoriamente. Para conhecer os hábitos dos usuários foi aplicado um questionário no momento da coleta (**Tabela 1**).

**Tabela 1.** Questionário aplicado aos doadores voluntários das esponjas de banho no momento da coleta

|                                                                                                                                                                                             |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Quantas pessoas fazem uso desta esponja?<br>( ) 1 ( ) 2 ( ) 3 ( ) 4 ( ) 5 ( )                                                                                                            |
| 2. Utiliza algum método de higienização/desinfecção?<br>( ) Sim ( ) Não Qual? _____                                                                                                         |
| 3. Com que frequência?<br>( ) A cada 7 dias ( ) A cada 15 dias ( ) A cada 30 dias ( ) _____                                                                                                 |
| 4. Onde armazena a esponja após o banho?<br>( ) Pendurada ( ) Em um suporte ( ) Em cima da janela<br>( ) Em contato com o sabonete ( ) No chão do banheiro<br>( ) Outro local - Qual? _____ |
| 5. Há quanto tempo você está usando esta esponja?<br>( ) 15 dias ( ) 1 mês ( ) 2 meses ( ) 3 meses<br>( ) 4 meses ( ) 5 meses ( ) 6 meses ou mais ( ) 1 ano<br>( ) Mais de 1 ano            |
| 6. Com que periodicidade faz a troca de esponjas?<br>( ) 15 dias ( ) 1 mês ( ) 2 meses ( ) 3 meses<br>( ) 4 meses ( ) 5 meses ( ) 6 meses ou mais ( ) 1 ano<br>( ) Mais de 1 ano            |
| 7. Algum dos usuários da esponja apresenta algum tipo de doença de pele?<br>( ) Sim ( ) Não Qual? _____                                                                                     |
| 8. Você sabia que as esponjas podem transmitir microrganismos?<br>( ) Sim ( ) Não                                                                                                           |
| 9. Como ficou sabendo disso?<br>( ) TV ( ) Rádio ( ) Internet ( ) Revistas ( ) Jornais<br>( ) Outro meio Qual? _____                                                                        |

Como critério de inclusão, definiu-se que as esponjas deveriam estar em uso por pelo menos um dia. Após a coleta, as esponjas foram transportadas dentro de sacos plásticos estéreis, mantidas

sob refrigeração em caixas térmicas de isopor e encaminhadas para o Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico em Microbiologia da Universidade do Oeste de Santa Catarina, campus de São Miguel do Oeste, onde foram analisadas.

Como controles, três esponjas sintéticas e três naturais, sem uso foram analisadas, ou seja, adquiridas comercialmente e imediatamente analisadas.

Para realização das análises utilizamos a metodologia adaptada descrita por Rossi<sup>5</sup> e Maniatis et al<sup>6</sup>, as esponjas foram cortadas de maneira asséptica em três partes iguais. Uma das partes (controle) foi imersa em 100 mL de água peptonada a 0,1% e homogeneizada em *Stomacher* (ITR, Esteio, RS) por 60 segundos. Para pesquisa de patógenos foram utilizados 100µL da solução de enxágue contendo a esponja e a água peptonada, e semeados com alça de Drigalski em Ágar *Sabouraud*, Ágar Sal Manitol, Ágar Sangue de Carneiro 5%, Ágar Cetrimide e Ágar *Plate Count Agar* (PCA) (Merck, Germany). Os diferentes meios foram semeados em triplicata e incubados em estufa bacteriológica a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 48 horas, com exceção do Ágar *Sabouraud*, que foi incubado a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 72 horas.

As duas partes restantes da esponja foram submetidas, individualmente, aos métodos de desinfecção. Uma das partes foi mergulhada em um frasco estéril com 200 mL de solução de hipoclorito de sódio 200 ppm por 15 minutos. Posteriormente, foi enxaguada com água destilada estéril.

A solução de hipoclorito de sódio 200 ppm foi preparada em um balão volumétrico no qual foi adicionado 10 mL da água sanitária marca Q'Boa<sup>®</sup> para cada litro de água destilada estéril e a concentração de 200 ppm foi quantificada usando Kit Spectroquant Cloro Livre da marca Merck, com leitura em espectrofotômetro Spectroquant pharo 100. Quando necessário, a quantidade de água sanitária foi ajustada para que a solução tivesse concentração de 200 ppm.

A outra parte foi mergulhada em frasco estéril contendo 300 mL de água destilada estéril e colocada em forno micro-ondas para fervura durante cinco minutos, sendo que o tempo de fervura foi contabilizado após o início do surgimento de bolhas na água onde a parte da esponja estava submersa.

Após a realização dos métodos de desinfecção de ambas as partes das esponjas, foi realizada a contagem de bactérias heterotróficas. Para esta análise, as esponjas foram colocadas, individualmente, em sacos plásticos estéreis juntamente com 100 mL de água peptonada a 0,1% e homogeneizadas em *Stomacher* por 60 segundos. Em seguida, as amostras foram semeadas em Ágar PCA em triplicata, e incubadas em estufa bacteriológica a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 48 horas.

Para a pesquisa de patógenos, diferentes colônias foram selecionadas do Ágar *Sabouraud*, Ágar Sal manitol, Ágar Sangue, Ágar Cetrimide e Ágar PCA e submetidas aos testes de coloração de Gram. Para a identificação das bactérias foram utilizados teste bioquímicos: produção de catalase, produção de coagulase, produção de oxidase, indol, motilidade, produção de H<sub>2</sub>S, redução de nitrato, oxidação, fermentação de glicose, produção de piocianina e crescimento à 42°C. As espécies de leveduras foram identificadas através da assimilação de carboidratos e produção de tubo germinativo com soro bovino.

Após as análises, os dados foram tabulados no programa Microsoft Excel do Windows (versão 2007), onde foram transformados em logaritmos, e calculadas as médias e o desvio padrão das amostras em triplicata. Os resultados finais foram analisados no ASSISTAT versão 7.7 beta (2015), através do Teste de Tukey e estes expressos em LogUFC/mL.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Contaminação microbiológica

Todas as esponjas de banho apresentaram bactérias heterotróficas, variando entre 2,9 LogUFC/mL e 6,3 LogUFC/mL, sendo que 33,3% das esponjas apresentaram contagens aproximadas de 3 LogUFC/mL.

Quando comparados os dois tipos de esponjas de banho observou-se média de contagem de bactérias heterotróficas de 4,1 LogUFC/mL para as esponjas vegetais e 4,7 LogUFC/mL para as esponjas sintéticas.

Com relação aos microrganismos clinicamente importantes, foram isoladas 37 cepas provenientes de 24 (80%) das 30 esponjas analisadas (**Tabela 2**).

**Tabela 2.** Porcentagem dos microrganismos clinicamente importantes isolados das esponjas de banho coletadas de doadores voluntários

| Microrganismo                            | Nº de esponjas | %    |
|------------------------------------------|----------------|------|
| <i>Staphylococcus coagulase negativa</i> | 15             | 40,5 |
| <i>Staphylococcus aureus</i>             | 4              | 10,8 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>            | 6              | 16,2 |
| <i>Candida albicans</i>                  | 1              | 2,7  |
| <i>Trichosporon ovoides</i>              | 9              | 24,3 |
| <i>Cryptococcus albidus</i>              | 1              | 2,7  |
| <i>Rhodotorula rubra</i>                 | 1              | 2,7  |

As esponjas de banho usadas como controle (novas) apresentaram apenas bactérias heterotróficas, com médias de 1,3 LogUFC/mL (esponja vegetal) e 0,8 LogUFC/mL (esponja sintética).

Os resultados encontrados para as esponjas em uso são preocupantes quando se observa que todos os microrganismos isolados podem ser potencialmente patogênicos e causar diferentes patologias (**Tabela 3**) em indivíduos que utilizam as esponjas de banho sem nenhum cuidado no armazenamento, que não aplicam métodos de desinfecção e/ou que compartilham as esponjas com outros indivíduos.

**Tabela 3.** Patologias associadas aos microrganismos clinicamente importantes isolados das esponjas de banho coletadas de doadores voluntários

| Microrganismos                                                                    | Habitat Microbiano                                                           | Patologias                                                                                                                                |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Staphylococcus epidermidis</i>                                                 | Microbiota residente da epiderme humana <sup>7</sup>                         | Endocardite, peritonite, osteomielite, sepse e vaginose bacteriana <sup>8-11</sup>                                                        |
| <i>Staphylococcus aureus</i>                                                      | Microbiota normal das fossas nasais e da epiderme humana <sup>12</sup>       | Acnes, pneumonia, osteomielite, endocardite e sepse <sup>12,13</sup>                                                                      |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                                                     | Água <sup>14</sup>                                                           | Foliculite, infecções sanguíneas, pneumonia, osteomielite, otite, erupções cutâneas generalizadas e infecções oculares <sup>2,15,16</sup> |
| <i>Candida albicans</i>                                                           | Pele, mucosa e microbiota gastrintestinal humana <sup>17,18</sup>            | Candidíase vulvovaginal, infecções mucocutâneas e infecções sistêmicas crônicas <sup>17,19,20</sup>                                       |
| <i>Trichosporon ovoides</i>                                                       | Pode ser um constituinte da microbiota normal de seres humanos <sup>21</sup> | <i>Piedra</i> branca e <i>piedra</i> preta <sup>21,22</sup>                                                                               |
| <i>Cryptococcus albidus</i>                                                       | Fontes Ambientais <sup>23</sup>                                              | Infecção extra-dérmica, bacteremia e encefalite <sup>24</sup>                                                                             |
| <i>Rhodotorula rubra</i> (também conhecida como <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> ) | Fontes ambientais <sup>25</sup>                                              | Infecções oculares, infecções cutâneas, meningite, peritonite e sepse <sup>25,26</sup>                                                    |

Logo, essas esponjas podem servir como veículo de transmissão desses microrganismos para seus usuários. Torna-se necessário destacar que o risco é maior para as pessoas que apresentam o sistema imunológico debilitado, além de serem mais suscetíveis à aquisição de infecções ou ainda que apresentem lesões na pele. Esta possibilidade pode ser ainda mais provável em imunodeficientes, especialmente os portadores de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS)<sup>10,27</sup>.

O risco associado ao uso das esponjas de banho contaminadas com estas espécies não é um fator que, por si só, determine o surgimento das patologias aqui citadas, pois este necessita, na grande maioria das vezes, da presença de outro

elemento, que é o rompimento da barreira cutânea, seja por lesões mais extensas ou por microtraumas, suficientes apenas para que o microrganismo possa adentrar no organismo humano e atingir a circulação sistêmica, chegando a diferentes órgãos e estabelecendo o surgimento das patologias.

Os resultados encontrados nesse trabalho são semelhantes às poucas pesquisas que já foram realizadas com esponjas de banho<sup>1,2,4</sup>. Foram relatados vários patógenos dos quais podemos citar alguns como *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia liquefaciens*, *Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *S. agalactiae*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Bacillus* sp., *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter agglomerans*,

*E. cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Flavobacterium sp.*, *Actinobacter anitratus*, *Xanthomonas maltophilia*, *Kebsiella sp.* e *Escherichia coli*<sup>1,28</sup>.

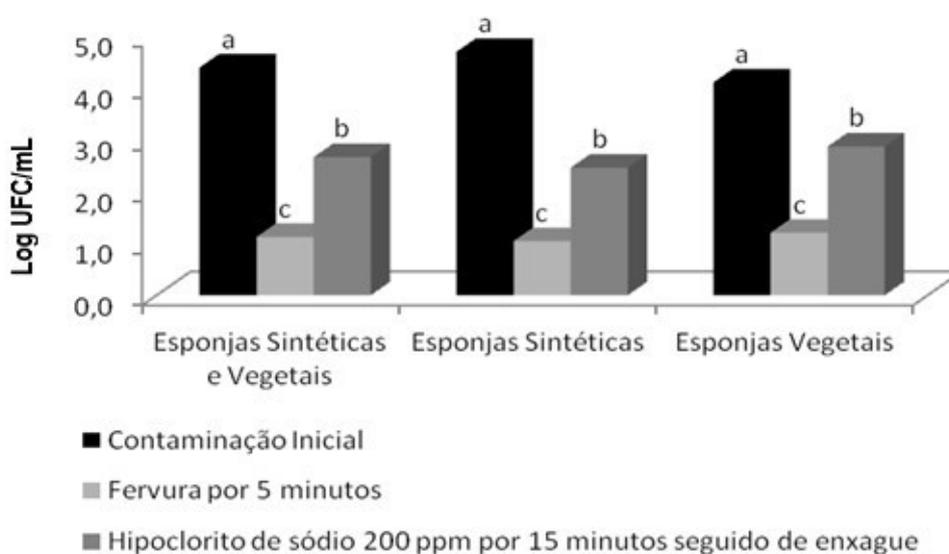
Todos estes resultados mostram que os microrganismos pesquisados e isolados neste estudo foram compatíveis com os descritos pela literatura. Não houve relato do isolamento de espécies de leveduras nas esponjas de banho, o que torna o presente estudo o primeiro a relatar este tipo de contaminação, ressaltando a necessidade de outros estudos que investiguem leveduras em esponjas de banho, pois todas as espécies identificadas neste estudo podem apresentar potencial patogênico, o que ocasiona riscos à saúde dos usuários.

A preocupação existente em relação às esponjas de banho é que elas podem tornar-se um veículo de transmissão de microrganismos patogênicos entre uma pessoa e outra, pois podem conter uma grande diversidade de patógenos em seu interior.

Esse acúmulo de microrganismos pode ocorrer durante o uso, devido ao fato das células epiteliais que descamam ficarem aprisionadas entre as malhas das esponjas, favorecendo o crescimento microbiano. Além do acúmulo de detritos da epiderme, fatores como resíduos de sabão e queratina, secagem incompleta e presença de umidade também contribuem para o crescimento dos microrganismos nas esponjas, especialmente durante à noite<sup>2,3,28</sup>.

### Eficiência dos métodos de desinfecção

Os métodos de desinfecção proporcionaram reduções médias de 3,3 LogUFC/mL para fervura e 1,8 LogUFC/mL para a desinfecção com hipoclorito de sódio 200 ppm, o que permite afirmar que ambos os métodos analisados foram eficientes para a desinfecção das esponjas de banho, porém a fervura apresentou uma maior efetividade (**Figura**).



**Figura.** Comparação entre a contagem de bactérias heterotróficas (expressas em LogUFC/mL) antes e após a desinfecção e os tipos de esponjas de banho coletadas de doadores voluntários

As esponjas controle (esponjas novas) após serem submetidas aos métodos de desinfecção não apresentaram bactérias heterotróficas, demonstrando que em esponjas com baixa carga microbiana e que não estão em uso, a eliminação dos microrganismos acaba sendo facilitada.

Os resultados obtidos após a desinfecção, tanto para as esponjas novas ou em uso podem ser explicados pelos mecanismos de ação de cada método

utilizado. O calor gerado pela água durante a fervura é responsável por desnaturar as proteínas presentes nas células bacterianas, ocasionando a morte desses microrganismos. Outra vantagem desse método é o fato das esponjas estarem submersas na água e, durante o processo de fervura, ocorre movimentação destas no líquido e conseqüente desprendimento da matéria orgânica (gordura, células epiteliais, resíduos de sabão e queratina), facilitando assim, a penetração do calor.

Esse despreendimento da matéria orgânica não ocorre quando as esponjas são submersas em hipoclorito de sódio 200 ppm. Além disso, a presença de material orgânico faz com que o hipoclorito de sódio seja inativado, diminuindo o seu potencial microbicida, ou seja, a sua ação de interferir na integridade da membrana celular dos microrganismos e alterar o metabolismo celular, causando uma inibição enzimática irreversível, o que pode explicar a menor inativação dos microrganismos quando utilizado este método<sup>29-33</sup>.

Estes resultados são diferentes daqueles trazidos por Nogueira et al<sup>4</sup> em um estudo semelhante, onde o hipoclorito de sódio 1% eliminou qualquer forma de crescimento microbiano, em oposição ao tratamento realizado com fervura durante 10 minutos, no qual o crescimento de microrganismos não foi inativado. Outros estudos realizados com esponjas de banho<sup>1,3</sup> também demonstraram que a imersão em hipoclorito de sódio 0,1% foi eficiente para a descontaminação das buchas.

Poucos estudos foram realizados com esponjas de banho, o que demonstra a importância da realização desse trabalho, tendo em vista que as buchas são utilizadas diariamente e se não forem desinfetadas e armazenadas de maneira correta, ao invés de auxiliarem na higiene corporal, poderão contribuir para a aquisição e disseminação de patologias.

Por outro lado, a comparação dos resultados torna-se difícil, uma vez que há escassez de estudos semelhantes a este, principalmente em relação à desinfecção das esponjas através da fervura. Como a estrutura das esponjas de banho, de um modo geral, é semelhante a das esponjas de cozinha, os resultados dos procedimentos de desinfecção aplicados às esponjas de cozinha podem ser comparados àqueles aplicados às esponjas de banho.

Rossi<sup>33</sup> realizou um estudo com esponjas de cozinha e obteve resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho, onde a fervura durante cinco minutos inativou um número maior de microrganismos quando comparado ao hipoclorito de sódio 200 ppm. Resultados similares foram encontrados por Ikawa e Rossen<sup>34</sup>, onde a fervura durante cinco minutos proporcionou uma redução acentuada do número de microrganismos, e por Sharma et al<sup>35</sup> em que a imersão das esponjas em hipoclorito de sódio 10%

durante três minutos apresentou menor eficiência quando comparado com a fervura em forno micro-ondas durante um minuto.

Contudo, mesmo após serem submetidas à fervura durante cinco minutos, seis (20%) das 30 esponjas de banho analisadas apresentaram microrganismos viáveis, sendo que destas, duas (6,6%) eram sintéticas e quatro (13,3%) eram vegetais. Este fato pode ser explicado pela possível presença de microrganismos termorresistentes, ou seja, microrganismos que sobrevivem mesmo quando submetidos a altas temperaturas<sup>36</sup>.

Embora as esponjas sintéticas apresentassem uma contaminação maior do que as vegetais, como já citado anteriormente, os resultados dos métodos de desinfecção aplicados a cada um dos tipos de esponjas de banho (sintéticas e vegetais) demonstraram que as esponjas sintéticas, no que diz respeito a quantidade de bactérias heterotróficas, atingiram reduções de 3,7 LogUFC/mL para a fervura e 2,3 LogUFC/mL para a imersão em hipoclorito de sódio. Já as esponjas vegetais, exibiram reduções de 2,9 LogUFC/mL e 1,2 LogUFC/mL para fervura e imersão em hipoclorito de sódio, respectivamente (**Figura**). Assim, é possível afirmar que, apesar das esponjas vegetais apresentarem contagens de microrganismos menores que as esponjas sintéticas, estas últimas apresentaram uma maior facilidade de inativação destes microrganismos após passarem pelos tratamentos de desinfecção.

Além disso, é importante destacar que neste estudo foi possível observar que no grupo das esponjas sintéticas, quatro do tipo polietileno (chamadas popularmente de esponjas de redinha) apresentaram melhores resultados após serem submetidas aos métodos de desinfecção quando comparadas aos demais tipos de esponjas sintéticas. Este evento pode ter ocorrido devido à estrutura destas esponjas que não permite que as células bacterianas se fixem nelas. A estrutura impede também a aderência de material orgânico, como células epiteliais, queratina e restos de produtos utilizados durante o banho. Desta forma, os microrganismos que conseguirem se fixar nas esponjas não encontrarão um ambiente favorável para a sua proliferação, pois a quantidade de nutrientes será escassa. Outro fator que pode ser

destacado é a facilidade de secagem das esponjas, pois estas não retêm grandes quantidades de água e, conseqüentemente, não se mantêm úmidas. Todos estes fatores contribuem para baixas quantidades de bactérias heterotróficas, além de facilitarem a limpeza e a desinfecção destas esponjas.

### Hábitos dos entrevistados quanto ao uso das esponjas

Com relação ao hábito dos usuários das esponjas de banho, avaliado através do questionário aplicado no momento da coleta das amostras (**Tabela 1**), os resultados demonstraram que a maioria dos usuários (33,3%) utiliza uma esponja por pessoa ou compartilham a esponja entre duas pessoas, sendo que apenas uma das esponjas (3,3%) era utilizada por cinco usuários. Além disso, pode-se evidenciar que nem sempre um número maior de usuários vai ocasionar uma maior contaminação da esponja.

Quando os usuários foram questionados sobre o fato de realizar algum método de desinfecção nas esponjas, apenas um (3,3%) afirmou utilizar a imersão em hipoclorito de sódio a cada 15 dias, o que colaborou para que a esponja deste usuário apresentasse um menor número de microrganismos quando comparada com as demais, sem, no entanto, apresentar ausência microbiana.

Com relação ao local de armazenamento das esponjas após o banho, a maioria dos usuários (40%) afirmou deixá-las penduradas, fato que, quando comparado à quantidade de bactérias heterotróficas, apresentou uma menor contagem de bactérias. Em contrapartida, as maiores contagens foram encontrados nas esponjas que foram armazenadas no chão (6,3 LogUFC/mL) e sobre um pote (6,0 LogUFC/mL), sendo que apenas três usuários (10%) armazenavam nestes locais.

O tempo de uso das esponjas apresentou grandes diversificações, variando de um dia (6,6%) a dois anos (3,3%), sendo que a maior porcentagem de usuários (26,6%) afirmou estar utilizando as esponjas de banho há dois meses. Quando os referidos dados foram comparados com as contagens microbianas, não foi possível afirmar que um maior tempo de uso ocasionou uma maior contaminação das esponjas, pois as esponjas que foram utilizadas apenas por um dia (6,6%) apresentaram contagens de bactérias maiores do que aquela utilizada durante

dois anos (3,3%), sendo que a maior contaminação se concentrou em um tempo de uso de 8 dias (3,3%).

A periodicidade de troca das esponjas foi realizada de forma variável, sendo que 30% afirmaram que fazem a troca de três em três meses; 23,3% de dois em dois meses ou quando a esponja “estraga” (16,6%).

Com relação às doenças de pele, nenhum dos entrevistados relatou apresentar qualquer tipo de doença cutânea, sendo que este quesito, em virtude do resultado apresentado, não pode ser avaliado como sendo significativo ou não para uma maior ou menor contagem de bactérias ou como sendo um fator colaborativo para a transmissão de microrganismos através das esponjas. Este resultado pode ser decorrente da falta de conhecimento, por parte dos usuários, do que é uma doença de pele, além de ser um quesito passível de sofrer influência devido à omissão deste evento pelos portadores de doenças cutâneas, possivelmente por sentirem constrangimento em relatar este fato.

A veiculação de microrganismos através das esponjas de banho, um dos principais objetivos deste estudo, é de conhecimento de 93,3% dos usuários, sendo que a fonte de predomínio para que esta informação chegasse até eles foi a TV, citada por 11 (36,6%) dos 30 entrevistados, seguida pela Internet (20%). Alguns dos usuários relataram que obtiveram este conhecimento através de outras pessoas, em conversas, em palestras, ou através de profissionais da saúde, como as enfermeiras. Os usuários mais instruídos declaram como fonte de conhecimento a universidade, citando em especial as aulas de microbiologia, ou o contato com a área da saúde. Frases como “Ouvi falar”, “Eu desconfio” ou “Eu sei pela lógica” foram citadas por seis usuários (20%), sendo que alguns ainda afirmaram que “imaginavam” a presença de microrganismos nas esponjas, especialmente devido à presença de umidade.

Atualmente não há dados semelhantes a estes na literatura científica, o que dificulta a discussão dos resultados, mas demonstra a importância deste trabalho, tendo em vista que este é o primeiro estudo científico que destaca a percepção dos usuários em relação às esponjas de banho.

A análise destes resultados permite dizer que dentre todos os quesitos avaliados, o tempo de uso

das esponjas de banho e o número de usuários não apresentou relação direta com a quantidade de bactérias heterotróficas. Mesmo assim, o uso individual das esponjas de banho é um fator importante para evitar que ocorra a transmissão de microrganismos com possível potencial patogênico entre usuários<sup>1,28</sup>.

Além disso, Bottone e Perez<sup>1</sup> e Corraza et al<sup>28</sup> aconselham que as esponjas sejam secas após o banho, o que vem complementar os resultados encontrados neste estudo, onde as esponjas que eram mantidas suspensas exibiram uma contagem microbiana menor, pois permitiram o escoamento da água presente em seu interior e, assim, diminuíram a umidade que contribui para a proliferação de microrganismos. Em contrapartida, as esponjas que eram deixadas no chão apresentaram uma quantidade de microrganismos heterotróficos maior, possivelmente pelo fato de não haver escoamento total da água, além de ficarem em contato com os detritos e sujidades eliminados durante o banho que se acumulam no chão, favorecendo a proliferação microbiana, pois se transformam em um ambiente úmido e com vasta quantidade de nutrientes.

## CONCLUSÃO

As esponjas de banho apresentaram microrganismos, sendo que 80% exibiram a presença de microrganismos clinicamente importantes (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e outras espécies de leveduras). Ambos os métodos de desinfecção testados mostraram-se eficientes, porém a fervura conseguiu inativar um número maior de microrganismos, principalmente pelo fato de não sofrer influência da matéria orgânica presente nas esponjas. Maiores quantidades de microrganismos heterotróficos foram encontrados nas esponjas sintéticas, contudo, após serem submetidas às técnicas de desinfecção, estas apresentaram uma maior facilidade de inativação dos microrganismos quando comparadas às esponjas vegetais, o que mostra que a utilização das esponjas sintéticas ainda é mais vantajosa, especialmente as confeccionadas em polietileno. O tempo de uso, assim como o número de usuários, não apresentou relação direta com a contaminação das esponjas de banho, mesmo assim, recomenda-

se o uso individual das esponjas de banho, pois estas servem como veículos de microrganismos, inclusive de espécies patogênicas, possibilitando a transmissão entre os usuários e aumentando a possibilidade de aquisição de doenças.

A partir disso, sugere-se que os fabricantes das esponjas de banho exibam no rótulo do produto informações sobre a maneira correta de desinfecção das esponjas, alertando sobre a veiculação de microrganismos e aconselhando o uso individual e a realização de trocas periódicas, pois a falta destes conhecimentos por parte dos usuários pode transformar o uso das esponjas de banho em um fator predisponente para a aquisição de patologias. De um modo geral, é recomendável que todos os usuários de esponjas de banho façam a desinfecção periódica de suas buchas, pois ambos os métodos podem ser facilmente realizados, permitindo, desta forma, interromper a cadeia de transmissão de microrganismos através das esponjas de banho.

## REFERÊNCIAS

1. Bottone EJ, Perez AA. *Pseudomonas aeruginosa* folliculitis acquired through use of a contaminated loofah sponge: an unrecognized potential public health problem. *J Clin Microbiol*. 1993;31(3):480-3. <https://dx.doi.org/10.1128/JCM.31.3.480-483.1993>
2. Frenkel LM. *Pseudomonas folliculitis* from sponges promoted as beauty aids. *J Clin Microbiol*. 1993;31(10):2838. <https://dx.doi.org/10.1128/JCM.31.10.2838-1993>
3. Bottone EJ, Perez AA, Oeser JL. Loofah sponges as reservoirs and vehicles in the transmission of potentially pathogenic bacterial species to human skin. *J Clin Microbiol*. 1994;32(2):469-72. <https://dx.doi.org/10.1128/JCM.32.2.469-472.1994>
4. Nogueira AA, Cunha Neto Rd, Siliano PR. Análise bacteriológica de esponjas de banho em uso e métodos de desinfecção. *Rev Sci Health*. 2014;5(2):56-60. Disponível em: [http://arquivos.cruzeirodosuleducacional.edu.br/principal/new/revista\\_scienceinhealth/14\\_mai\\_ago\\_2014/Science\\_05\\_02\\_2014.pdf](http://arquivos.cruzeirodosuleducacional.edu.br/principal/new/revista_scienceinhealth/14_mai_ago_2014/Science_05_02_2014.pdf)
5. Rossi EM. Avaliação da contaminação microbiológica e de procedimentos de desinfecção de esponjas utilizadas em serviços de alimentação [dissertação de mestrado]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal

- do Rio Grande do Sul; 2010. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/24854>
6. Maniatis AN, Karkavitsas C, Maniatis NA, Tsiftsakis E, Genimata V, Legakis NJ. *Pseudomonas aeruginosa* folliculitis due to non-O:11 serogroups: acquisition through use of contaminated synthetic sponges. *Clin Infect Dis*. 1995;21(2):437-9. <https://doi.org/10.1093/clinids/21.2.437>
  7. Oliveira F, Melo LD, Cerca N. Relationship between biofilm formation and antibiotic resistance in commensal isolates of *Staphylococcus epidermidis*. V International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology - BioMicroWorld; 2013 october; Madrid (Spain): Abstracts in Proceedings. p. 583.
  8. Duah M. Daptomycin for methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* native-valve endocarditis: a case report. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2010;9(9):1-4. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-9-9>
  9. Jung K, Lüthje P, Lundahl J, Brauner A. Low immunogenicity allows *Staphylococcus epidermidis* to cause PD peritonitis. *Perit Dial Int*. 2011;31(6):672-8. <https://dx.doi.org/10.3747/pdi.2009.00150>
  10. Pinheiro L. *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus haemolyticus*: detecção de genes codificadores de biofilme, toxinas, resistência antimicrobiana e tipagem clonal em isolados de hemoculturas [dissertação de mestrado]. Botucatu (SP): Universidade Estadual Paulista; 2014. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/110357/000783734.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
  11. Vasconcelos MA, Santos HS, Bandeira PN, Albuquerque MR, Carneiro VA, Cavada BS. Prophylactic outcomes of casbane diterpene in *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. II International Conference on Antimicrobial Research - ICAR; 2012 november; Lisboa (PT): Abstracts in Proceedings. p. 321.
  12. Centers for Disease Control and Prevention - CDC. *Staphylococcus aureus* in Healthcare Settings. [acesso 2017 Mai 5]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/HAI/organisms/staph.html>
  13. Lopes VK, Pereira SO, Castro ASB, Esperidião AV, Oliveira IS, Pereira JL et al. Infecções multirresistentes por *Staphylococcus aureus*: tratamento e profilaxia. *J Bras Med*. 2014;102(4):21-8.
  14. Pereira SG. *Pseudomonas aeruginosa* em ambiente termal: prevalência e determinantes de patogenicidade [tese doutorado]. Coimbra (PT): Universidade de Coimbra; 2013. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10316/23959>
  15. Centers for Disease Control and Prevention - CDC. *Pseudomonas aeruginosa* in Healthcare Settings. [acesso 2017 Mai 10]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/hai/organisms/pseudomonas.html>
  16. Santos LL. Características da microbiota da superfície ocular bacteriana em animais domésticos e silvestres [dissertação de mestrado]. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná; 2012. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/25611?show=full>
  17. Gow NA, van de Veerdonk FL, Brown AJ, Netea MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol*. 2011;10(2):112-22. <https://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2711>
  18. Mason KL, Downward JR, Mason KD, Falkowski NR, Eaton KA, Kao JY et al. *Candida albicans* and bacterial microbiota interactions in the cecum during recolonization following broad-spectrum antibiotic therapy. *Infect Immun*. 2012;80(10):3371-80. <https://dx.doi.org/10.1128/IAI.00449-12>
  19. Andrade JT, de Moraes SE, Ferreira JMS, de Freitas Araújo MG. Avaliação do potencial antifúngico de compostos isolados de plantas frente a espécies de *C. albicans*. V Jornada Acadêmica Internacional da Bioquímica; janeiro de 2015; São Paulo: Blucher Biochemistry Proceedings. 2015;1(1):85-6. Disponível em: <http://pdf.blucher.com.br/s3-sa-east-1.amazonaws.com/biochemistryproceedings/v-jaibqi/0088.pdf>
  20. Kashem SW, Igyártó BZ, Gerami-Nejad M, Kumamoto Y, Mohammed JA, Jarrett E, et al. *Candida albicans* morphology and dendritic cell subsets determine T helper cell differentiation. *Immunity*. 2015;42(2):356-66. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.01.008>
  21. Cox GM, Perfect JR. Infections due to *Trichosporon* species and *Blastoschizomyces capitatus* (*Saprochaete capita*). UpToDate. [internet]. [cited 2017 May 21]. Disponível em: <https://www.uptodate.com/contents/infections-due-to-trichosporon-species-and-blastoschizomyces-capitatus-saprochaete-capitata>

22. Saxena S, Uniyal V, Bhatt RP. Inhibitory effect of essential oils against *Trichosporon ovoides* causing Piedra Hair Infection. *Braz J Microbiol*. 2012; 43(4):1347-54. <http://doi.org/10.1590/S1517-83822012000400016>
23. Kurtzman C, Fell JW, Boekhout T, editors. *The Yeasts: a taxonomic study*. 5.ed. USA: Elsevier Science; 2011.
24. Liu Y, Ma S, Wang X, Xu W, Tang J. *Cryptococcus albidus* encephalitis in newly diagnosed HIV-patient and literature review. *Med Mycol Case Rep*. 2013; 3:8-10. <http://doi.org/10.1016/j.mmcr.2013.11.002>
25. Wirth F, Goldani LZ. Epidemiology of *Rhodotorula*: an emerging pathogen. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2012; 2012(1):465717. <http://doi.org/10.1155/2012/465717>
26. Jorge AC. Doença de Marchiafava-Bignami: uma rara entidade com prognóstico sombrio. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2013;25(1):68-72. <https://doi.org/10.1590/S0103-507X2013000100013>
27. Coelho FA, Lopes SP, Pereira MO. Effective association of tea tree essential oil with conventional antibiotics to control *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Biofilms 5th International Conference; 2012 december; Paris*. p. 157 [abstract]. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1822/28611>
28. Corazza M, Carla E, Rossi MR, Pedna MF, Virgili A. Face and body sponges: beauty aids or potential microbiological reservoir? *Eur J Dermatol*. 2003;13(6):571-3.
29. Khatri JM, Jadhav MM, Tated GH. Sterilization and orthodontics: A literature review. *Int J Orthod Rehabil*. 2017;8:141-6. [https://doi.org/10.4103/ijor.ijor\\_36\\_17](https://doi.org/10.4103/ijor.ijor_36_17)
30. Chávez de Paz LE, Bergenholtz G, Svensäter G. The effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria. *J Endod*. 2010;36(1):70-7. <https://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2009.09.017>
31. Enxurreira EM. *Propriedades e aplicações do hipoclorito de sódio em endodontia [monografia]*. Porto (PT): Universidade Fernando Pessoa; 2010. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10284/1925>
32. Nascimento MS, Silva N. *Tratamentos químicos na sanitização de morango (Fragaria vesca L.)*. *Braz J Food Technol*. 2010; 13(1):11-7. <https://doi.org/10.4260/BJFT2010130100002>
33. Rossi EM, Scapin D, Grando WF, Tondo EC. Microbiological contamination and disinfection procedures of kitchen sponges used in food services. *Food Nutr Sci*. 2012;3(7):975-80. <http://dx.doi.org/10.4236/fns.2012.37129>
34. Iikawa JY, Rossen JS. Reducing bacteria in household sponges. *J Environ Health*. 1999; 62(1):18-22.
35. Sharma M, Eastridge J, Mudd C. Effective household disinfection methods of kitchen sponges. *Food Control*. 2009;20(3):310-3. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.05.020>
36. Lopes MT. *Caracterização microbiológica de matérias primas e validação do binómio tempo x temperatura de esterilização de preparados alimentares [mestrado]*. Lisboa (PT): Universidade Católica Portuguesa; 2013. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10400.14/16166>



# Avaliação físico-química e caracterização sensorial por meio de *Focus Group* de carne de sol

## Physical-chemical evaluation and sensory characterization of sun-dried meat by Focus Group

RIALA6/1789

Ricardo Targino MOREIRA<sup>1\*</sup>, Salete Maria de Olinda Carvalho FARIAS<sup>2</sup>, Edilma Pinto COUTINHO<sup>1</sup>, Rafaella de Paula Paseto FERNANDES<sup>2</sup>, Sonnale Silva COSTA<sup>2</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Departamento de Engenharia de Alimentos, Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária, João Pessoa, PB, Brasil, CEP: 58051-900. Tel: 83 3216 7357. E-mail: [ricardo.ufpb@gmail.com](mailto:ricardo.ufpb@gmail.com)

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Tecnologia, UFPB, João Pessoa, PB, Brasil

Recebido: 01.08.2019 - Aceito para publicação: 17.09.2020

### RESUMO

*Focus Group* é uma técnica sensorial qualitativa baseada no comportamento de um grupo de pessoas quanto aos atributos sensoriais. É conduzida por um moderador que garante a interação para discussão diante às percepções. O objetivo deste estudo foi avaliar carne de sol a partir de análises sensoriais, associando-as com resultados obtidos por análises físico-químicas. Para tanto, quatro amostras foram coletadas de comércio varejista na cidade de João Pessoa, PB, sendo caracterizadas quanto à composição centesimal, atividade de água, pH e capacidade de retenção de água (CRA). Os participantes foram recrutados conforme hábitos de consumo e as amostras foram preparadas a partir do dessalgue e cocção em forno elétrico, sendo mantidas em banho-maria até o momento da avaliação sensorial. Com as respostas obtidas, observou-se que além da aparência, o teor de umidade e a CRA são considerados parâmetros que influenciam diretamente nos atributos sensoriais. O estudo qualitativo exploratório - *Focus Group*, em associação aos parâmetros físico-químicos, representaram métodos confiáveis para a interpretação do perfil de consumo da carne de sol. Conclui-se que por meio de critérios específicos, os fatores de qualidade foram melhor interpretados, definindo as preferências de um consumidor cada dia mais exigente quanto às características de seu alimento.

**Palavras-chave.** composição de alimentos, preferência do consumidor, produto cárneo.

### ABSTRACT

Focus Group is a qualitative sensory technique, based on the behavior of a group of people, regarding the attributes of a product. It is conducted by a moderator who ensures an interaction for discussion in the face of perceptions. The aim of this study was to evaluate dried meat by sensory analysis associating the evaluation with results obtained by physicochemical analysis. Therefore, four samples were collected from the retail trade in the city of João Pessoa, PB, which were then characterized for chemical composition, water activity, pH and water holding capacity (WHC). Participants were recruited according to consumer habits and the samples were prepared by desalting and cooking in an electric oven, and kept in a water bath until the time for sensory analysis. With the answers obtained, in addition to appearance, the moisture content and the WHC are considered parameters that directly influence the sensory attributes. The qualitative exploratory study - Focus Group, in association with physical-chemical methods, represented methods used for the interpretation of the consumption profile of sun dried meat. Thus, conclude what is the use of specific criteria, the quality factors that were evaluated, defining the preferences of consumers who are increasingly demanding as to the characteristics of their food.

**Keywords.** food composition, consumer preference, meat product.

<sup>1</sup>Trabalho extraído de Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal da Paraíba, Processo nº 479934/2007-0 (Edital MCT/CNPq 15/2007 – Universal)

## INTRODUÇÃO

A qualidade alimentar pode ser definida como um conjunto de atributos que satisfazem o consumidor, sendo este um conceito bastante complexo, que depende da região geográfica, classe socioeconômica, aspectos culturais e com o estágio de desenvolvimento tecnológico do setor, podendo variar de acordo com o mercado ao qual o produto se destina<sup>1</sup>.

No setor alimentício, existem inúmeras alternativas para atender aos anseios dos consumidores em relação a seus produtos, sendo que uma das ferramentas utilizadas é a análise sensorial<sup>2</sup>. Esta é definida como uma disciplina científica usada para evocar, medir, analisar e interpretar reações das características dos alimentos em relação à forma que são percebidas através dos sentidos da visão, olfato, gosto, tato e audição<sup>3</sup>.

*Focus Group* é uma técnica qualitativa de discussão interativa e não diretiva que permite a obtenção de informações reais sobre o comportamento de um grupo de pessoas, normalmente entre seis e nove por sessão, em relação à avaliação sensorial, possibilitando a descoberta de novos atributos em um produto. Se baseia na coleta de dados conduzida por um hábil moderador, que deve garantir que todos expressem suas opiniões, sendo motivados pela interação e estimulados a reagirem diante às suas percepções<sup>4,5</sup>. Seu planejamento deve ser operacionalizado a partir da definição dos participantes, equipe de trabalho e sua preparação; uso de ferramentas para convocação, guia temático e de avaliação da sessão, bem como o ambiente aonde será realizada<sup>6</sup>. No entanto, existem vantagens e desvantagens quanto à sua aplicação. Assim, os principais benefícios em relação a outros métodos de pesquisa são: sinergismo, com a participação simultânea dos entrevistados; interação entre os indivíduos; estimulação, espontaneidade e naturalidade nas colocações; flexibilidade para o moderador dirigir a discussão; profundidade e ampla obtenção de informações para maior rapidez na coleta de dados. Em contra partida, a principal desvantagem é a impossibilidade de utilização dos resultados obtidos de forma conclusiva, porque a preferência depende da interação entre as expectativas do consumidor e a qualidade do produto<sup>5,7,8</sup>.

A carne de sol é um produto típico brasileiro, muito apreciado principalmente no Nordeste, obtido a partir da salga leve e desidratação ao sol de cortes cárneos, normalmente bovinos. Esta, apesar de ser uma técnica antiga, não exige armazenamento a frio, já que ao final do processo, a atividade de água permanece entre 0,70 e 0,75, resultante de reações químicas entre NaCl, proteína e umidade<sup>9</sup>. A desidratação, método muito comum de conservação de produtos alimentícios inclui a tradicional técnica de secagem ao sol<sup>10</sup>. Neste caso, a carne de sol apresenta de 5 a 6% de sal e 64 a 70% de umidade<sup>11</sup>. Trata-se de um produto sem regulamentação técnica, que não possui memorial descritivo que estabeleça os procedimentos para sua elaboração, assim como também padrões de identidade e qualidade, sendo seguidos conceitos típicos regionais<sup>12-14</sup>.

Devido a uma tecnologia de elaboração bastante rudimentar, normalmente artesanal, a comercialização e distribuição geralmente ocorrem em condições higiênicossanitárias mais precárias<sup>10</sup>. Durante a elaboração do produto, por não existir um controle rigoroso e fiscalização do processo, pode ocorrer à proliferação de microrganismos patogênicos e/ou deteriorantes desde a manipulação da matéria prima, transporte, armazenamento até sua distribuição. O aumento da contagem microbiana é desencadeado pela presença de uma elevada atividade de água e um baixo teor de sal no produto, somados a não observância das Boas Práticas de Fabricação, que incluem também o estado de saúde e os hábitos higiênicos dos manipuladores. A qualidade sanitária depende de cada uma das etapas do processo de elaboração da carne de sol, sendo que a capacitação dos funcionários é de extrema importância para a adequada manipulação e higienização do alimento<sup>15</sup>.

Diante o exposto, o objetivo deste estudo foi caracterizar a carne de sol disponível no comércio varejista de João Pessoa, PB, a partir de análises físico-químicas, incluindo composição centesimal, pH, capacidade de retenção de água e atividade de água; considerando-se também as análises sensoriais. A partir deste diagnóstico, o estudo justificou as preferências quanto a este produto cárneo, possibilitando a determinação da qualidade sensorial pelo consumidor que requer uma maior praticidade e conveniência durante o preparo de seu alimento.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta das amostras

Para o presente estudo, foram adquiridas quatro amostras de carne de sol oriundas de coxão mole - *semimembranosus* + *adductor femoris* + *gracilis*, de mercados públicos, mercadinhos, supermercados e hipermercados da cidade de João Pessoa, PB, sendo as duas primeiras comercializadas sem embalagem, e as outras embaladas em bandejas de isopor e recobertas com filme plástico. Para tanto, 2 kg de cada uma das amostras mencionadas acima foram coletadas 24 horas antes da realização das sessões de análise sensorial por *Focus Group*, sendo os estabelecimentos definidos aleatoriamente. Como as amostras foram adquiridas diretamente dos pontos de venda ao público, foram consideradas seguras e inócuas para este estudo. Além disso, a diversificação do segmento ocorreu em consequência aos estudos prévios realizados para avaliação higiênico-sanitária e da qualidade físico-química da carne de sol comercializada na capital João Pessoa, PB. Para assegurar o atendimento aos critérios estabelecidos pela legislação vigente e garantir a segurança do alimento, foram avaliadas as condições de comercialização, de armazenamento, de higiene dos manipuladores e das instalações, equipamentos e utensílios. Os riscos de contaminação microbiológica podem gerar danos à saúde do consumidor e por isso as condições higiênicossanitárias e de Boas Práticas de Fabricação devem ser averiguadas para a inocuidade do alimento, oriundo de estabelecimentos comerciais. Para tanto, seguiu-se a Resolução RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004 e Portaria nº 326, de 30 de julho de 1997, ambas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária<sup>16,17</sup> e Portaria nº 368, de 04 de setembro de 1997 do Ministério da Agricultura e do Abastecimento<sup>18</sup>.

Após a coleta, as amostras foram devidamente codificadas com números de três dígitos, mantidas na embalagem original e acondicionadas em caixa isotérmica para o transporte ao Laboratório de Análise Sensorial de Alimentos do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba, Campus I (LAS/CT/UFPB/Campus I), de onde se procederam todas as análises.

### Preparo das amostras de carne de sol e análises sensoriais

Para o preparo das amostras, seguiu-se recomendação de Nassu et al<sup>19</sup>, com adaptações no tratamento prévio, sendo dessalgadas por um tempo

de 20 minutos anteriormente à cocção. A carne de sol foi processada a partir de cortes de coxão mole bovino - *semimembranosus* + *adductor femoris* + *gracilis*, sendo cortadas em bifês de 2,5 cm de espessura, colocadas em béqueres juntamente com 0,5 L de água destilada e mantidas à temperatura ambiente. Posteriormente, os bifês foram colocados sobre papel absorvente para remover o excesso de água e transferidos para bandejas de aço inox, sendo cozidos em forno elétrico aquecido a 180°C até atingir temperatura interna de 72°C (centro geométrico), que foi monitorada com termômetro infravermelho portátil (Raytek, MT4, Brasil). Após cocção, cada amostra foi cortada em cubos de aproximadamente 4 cm<sup>2</sup>, sendo embaladas em papel alumínio, acondicionadas em béqueres de 250 mL e mantidas em banho-maria a 60°C. Quanto à amostra de carne *in natura*, sem cozimento, esta foi fatiada em pedaços de aproximadamente 2 x 10 cm, envolvidos em papel alumínio e mantidos sob refrigeração até o momento das análises. Nesse caso, o preparo da carne *in natura* também foi considerado para este estudo, devido à importância de sua avaliação para simular as percepções do consumidor no momento da compra.

Todas as amostras foram apresentadas monadicamente aos provadores em uma mesma sessão, seguindo delineamento em blocos casualizados completos, conforme metodologia descrita por Meilgaard et al<sup>20</sup>, garantindo assim a eliminação do efeito da ordem de apresentação e residual caracterizado pela influência de uma amostra na avaliação subsequente.

Três sessões de *Focus Group* foram conduzidas por um moderador treinado, um observador e um auxiliar, com um total de 21 participantes (7 para cada sessão), sendo o hábito de consumo o principal critério utilizado para o recrutamento, além de terem sido considerados aspectos relacionados à frequência de compra, conveniência do produto, facilidade de preparo e características de consumo. Contudo as três repetições do delineamento foram realizadas no Laboratório de Análise Sensorial da Universidade Federal da Paraíba, no bloco de Análise e Processamento de Alimentos do Centro de Tecnologia, seguindo-se metodologia de Meilgaard et al<sup>20</sup>, com duração entre 60 e 90 min cada uma delas. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/HULW n. 154/11, Folha de rosto 416838), sendo que todos os participantes

recrutados receberam um termo de consentimento livre e esclarecido para ser lido e assinado antes do início de cada uma das sessões.

Assim, todas as sessões do *Focus Group* seguiram um roteiro previamente elaborado para analisar as

questões sobre os aspectos da carne, bem como a percepção de sua qualidade sem e com processamento térmico, seguindo-se respectivamente questões de um a quatro, e de cinco a nove, conforme pode ser verificada na **Figura**.

1. Por que a carne de sol faz parte da sua dieta?
2. O que lhe atrai nestas amostras de carne de sol?
3. O que você achou da aparência de cada uma destas amostras?
4. O que você achou do aroma de cada uma delas?
5. O que você achou do sabor?
6. Quanto ao sabor, qual delas você prefere? Por quê?
7. O que você achou da textura?
8. Quanto à textura, qual delas você prefere? Por quê?
9. Qual dessas amostras você prefere? Por quê?

**Figura.** Roteiro de questões para a condução das sessões de *Focus Group*. João Pessoa, Paraíba, Brasil, 2015

Quanto às questões de cinco a nove, relacionadas à carne após cozimento, a análise foi realizada em ambiente iluminado com luz halógena branca, sendo as amostras servidas individualmente em pratos plásticos descartáveis aleatoriamente codificados com números de três dígitos, acompanhadas de biscoito do tipo água e sal para remoção de sabor residual e água potável fria para lavagem do palato, entre cada uma das amostras.

### **Análises físico-químicas**

Para a avaliação da qualidade físico-química das amostras, foi determinado o teor de umidade<sup>21</sup> (AOAC 950.46), teor de proteínas<sup>21</sup> (AOAC 981.10), lipídeos<sup>22</sup> (BlighDyer, 1959) e cinzas<sup>21</sup> (AOAC 920.153).

A CRA foi determinada conforme metodologia descrita por Moura<sup>23</sup>, em que sobre um papel filtro *Whatman* nº 1, previamente seco, as amostras foram mantidas por um período de 24 horas, em estufa a 105°C e dessecadas em dessecador contendo sílica gel. Foram pesadas em balança analítica, alíquota de 1 g de amostra. O papel filtro contendo a amostra foi transferido para uma placa de acrílico, onde foi recoberta com um segundo papel de filtro. Esse conjunto foi submetido a uma pressão de 10 Kgf/cm<sup>2</sup> por um período de cinco minutos. Em seguida, destacou-se uma das folhas de papel de filtro, o qual foi levado ao prato da balança; tarou-se a balança

e foi realizada a pesagem da amostra prensada, anotando-se a massa. A CRA foi calculada segundo as Equações 1 e 2 a seguir:

$$CRA = 100 - \text{Água livre} \left( \frac{g}{100g} \right)$$
$$\text{Água livre} \left( \frac{g}{100g} \right) = \frac{g \text{ de Água livre}}{g \text{ de amostra}} \text{ xumidade} \left( \frac{g}{100g} \right) \quad (2)$$

Onde:

g de Água livre =  $m_i - m_f$ ,  $m_i$  = massa inicial de carne de sol,  $m_f$  = massa final de carne de sol

As determinações de atividade de água foram realizadas em equipamento (Modelo CX2, Marca Aqualab) a temperatura de 25°C. Para as leituras de pH foi utilizado um pHmetro digital (Modelo pH 300M, Marca Digimed) provido de um eletrodo de vidro (Modelo 2ª 13-HG, Marca Analyser), sendo o equipamento previamente calibrado com soluções tampão 7,0 e 4,0.

### **Planejamento experimental**

Um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 3 (Tratamentos x sessões de avaliação) foi utilizado para avaliação dos parâmetros sensoriais a partir de técnica de *Focus Group* e 4 x 3 (Tratamentos x repetições do experimento)

para caracterização da qualidade físico-química das amostras. Todas as respostas e descrições aos atributos sensoriais obtidas pelos 21 provadores que participaram do estudo foram avaliadas em associação aos resultados físico-químicos obtidos.

## RESULTADOS

### Caracterização físico-química das amostras

A **Tabela 1** refere-se aos parâmetros de qualidade físico-química das amostras de carne de sol utilizadas no *Focus Group*. Os atributos de qualidade avaliados durante as sessões, de acordo com roteiro pré-estabelecido, foram associados com os parâmetros físico-químicos da carne.

**Tabela 1.** Parâmetros físico-químicos das amostras de carne-de-sol. João Pessoa, Paraíba, Brasil, 2015

| Parâmetro                        | Amostra |       |       |       |
|----------------------------------|---------|-------|-------|-------|
|                                  | S       | MP    | H     | M     |
| Umidade (g 100g <sup>-1</sup> )  | 69,39   | 73,67 | 68,24 | 70,08 |
| Atividade de água                | 0,923   | 0,965 | 0,950 | 0,953 |
| Proteína (g 100g <sup>-1</sup> ) | 22,18   | 23,46 | 23,71 | 23,75 |
| Lipídeos (g 100g <sup>-1</sup> ) | 2,86    | 0,91  | 0,44  | 0,41  |
| Cinzas (g 100g <sup>-1</sup> )   | 6,93    | 5,77  | 4,95  | 5,45  |
| CRA                              | 68,31   | 81,04 | 76,12 | 74,94 |

S – Supermercado; MP – Mercado Público; H – Hipermercado; M – Mercadinho

### Avaliação sensorial por *Focus Group*

Análises sensoriais foram realizadas paralelamente às físico-químicas, e esta associação foi comprovadamente útil, já que de acordo com resultados obtidos, as diferenças existentes entre os atributos puderam ser explicadas. Neste caso, a dinâmica aplicada contribuiu para estimular os participantes a compartilhar suas observações, pensamentos e opiniões diante às amostras avaliadas<sup>8</sup>, sendo de grande relevância o uso de população representativa que tornou possível a compreensão das percepções avaliadas. Todos os resultados refletiram de maneira específica, os interesses e as preocupações quanto à qualidade da carne de sol, sendo estes suficientes para estimativa dos principais atributos relacionados à preferência dos consumidores.

Observou-se, durante as sessões conduzidas, que coloração, textura e sabor foram atributos relevantes durante o processo de avaliação, o que certamente influenciará na decisão de compra pelo produto, pensando no mercado varejista. Mediante estes resultados e demais informações obtidas em forma de comentários, definiu-se a descrição das características a serem avaliadas pelos provadores de acordo com **Tabela 2**.

Em relação à questão um, os atributos sabor e praticidade/facilidade de preparo foram citados em todas as sessões, sendo que na primeira sessão houve unanimidade na escolha por conta destes atributos. De acordo com Mól<sup>24</sup>, o processo de decisão de compra depende de hábitos culturais, sociais, regionais, pessoais, idade e até mesmo do estilo de vida.

**Tabela 2.** Descrição das amostras de carne de sol utilizadas nas sessões de *Focus Groups*. João Pessoa, Paraíba, Brasil, 2015

| Produto                | Descrição                                                                                                                                           |
|------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Supermercado</b>    | Coloração “marrom” intensa, de textura aparente firme, sem exsudado;                                                                                |
| <b>Mercado Público</b> | Coloração da superfície apresentava-se vermelha pouca intensa sendo observado uma certa exsudação, aparentemente macia e com pouca gordura externa; |
| <b>Hipermercado</b>    | Coloração “marrom” um pouco intensa na superfície, porém vermelha intensa na parte interna; textura aparente firme, sem exsudado;                   |
| <b>Mercadinho</b>      | Coloração da superfície vermelha um pouco intensa, sem exsudado, textura aparente medianamente firme;                                               |

S – Supermercado; MP – Mercado Público; H – Hipermercado; M – Mercadinho

Quanto aos aspectos de atração ao consumidor (questão dois) para compra do produto na prateleira, foram citados atributos cor, quantidade de gordura,

odor, textura e suculência. Os participantes da primeira sessão mencionaram ser compensatório o consumo da carne de sol, pois a despeito do preço

mais elevado em relação ao mesmo corte cárneo fresco, a carne de sol é mais saborosa. Para descrever a aparência, em todas as sessões, o atributo cor foi lembrado, sendo que em termos de preferência, as opiniões predominaram positivas, para a carne de sol com coloração marrom-escura. A coloração avermelhada citada por alguns participantes como adequada foi criticada, sendo justificada por ser uma característica de carne fresca e não de carne de sol. Quando solicitado que as quatro amostras fossem ordenadas em ordem crescente, quanto à preferência, houve consenso entre o grupo de participantes das sessões dois e três. Os participantes da sessão um fizeram duas ordenações de preferência diferenciadas daquela proposta pelas outras sessões (**Tabela 3**).

**Tabela 3.** Ordenação das amostras de carne de sol segundo a preferência dos participantes nas sessões de *Focus Group*. João Pessoa, Paraíba, Brasil, 2015

| Sessão | 1ª ordenação | 2ª ordenação |
|--------|--------------|--------------|
| 1      | MP<H<M<S     | H<MP<M<S     |
| 2      | M<MP<H<S     | Não houve    |
| 3      | M<MP<H<S     | Não houve    |

S – Supermercado; MP – Mercado Público; H – Hipermercado; M – Mercadinho

Quanto à questão quatro (**Figura**), referenciando o aroma percebido de cada amostra após a cocção, houve opiniões bastante divergentes entre os grupos, porém o uso de descritores diferenciados sugeriu que havia uma diferença perceptível para este atributo. As amostras foram caracterizadas com o uso de adjetivos que remetem às características peculiares da carne de sol, de carne estragada, de atributos que lembram a carne fresca e também outros que descaracterizam o produto. Quanto à amostra originária de supermercado, foi mencionado que nenhum aroma foi detectado, segundo os participantes da sessão um. Nas amostras grelhadas em forno elétrico, pretendeu-se avaliar o sabor (questão cinco), a textura (questão sete) e a preferência quanto ao sabor (questão seis) e quanto à textura (questão oito), como referido na **Tabela 4**.

Esta tabela apresenta as opiniões dos participantes de cada sessão com relação aos atributos sensoriais mais significativos. Quanto à preferência, os participantes das sessões um e três, afirmaram que a amostra de hipermercado reunia o melhor conjunto de atributos e justificaram a escolha em termos de sabor e textura. Já os participantes da sessão dois, não foram unânimes neste quesito, e desta forma, para alguns integrantes do grupo, a amostra procedente do mercadinho seria a escolhida e, para os outros, seria aquela oriunda do supermercado.

**Tabela 4.** Atributos sensoriais da carne de sol relevantes segundo os participantes das sessões de *Focus Group*. João Pessoa, Paraíba, Brasil, 2015

| Sessão | Amostra | Reação do grupo                                                                                                                     |
|--------|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1      | S       | Sensação negativa quanto ao teor de sal (“muito salgada”);                                                                          |
|        | MP      | Sensação negativa quanto à aparência (“escura e seca”);<br>Sensação negativa quanto ao teor de sal (“pouco sal”);                   |
|        | H       | Impressão negativa quanto à aparência (“não é carne de sol”);<br>Sensação global positiva (“muito saborosa”), macia, pouco fibrosa; |
|        | M       | Sensação positiva quanto à textura e negativa quando julgada somente a aparência;                                                   |
| 2      | S       | Sensação positiva quanto ao teor de sal (“sal no ponto”), limpeza do corte satisfatória (“ausência de nervos e gordura”);           |
|        | MP      | Indiferente;                                                                                                                        |
|        | H       | Indiferente;                                                                                                                        |
| 3      | M       | Macia, suculenta e de textura agradável;                                                                                            |
|        | S       | Indiferente;                                                                                                                        |
|        | MP      | Sabor incipiente (“sabor distante”);                                                                                                |
|        | H       | Sensação global positiva (“saborosa”, “teor de sal médio”);                                                                         |
|        | M       | Textura agradável;                                                                                                                  |

S – Supermercado; MP – Mercado Público; H – Hipermercado; M – Mercadinho

## DISCUSSÃO

Com relação à caracterização físico-química, os resultados do presente estudo foram similares aos encontrados por Ishihara et al<sup>11</sup>, em que o teor de umidade permaneceu entre 70,52 e 74,28; proteínas, 21,86 e 23,73; cinzas, 4,40 e 5,09 e atividade de água entre 0,94 a 0,97, exceto para lipídeos que variou entre 0,35 e 0,53 g 100 g<sup>-1</sup>. O valor de atividade de água está relacionado diretamente com o equilíbrio entre sal, proteína e água no sistema cárneo<sup>25</sup>.

A CRA pode ser influenciada diretamente por íons presentes na matriz cárnea, neste caso, devido à presença de sal. Uma maior liberação de exsudado pode resultar em um baixo CRA e consequentemente em uma carne mais seca e com menor maciez. No caso da carne de sol, a redução da espessura muscular a partir do manteamento apresenta como objetivo acelerar a penetração do cloreto de sódio e a saída da umidade, conservando por um período de tempo superior. Neste caso, a umidade está diretamente relacionada com a CRA e a textura é uma consequência desses dois parâmetros, além de vários outros fatores, dentre eles, a própria interação entre as proteínas miofibrilares e moléculas de água, que influenciam o teor de retenção de água na carne<sup>26</sup>.

Este comportamento também pode ser observado na ocorrência da desnaturação de proteínas. A água é extremamente importante nas reações durante o armazenamento, sendo que sua porcentagem indica um dos parâmetros de qualidade da carne<sup>27</sup>. As propriedades de solubilidade das proteínas miofibrilares, particularmente miosina e actina, em presença de NaCl, podem influenciar diretamente na retenção de água e consequentemente na textura, devido às interações bioquímicas ocorridas<sup>9</sup>. Além disso, o tecido conjuntivo e as fibras musculares são estruturas que implicam no grau de maciez<sup>28</sup>.

O pH manteve-se dentro do padrão exigido pela Legislação Brasileira<sup>29</sup>, com média de 5,7, sendo este parâmetro de grande importância do ponto de vista microbiológico, para a deterioração do alimento. A concentração hidrogeniônica dificulta o desenvolvimento dos microrganismos deteriorantes e mesófilos, já que estes se desenvolvem em pH próximo da neutralidade, entre 6,5 a 7,5<sup>30</sup>. O pH influencia na CRA, sendo estes dois parâmetros diretamente proporcionais<sup>31</sup>.

Neste estudo, a amostra proveniente de supermercado foi a mais preferida de acordo com a

ordenação realizada (**Tabela 3**), apesar de apresentar um menor teor de umidade. Observou-se uma relação praticamente inversa entre a porcentagem de lipídeos, em relação às proteínas e umidade, concordando com resultados encontrados por Pedrão et al<sup>32</sup>.

Assim, a qualidade da carne pode ser presumida a partir do seu nível de maciez, que é considerado um fator decisivo da compra, mesmo sendo a textura uma das características mais difíceis de avaliar, devido a alta variabilidade pela influência dos diversos fatores, conforme mencionados anteriormente. Além disso, pode-se citar que a atividade de água, umidade e pH também são importantes para a manutenção do padrão higiênicossanitário do produto.

Em relação às análises sensoriais, pode-se afirmar que a coloração, sabor e textura foram os atributos mais relevantes, sendo o primeiro mencionado como sendo a característica determinante na decisão no momento da compra. Além disso, a amostra procedente do mercadinho apresentou um melhor conceito quanto ao sabor após cocção, embora tenha sido a preferida na segunda e terceira sessões quando avaliada ainda *in natura*, sem cozimento. Contrariamente, a amostra de supermercado embora tenha sido preferida quando *in natura*, foi rejeitada após cocção, o que indica que a aparência por si só não é suficiente para julgar a qualidade da carne de sol.

Conforme Morgan<sup>33</sup>, o moderador procura sempre atingir o máximo de tópicos sobre o assunto, além de promover uma discussão participativa sobre o produto, restringindo-se às questões de maior impacto possível, o que permitiu a discussão, introdução de novas perguntas e facilidade de interação entre o grupo do presente estudo, incentivando-o. Para melhor exploração dos tópicos a serem abordados, é importante que o moderador proponha algumas perguntas para iniciar o debate.

Em relação às respostas obtidas pelas sessões, primeiramente foi realizada a transcrição dos dados e, posteriormente, a interpretação e avaliação, buscando-se estabelecer associações entre os atributos e os parâmetros de qualidade, sendo os resultados avaliados através de metodologia estabelecida por Bryman<sup>34</sup>.

Em resposta à primeira questão proposta, o atributo sabor foi citado em todas as sessões, sendo que na primeira sessão, houve unanimidade em ser o sabor o fator principal desta escolha. O atributo praticidade, indicado por facilidade de preparo, foi

citado em todas as sessões, porém por um menor número de participantes. Outro aspecto bem lembrado pelos participantes após certo tempo de discussão foi o hábito cultural, que também influencia na escolha. No entanto, o processo de compra não depende somente da opinião do consumidor e pode ser afetado por outros fatores, tais como, classe social, influências externas e aspectos culturais<sup>35</sup>.

Os participantes da primeira sessão mencionaram ser compensatório o consumo da carne de sol, pois apesar do preço mais elevado em relação ao mesmo corte cárneo fresco, ela é mais saborosa. Quanto ao aspecto de atração do consumidor, foram citados os atributos cor, quantidade de gordura, odor, textura e suculência, sendo que, para todos os participantes, de todas as sessões, a coloração foi o primeiro atributo a ser mencionado, refletindo na aceitação do produto cárneo<sup>36</sup>. Isso pode ser justificado pela influência da capacidade de retenção de água sobre a cor, que pode sofrer variações conforme a intensidade de luz em consequência ao teor de água existente na matriz. Ou seja, a CRA vai influenciar sobre a luminosidade da carne, pois a quantidade de luz que será absorvida ou refletida depende diretamente da estrutura da superfície, bem como da localização de água no interior das fibras e do ponto isoelétrico das proteínas miofibrilares<sup>31</sup>.

Quanto aos parâmetros analíticos, a carne de sol apresenta mudança significativa na cor. A cura da carne, bem como a utilização de sais faz com que ocorra a formação da mioglobina, pigmento vermelho; metamioglobina e ferrohemocromo, ambas de cor castanha. Quanto aos efeitos do cloreto de sódio na variação da cor da carne fresca, este comportamento está relacionado basicamente aos mecanismos de aumento do potencial de oxidação da carne, levando à degradação do pigmento, e, este processo, juntamente com cloreto de sódio, desloca a reação no sentido da formação da metamioglobina<sup>37</sup>. Neste caso, para descrever a aparência, este atributo sempre está associado de forma positiva em termos de preferência, o que leva a predominância do termo “marrom-escuro”, cor característica da carne de sol, certamente por influências de experiências anteriores, sendo este o principal parâmetro de apreciação no momento da compra do produto<sup>38</sup>.

## CONCLUSÃO

Este estudo forneceu informações relevantes sobre as preferências em relação às carnes de sol oriundas de diferentes locais do varejo de João Pessoa, PB. De acordo com o grupo de 21 participantes, houve o levantamento das descrições das amostras avaliadas a partir do método de *Focus Group*, que foi coerente aos parâmetros físico-químicos obtidos. Desta maneira, a menor preferência das amostras de carne de sol *in natura* e a aceitação após cocção sugerem que o teor de umidade e a capacidade de retenção de água são parâmetros físico-químicos que influenciam diretamente nos atributos sensoriais deste produto. Além disso, as respostas obtidas confirmaram que a aparência por si só não é suficiente para julgar a qualidade da carne de sol.

Assim, concluiu-se que o uso da ferramenta de estudo qualitativo exploratório - *Focus Group* em associação aos parâmetros físico-químicos representaram métodos confiáveis na determinação de critérios para a interpretação do perfil de consumo da carne de sol. Desta maneira, a relação entre as medidas de qualidade da carne, seguindo critérios específicos, contribui para a tendência da pesquisa e consequentemente para a indústria, sendo de extrema importância no atendimento às preferências de um consumidor cada vez mais exigente em relação ao seu alimento.

## AGRADECIMENTOS

Os autores deste estudo agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Processo nº479934/2007-0 (Edital MCT/CNPq 15/2007 – Universal).

## REFERÊNCIAS

1. Bliska FMM. Qualidade na cadeia produtiva da carne bovina: elaboração e implementação de um sistema de controle. *Bol Cnc Indu CTC/ITAL*. 2000;9-10:12-16.
2. Della Lúcia SM, Minim VPR, Carneiro JDS. Análise sensorial de alimentos. *In: Minim, VPR, editor. Análise sensorial: estudos com consumidores*. Viçosa: UFV, 2006. p.13-48.

3. Nespolo CR, Oliveira FA, Pinto FST. Práticas em tecnologia de alimentos. Porto Alegre: Artmed; 2015.
4. Nielsen HB, Sonne AM, Grunert KG, Banati D, Pollák-Tóth A, Lakner Z et al. Consumer perception of the use of high-pressure processing and pulsed electric field technologies in food production. *Appetite*. 2009;52(1):115-26. <https://dx.doi.org/10.1016/j.appet.2008.09.010>
5. Vieira VA, Tibola F. Pesquisa qualitativa em marketing e suas variações: trilhas para pesquisas futuras. *Rev Adm Contemp*. 2005;9(2):9-33. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-65552005000200002>
6. Mazza VA, Melo NSFO, Chiesa AM. O grupo focal como técnica de coleta de dados na pesquisa qualitativa: relato de experiência. *Cogitare Enferm*. 2009;14(1):183-8. <http://dx.doi.org/10.5380/ce.v14i1.14486>
7. Krueger RA, Casey MA. *Focus Group: a practical guide for applied research*. 4.ed. Thousand Oaks: SAGE Publications; 2009.
8. Ngapo TM, Martin JF, Dransfield E. Consumer choices of pork chops: Results from three panels in France. *Food Qual Prefer*. 2004;15(4):349-59. [http://dx.doi.org/10.1016/S0950-3293\(03\)00082-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0950-3293(03)00082-X)
9. Menucci TA, Marciano MAM, Atui MB, Neto AP, Germano PML. Avaliação da contaminação por matérias estranhas em carne de sol comercializada em “casas do norte”. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2010;69(1):47-54. Disponível em: [http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/10/rial69\\_1\\_completa/1255.pdf](http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/10/rial69_1_completa/1255.pdf)
10. Yim DG, Choi KS, Kim JJ, Nam KC. Effects of *Salicornia herbacea* Powder on Quality Traits of Sun-Dried Hanwoo Beef Jerky during Storage. *Korean J. Food Sci. Technol*. 2013;33(2):205-13. <http://dx.doi.org/10.5851/kosfa.2013.33.2.205>
11. Ishihara Y, Moreira R, Souza G, Salviano A, Madruga M. Study of the warner-bratzler shear force, sensory analysis and sarcomere length as indicators of the tenderness of sun-dried beef. *Molecules*. 2013;18(8):9432-40. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules18089432>
12. Evangelista-Barreto NS, Miranda PC, Barbosa DC, Souza RHB, Santos MS. Hygienic sanitary conditions of sun dried meat marketed in Cruz das Almas, Bahia and detection of strains with antimicrobial resistance. *Semina: Ciênc Agrár*. 2014;35(3):1311-22. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2014v35n3p1311>
13. Massambani O, organizator. *Coletânea de respostas técnicas – Alimentos e bebidas*. São Paulo: Midiamix Editora Digital; 2009.
14. Nobre GMCR, Stroppa CT, Rabelo PG, Santos SS. Condições higiênico sanitárias de estabelecimentos produtores de carne-de-sol serenada, em município do norte de Minas Gerais. *Hig Aliment*. 2010;24(188/189):36-40.
15. Reolon CA, Silva SM. Condições higiênico-sanitárias de restaurantes do município de Medianeira, PR. *Hig Aliment*. 2009;23(174/175):52-7.
16. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional 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 União*. Brasília, DF, 16 set. 2004. Seção 1.(179):25-8. Disponível em: [https://bvsmms.saude.gov.br/bvms/saudelegis/anvisa/2004/res0216\\_15\\_09\\_2004.html](https://bvsmms.saude.gov.br/bvms/saudelegis/anvisa/2004/res0216_15_09_2004.html)
17. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº. 326, de 30 de julho de 1997. Aprova o Regulamento Técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 01 ago 1997. Seção 1(146):16560-3. Disponível em: [https://bvsmms.saude.gov.br/bvms/saudelegis/svs/1/1997/prt0326\\_30\\_07\\_1997.html](https://bvsmms.saude.gov.br/bvms/saudelegis/svs/1/1997/prt0326_30_07_1997.html)
18. Ministério da Agricultura e do Abastecimento (BR). Portaria nº 368, de 04 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos elaboradores/industrializadores de alimentos. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 09 set1997. Seção 1(172):19697- 9. Disponível em: <https://www.diariodasleis.com.br/busca/exibelinck.php?numlink=1-77-29-1997-09-04-368>
19. Nassu RT, Bernardi MRV, Borba H, Cruz GM. Metodologia científica: protocolo para avaliação sensorial de carne bovina. *Comunicado Técnico da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Pecuária Sudeste*; 2009. [acesso 2019 ago 01]. Disponível em:

- <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/579874/metodologia-cientifica-protocolo-para-avaliacao-sensorial-de-carne-bovina>
20. Meilgaard MC, Civille GV, Carr BT. *Sensory Evaluation Techniques*. 4<sup>th</sup>.ed. CRC Press: Boca Raton; 2006. <https://doi.org/10.1201/b16452>
  21. Horwitz W, Latimer GW. *Association of Official Analytical Chemistry – AOAC Official Methods of Analysis* 18<sup>th</sup>.ed. Gaithersburg: Association of Official Analytical Chemists-AOAC International; 2007.
  22. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Physiol Pharmacol*. 1959; 37(8):911-17. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
  23. Moura, OM. Efeito de métodos de insensibilização e sangria sobre características de qualidade da carne de rã-touro e perfil das indústrias de abate. [tese de doutorado]. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa; 1999. Disponível em: <https://locus.ufv.br/handle/123456789/8918>
  24. Mól WA. Comportamento do consumidor de carnes: um estudo exploratório sobre a imagem dos produtos. [dissertação de mestrado]. Belo Horizonte/MG: Universidade FUMEC; 2008. Disponível em: <https://repositorio.fumec.br/handle/123456789/263>
  25. Garcia CER, Yamashita F, Youssef EY, Prudencio SH, Shimokomaki M. Effect of carrageen an addition on the yield and functional properties of charqui (Jerked Beef). *Braz Arch Biol Technol*. 2013;56(2):311-8. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132013000200017>
  26. Youssef EY, Garcia CER, Yamashita F, Shimokomaki M. Chemical basis for beef charqui meat texture. *Braz Arch Biol Technol*. 2007;50(4):719-24. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132007000400018>
  27. Pardi MC, Santos IF, Souza ER, Pardi HS. *Ciência, higiene e tecnologia da carne: tecnologia da sua obtenção e transformação*. 2.ed. Goiânia (GO): Editora UFG; 2001.
  28. Ishihara YM, Madruga M. Tenderness indicators in salted and dried meat: a review. *Semina: Ciênc Agrár*. 2013;34(6 supl.2):3721-38. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2013v34n6Supl2p3721>
  29. Brasil. Atos do Poder Executivo. Decreto n. 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei n. 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. *Diário Oficial da União*. Brasília (DF), 30 mar. 2017, Seção 1 (62): 3-27. Disponível em: [https://www.in.gov.br/materia/-/asset\\_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/20134722/do1-2017-03-30-decreto-n-9-013-de-29-de-marco-de-2017-20134698](https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/20134722/do1-2017-03-30-decreto-n-9-013-de-29-de-marco-de-2017-20134698)
  30. Cecchi HM. *Fundamentos Teóricos e Práticos em Análise de Alimentos*. 2.ed rev. Campinas (SP): Editora da UNICAMP; 2003.
  31. Huff-Lonergan E, Lonergan SM. Mechanisms of water holding capacity of meat: the role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat Sci*. 2005;71(1):194-204. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.04.022>
  32. Pedrão MR, Lassance F, Souza NE, Matsushita M, Telles P, Shimokomaki M. Comparison of proximate chemical composition and texture of cupim, *Rhomboides m.* and *lombo*, *Longissimus dorsi m.* of Nelore (*Bos indicus*). *Braz Arch Biol Technol*. 2009;52(3):715-20. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132009000300023>
  33. Morgan DL. *Focus group as qualitative research*. Beverly Hills (CA): SAGE Publications; 1988.
  34. Bryman A. *Social Research Methods*. 4.ed. Oxford (UK): University Press; 2012.
  35. Kotler P. *Administração de marketing: a edição do novo milênio*. 10.ed. São Paulo (SP): Prentice Hall; 2000.
  36. Renner M. Review: biochemical basis of fresh meat color. *Proceeding of 45th International Congress of Meat Science and Technology*; august 1999; Yokohama, Japan; 2000. p.344-52.
  37. Sabadini E, Hubinger MD, Sobral PJA, Carvalho Jr BC. Alterações da atividade de água e da cor da carne no processo de elaboração da carne salgada desidratada. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2001;21(1):14-9. <http://doi.org/10.1590/S0101-20612001000100005>
  38. Muchenje V, Dzama K, Chimonyo M, Raats JG, Strydom PE. Meat quality of Nguni, Bonsmara and Aberdeen Angus steers raised on natural pasture in the Eastern Cape, South Africa. *Meat Sci*. 2008;79(1):20-28. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.07.026>



# Analysis of hemodialysis water quality from 2008 to 2016 in Minas Gerais, Brazil

## Análise da qualidade da água de hemodiálise durante o período de 2008 a 2016 em Minas Gerais, Brasil

RIALA6/1790

Priscila da COSTA<sup>1,4\*</sup>, Cláudia Aparecida de Oliveira e SILVA<sup>1</sup>, Flávio Rodrigues PEREIRA<sup>1</sup>, Gizele Barrozo RIBEIRO<sup>1</sup>, Fabíola Cristina Aquino SILVA<sup>2</sup>, João César da SILVA<sup>3</sup>, Bárbara Danielle Silva LOURENÇO<sup>3</sup>, Wagner Ferreira PINHEIRO<sup>4</sup>, Adriana Alves Pereira WILKEN<sup>4</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Laboratório de Química Bromatológica, Serviço de Química, Divisão de Vigilância Sanitária e Ambiental, Diretoria do Instituto Octávio Magalhães, Fundação Ezequiel Dias, Rua Conde Pereira Carneiro, 80, Belo Horizonte, MG, Brasil, CEP: 30510-010. Tel: 31 3314 4685. E-mail: [priscila.costa91@hotmail.com](mailto:priscila.costa91@hotmail.com)

<sup>2</sup>Laboratório de Contaminantes Metálicos, Serviço de Química, Divisão de Vigilância Sanitária e Ambiental, Fundação Ezequiel Dias

<sup>3</sup>Laboratório de Microbiologia de Águas e Endotoxinas de Produtos, Serviço de Microbiologia de Produtos, Divisão de Vigilância Sanitária e Ambiental, Fundação Ezequiel Dias

<sup>4</sup>Departamento de Ciência e Tecnologia Ambiental, Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais

Recebido: 16.04.2020 - Aceito para publicação: 01.10.2020

### ABSTRACT

Water quality requirements for hemodialysis are crucial for preventing health risks for renal patients. The objective of this study was to assess the quality of the water used for hemodialysis treatments in the state of Minas Gerais. The analytical results for 25 parameters in 1056 hemodialysis water samples from 89 renal dialysis units were analyzed. Data were obtained through the Minas Gerais Hemodialysis Unit Quality Monitoring Programme between July 2008 and December 2016. The effects of the Programme on patient health protection were assessed by evaluating compliance with legal limits and the efficacy of implementing inspections from 2012. Considering the 1056 samples analyzed, 264 (25%) presented at least one parameter in disagreement with current legislation. Conductivity (9.8%), endotoxin (6.9%), fluoride (4.2%) and heterotrophic bacteria (2.2%) were the most critical parameters. Nevertheless, the concentrations of all these parameters (except fluoride) decreased after implementing inspections. The average levels of 15 parameters decreased throughout the study period. The annual percentage of non-compliance decreased from 44% in 2008 to 23% in 2016. It was verified the relevance of the implementation of the Program in the prevention of possible disorders to the patients' health, indicating the importance of its continuity.

**Keywords.** renal insufficiency chronic, renal dialysis, water quality, health surveillance, public health.

### RESUMO

Os requisitos de qualidade da água para a hemodiálise são cruciais para prevenir riscos à saúde de pacientes renais. O objetivo foi avaliar a qualidade da água utilizada nos tratamentos de hemodiálise em Minas Gerais. Os dados foram obtidos por meio do Programa de Monitoramento da Qualidade dos Serviços de Hemodiálise do Estado entre julho de 2008 e dezembro de 2016. Os resultados analíticos para 25 parâmetros em 1056 amostras de água em hemodiálise de 89 unidades renais foram analisados. Os efeitos do Programa na saúde dos pacientes foram avaliados através da conformidade dos limites legais e da eficácia da implementação de inspeções a partir de 2012. Considerando-se as 1056 amostras analisadas, 264 (25%) apresentaram pelo menos um parâmetro em desacordo com a legislação vigente. Condutividade, endotoxina, fluoreto e bactérias heterotróficas foram os parâmetros mais críticos. No entanto, as concentrações de todos esses parâmetros (exceto flúor) diminuíram após a implementação das inspeções. Os níveis médios de 15 parâmetros diminuíram ao longo do período do estudo. O percentual anual de não conformidade diminuiu de 44% (2008) para 23% (2016). Verificou-se a relevância da implantação do Programa na prevenção de possíveis transtornos à saúde dos pacientes, indicando a importância de sua continuidade.

**Palavras-chave.** insuficiência renal crônica, hemodiálise, qualidade da água, vigilância sanitária, saúde pública.

## INTRODUCTION

Chronic renal failure consists of the progressive and irreversible loss of kidney function, and can be caused by various disorders that affect a large number of people worldwide, such as high blood pressure, diabetes, chronic kidney inflammation, among others<sup>1,2</sup>. Affecting between 8 and 16% of the world population, kidney disease can be considered one public health problem<sup>1</sup>. Monitoring the quality of water for hemodialysis is of great relevance for public health and a fundamental tool for the prevention of risks to the health of renal patients<sup>2</sup>.

When the kidneys are not able to maintain electrolyte balance and remove toxic substances from the body, hemodialysis treatment is available to perform these functions<sup>2</sup>. In Brazil, the characteristics of the water to be used in procedures of hemodialysis must be compatible with the quality requirements established by Board of Directors Resolution (RDC) n° 11 (13/03/2014) of the National Sanitary Surveillance Agency (ANVISA)<sup>3</sup>.

Minas Gerais is located in the southeast region of Brazil and is the 2<sup>nd</sup> most populous state in the country<sup>4</sup>. According to the Brazilian Chronic Dialysis Survey, the estimated annual average number of new patients increased in 2017, being more than 40 thousand for the first time, and only two states (São Paulo and Minas Gerais) received almost 37% of new patients<sup>5</sup>. In addition, in the past 15 years, the number of Brazilian patients with chronic kidney disease has increased 4.2 times more than the number of active dialysis units<sup>5</sup>.

To ensure that water for hemodialysis poses no adverse risks to patients, the Minas Gerais State Health Surveillance (Vigilância Sanitária – VISA) agency, in a joint initiative with the Ezequiel Dias Foundation (FUNED), performs annual inspections as a key external quality control tool to assess compliance with legal limits through the Minas Gerais Hemodialysis Unit Quality Monitoring Programme<sup>6</sup>.

In Brazil, the most significant event to highlight the importance of hemodialysis water quality control occurred in 1996 at the Institute of Kidney Diseases in Caruaru, Pernambuco, where the water used for hemodialysis was contaminated with microcystin, causing the death of 65 hemodialysis patients<sup>7</sup>. Therefore, hemodialysis water quality monitoring plays a key role in controlling and reducing risk factors and protecting public health.

Previous studies have reported the results of quality monitoring programmes for hemodialysis water in another countries<sup>8-11</sup>. In Brazil, only a small number of these studies have been published, involving only a few states<sup>12-15</sup>. No studies on similar monitoring programmes conducted in the state of Minas Gerais have been published thus far. So, considering the relevance of this subject, the objective was to assess the quality of the water used for hemodialysis treatments in Minas Gerais state and evaluate the effectiveness of the monitoring programme in reducing risks to dialysis patients.

## MATERIAL AND METHODS

The Minas Gerais Hemodialysis Unit Quality Monitoring Programme was implemented to monitor all renal dialysis units located in the State. It started in 2002 and remained in operation until late 2011 to act as guidance; that is, upon evidence of non-compliance, the renal dialysis unit was guided by VISA to adopt necessary measures to correct the irregularities. From 2012, the programme began operating through inspections with the implementation of administrative proceedings and other legal actions, citing the occurrence of non-compliance as a sanitary infraction<sup>16-19</sup>. In cases of non-conformities, the interdiction of renal dialysis units helped to ensure the safety of hemodialysis patients, constituting a key implication of the programme.

### Samples and parameters evaluated

The results of 1056 hemodialysis water samples from 89 renal dialysis units registered in the programme and located in the 12 mesoregions of Minas Gerais, collected between July 2008 and December 2016, were assessed. The samples were collected, at least once a year, by trained VISA technicians at the capillary processing room of each renal dialysis unit and were sent to FUNED to analyse 25 quality parameters established by ANVISA RDC n°11/2014<sup>3</sup>.

The samples were analysed according to the analytical methods described by the Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater<sup>20</sup> and the United States Pharmacopeia<sup>21</sup> and by recommended analytical conditions and general information. Importantly, ANVISA RDC n°154/2004<sup>22</sup> was revoked by ANVISA RDC n° 11/2014<sup>3</sup>, which changed the maximum permitted levels (MPLs) for bacterial endotoxin and heterotrophic bacteria.

The results were compared with the MPLs established by the law in force in each study period<sup>3,22</sup>. The limits of quantification (LQs) considered in the processes of intra-laboratory validation of the respective methods were specified according to the Document de Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos (Guideline on Validation of Analytical Methods)<sup>23</sup> (Table 1).

**Table 1.** Hemodialysis water quality parameters, maximum permitted levels (MPLs), according to ANVISA RDC n° 154/2004<sup>a</sup> and n° 11/2014, and limits of quantification (LQs) considered in this study

| Parameter                                               | MPL     | LQ     |
|---------------------------------------------------------|---------|--------|
| Electrolytic conductivity (µS/cm)                       | 10.0    | 1.0    |
| Fluoride (mg/L)                                         | 0.20    | 0.20   |
| Nitrate (mg/L)                                          | 2.0     | 0.5    |
| Sulphate (mg/L)                                         | 100     | 50     |
| Endotoxin <sup>b</sup> (EU/mL)                          | 2.0     | 0.50   |
| Endotoxin <sup>c</sup> (EU/mL)                          | 0.250   | 0.125  |
| Total coliforms <sup>d</sup> (Absence in 100 mL)        | Absence | -      |
| Heterotrophic bacteria <sup>b</sup> (UFC/mL)            | 200     | 1      |
| Heterotrophic bacteria <sup>c</sup> (UFC/mL)            | 100     | 1      |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <sup>c</sup> (NMP/100 mL) | -       | 1.1    |
| Barium (mg/L)                                           | 0.10    | 0.05   |
| Calcium (mg/L)                                          | 2.0     | 0.5    |
| Copper (mg/L)                                           | 0.10    | 0.05   |
| Magnesium (mg/L)                                        | 4.0     | 0.5    |
| Potassium (mg/L)                                        | 8.0     | 0.5    |
| Sodium (mg/L)                                           | 70.0    | 0.5    |
| Zinc (mg/L)                                             | 0.10    | 0.05   |
| Antimony (mg/L)                                         | 0.0060  | 0.0008 |
| Arsenic (mg/L)                                          | 0.0050  | 0.0008 |
| Mercury (mg/L)                                          | 0.0002  | 0.0002 |
| Selenium (mg/L)                                         | 0.0900  | 0.0008 |
| Beryllium (mg/L)                                        | 0.0004  | 0.0001 |
| Cadmium (mg/L)                                          | 0.001   | 0.0005 |
| Lead (mg/L)                                             | 0.005   | 0.001  |
| Chromium (mg/L)                                         | 0.014   | 0.001  |
| Silver (mg/L)                                           | 0.005   | 0.001  |
| Thallium (mg/L)                                         | 0.002   | 0.001  |

Legend: <sup>a</sup>Regarding the parameters bacterial endotoxin and heterotrophic bacteria. <sup>b</sup>Regarding the 2008-2013 period, in accordance with ANVISA RDC n° 154/2004. <sup>c</sup>Regarding the 2014-2016 period, in accordance with ANVISA RDC n° 11/2014. <sup>d</sup>Qualitative parameter; therefore, LQ is not applied. <sup>e</sup>Parameter not mentioned in the law but whose monitoring is recommended by the United States Pharmacopoeia

The MPLs established in the Brazilian standard are in line with those determined by the United States Pharmacopoeia, except for the *Pseudomonas aeruginosa* parameter. This quality index is not included in ANVISA RDC n° 11/2014, but its routine monitoring is recommended by the United States Pharmacopoeia because this is the pathogen genus most frequently found in hemodialysis water<sup>3,21,24</sup>.

The percentages of samples with results lower than the LQ, between the LQ and the MPL, and higher than the MPL were determined for each parameter, and the levels of bacterial endotoxin and heterotrophic bacteria were analysed in two historical data series according to the legislation in force in the different periods (2008-2013 and 2014-2016).

### Statistical analysis

Data normality was assessed using the Shapiro-Wilk test, and homogeneity of variance was assessed using the F-test. The efficacy of implementing inspections was determined by comparing the medians (Mann-Whitney U test) between samples that were analysed for guidance (group 1; 2008-2011) and those analysed for inspection (group 2; 2012-2016). Importantly, comparisons between the guidance and inspection samples were not performed for tests with a median lower than the LQ (and, therefore, unquantifiable), tests with zero variability or for categorical variables.

The level of correlation between all water quality parameters throughout the monitoring period was also analysed using the Spearman's rank correlation test. The renal dialysis units were numerically ordered (from 1 to 89) to assess the occurrence of non-compliant samples among units and respective mesoregions, identifying the most critical cases, i.e., those with percentages of non-compliance higher than 25%. The significance level of all statistical tests was set to 5% ( $\alpha = 0.05$ ), and the statistical software packages used were R software (version 3.4.2) and Excel (version 2013).

## RESULTS

Table 2 outlines the number of hemodialysis water samples whose results were lower than the LQ, between the LQ and the MPL, and higher than the MPL, for each respective parameter.

**Table 2.** Number of findings lower than the limit of quantification (LQ), between the LQ and the maximum permitted level (MPL), and higher than the MPL defined in ANVISA RDC n° 154/2004<sup>a</sup> and n° 11/2014 for each parameter

| Parameter                                    | < LQ         | ≥ LQ and ≤ MPL | > MPL      | Total number of samples |
|----------------------------------------------|--------------|----------------|------------|-------------------------|
| Conductivity (µS/cm)                         | 5 (0.5%)     | 923            | 101 (9.8%) | 1029                    |
| Fluoride (mg/L)                              | 711 (95.2%)  | 5 <sup>b</sup> | 31 (4.2%)  | 747                     |
| Nitrate (mg/L)                               | 633 (91.1%)  | 58             | 4 (0.6%)   | 695                     |
| Sulphate (mg/L)                              | 816 (99.4%)  | 5              | 0          | 821                     |
| Bacterial endotoxin <sup>c</sup> (EU/mL)     | 646 (91.5%)  | 14             | 46 (6.5%)  | 706                     |
| Bacterial endotoxin <sup>d</sup> (EU/mL)     | 268 (81.5%)  | 36             | 25 (7.6%)  | 329                     |
| Bacterial endotoxin (total)                  | 914 (88.3%)  | 50             | 71 (6.9%)  | 1035                    |
| Heterotrophic bacteria <sup>c</sup> (UFC/mL) | 345 (49.2%)  | 347            | 10 (1.4%)  | 702                     |
| Heterotrophic bacteria <sup>d</sup> (UFC/mL) | 188 (58.0%)  | 123            | 13 (4.0%)  | 324                     |
| Heterotrophic bacteria (total)               | 533 (52.0%)  | 470            | 23 (2.2%)  | 1026                    |
| Total coliforms (Absence in 100 mL)          | -            | -              | 20 (2.0%)  | 1026                    |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (NMP/100 mL)   | 385 (47.5%)  | -              | -          | 811                     |
| Calcium(mg/L)                                | 999 (98.2%)  | 12             | 6 (0.6%)   | 1017                    |
| Sodium (mg/L)                                | 420 (41.3%)  | 594            | 4 (0.4%)   | 1018                    |
| Zinc (mg/L)                                  | 1000 (99.8%) | 0              | 2 (0.2%)   | 1002                    |
| Chromium (mg/L)                              | 697 (99%)    | 6              | 1 (0.1%)   | 704                     |
| Silver (mg/L)                                | 787 (99.8%)  | 1              | 1 (0.1%)   | 789                     |
| Antimony (mg/L)                              | 674 (99.6%)  | 3              | 0          | 677                     |
| Arsenic (mg/L)                               | 780 (99.6%)  | 3              | 0          | 783                     |
| Barium (mg/L)                                | 997 (100.0%) | 0              | 0          | 997                     |
| Beryllium (mg/L)                             | 728 (99.2%)  | 6              | 0          | 734                     |
| Cadmium (mg/L)                               | 811 (100%)   | 0              | 0          | 811                     |
| Lead (mg/L)                                  | 807 (99.4%)  | 5              | 0          | 812                     |
| Copper (mg/L)                                | 1011 (99.3%) | 7              | 0          | 1018                    |
| Magnesium (mg/L)                             | 978 (99.2%)  | 8              | 0          | 986                     |
| Mercury (mg/L)                               | 264 (100%)   | 0              | 0          | 264                     |
| Potassium (mg/L)                             | 943 (97.7%)  | 22             | 0          | 965                     |
| Selenium (mg/L)                              | 622 (99%)    | 6              | 0          | 628                     |
| Thallium (mg/L)                              | 767 (100%)   | 0              | 0          | 767                     |

Legend: <sup>a</sup>Regarding the parameters bacterial endotoxin and heterotrophic bacteria. <sup>b</sup>Samples whose value of fluoride was exactly the LQ (LQ = MPL). <sup>c</sup>Results regarding the period from 2008 to 2013 according to the MPL established by ANVISA RDC n° 154/2004, then in force. <sup>d</sup>Results regarding the period from 2014 to 2016 according to the MPL established by ANVISA RDC n° 11/2014

**Table 3** outlines the results from the comparison of medians between the guidance (2008-2011) and inspection (2012-2016) periods of operation of the programme (Mann-Whitney U Test).

The renal dialysis units and the results from the analysed samples were grouped into 12 mesoregions of Minas Gerais according to the

divisions established by the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE)<sup>25</sup> and also outlines the renal dialysis units registered in the programme (ordered from 1 to 89), their respective mesoregions and the total numbers of analysed and unsatisfactory (higher than the MPL) samples from each mesoregion (**Table 4**).

**Table 3.** Comparisons of parameter medians between the guidance and inspection monitoring periods (from 2008 to 2011 and from 2012 to 2016, respectively) (Mann-Whitney U Test)

| Parameter                    | Median value |             | p-value |
|------------------------------|--------------|-------------|---------|
|                              | 2008 - 2011  | 2012 - 2016 |         |
| Conductivity                 | 8.3          | 4.9         | 0.011*  |
| Silver                       | 0.001        | < LQ        | 0.111   |
| Sodium                       | 1.617        | 0.952       | 0.251   |
| Bacterial Endotoxin          | 0.45         | 0.21        | 0.000*  |
| Heterotrophic bacteria       | 14.2         | 11.5        | 0.004*  |
| <i>Pseudomonas eruginosa</i> | 1.14         | < LQ        | 0.000*  |

Legend: \*Significant difference between medians ( $p < 0.05$ ; Mann-Whitney U Test)

**Table 4.** Mesoregions of Minas Gerais (n = 12), number of renal dialysis units registered in the Minas Gerais Haemodialysis Unit Quality Monitoring Programme (n = 89), renal dialysis units (and theirs codes), number of samples analysed from 2008 to 2016 (n = 1056), and number and percentage of unsatisfactory samples in each mesoregion

| Mesoregion of Minas Gerais             | Renal dialysis units | Unit code <sup>a</sup> | Analysed samples | Unsatisfactory samples |
|----------------------------------------|----------------------|------------------------|------------------|------------------------|
| Campo das Vertentes                    | 3                    | 1 to 3                 | 38               | 12 (32%)               |
| Central Mineira                        | 2                    | 4 and 5                | 17               | 8 (47%)                |
| Jequitinhonha                          | 2                    | 6 and 7                | 21               | 8 (38%)                |
| Metropolitan Area of Belo Horizonte    | 24                   | 8 to 31                | 314              | 64 (20%)               |
| Northwestern Minas Gerais              | 2                    | 32 and 33              | 26               | 22 (85%)               |
| Northern Minas Gerais                  | 6                    | 34 to 39               | 73               | 31 (43%)               |
| Western Minas Gerais                   | 4                    | 40 to 43               | 43               | 3 (7%)                 |
| Southern and Southwestern Minas Gerais | 14                   | 44 to 57               | 155              | 39 (25%)               |
| Triângulo Mineiro and Alto Paranaíba   | 15                   | 58 to 72               | 160              | 37 (23%)               |
| Mucuri Valley                          | 2                    | 73 and 74              | 24               | 10 (42%)               |
| Doce River Valley                      | 4                    | 75 to 78               | 52               | 10 (19%)               |
| Zona da Mata                           | 11                   | 79 to 89               | 133              | 20 (15%)               |
| Total                                  | 89                   | 89                     | 1056             | 264 (25%)              |

Legend: <sup>a</sup>Units identified as the most critical: 1, 5, 6, 32, 39, 57, 70 and 73

## DISCUSSION

Internationally, hemodialysis procedures are defined according to International Standard ISO n° 13.959 dated April 15, 2009<sup>26</sup>. The parameters established in this international standard are also equivalent to those defined by the Brazilian standard and list the same maximum permitted levels, except for the conductivity and total coliform parameters, for which no reference values are defined internationally<sup>26,27</sup>. Importantly, the 2008 revision of ISO n° 13.959/2009 lowered the endotoxin limit in hemodialysis water (0.25 EU/mL), thereby setting a more restrictive value, which was already adopted

by the European Pharmacopoeia<sup>27</sup>. However, this MPL was adopted into Brazilian law only in 2014<sup>3</sup>.

Of the total number of samples analysed (1056), 264 (25%) had at least one quality parameter that did not meet the standard of the law in force (**Table 2**). Indeed, the percentage of contaminated samples may be considered worrying because they accounted for one quarter of all hemodialysis water samples. Furthermore, the patients subjected to hemodialysis were immunocompromised, and the contaminated dialysate would directly reach the bloodstream, which could easily and quickly affect the gastrointestinal areas, causing diarrhoea, pain, other various disorders and even death<sup>24</sup>.

The results also showed that conductivity, endotoxin, fluoride and heterotrophic bacteria had the highest percentage of non-compliance, ranging from 2.2 to 9.8%. Conductivity had the highest percentage of values above the legal limit (9.8%), followed by endotoxin (6.9%) and fluoride (4.2%) (Table 2).

Depending on the concentration of oxygen dissolved in the aquatic environment, algae and cyanobacteria can be present in several water courses, in addition to water reservoirs. Cyanobacteria are easily adaptable in different environments lacking nutrients and oxygen or even with high concentrations of heavy metals. In addition, some species excrete organic compounds that can attribute taste to the water and, in excessive concentrations, even toxicity<sup>28,29</sup>. The toxins produced by cyanobacteria differ according to their level of action in the human body, and among the toxins produced, endotoxins stand out.

As exposed by Ramirez<sup>30</sup>, in the dialysate, bacterial growth can be intensified due to the presence of components such as glucose and bicarbonate, resulting in high levels of endotoxins. Due to the pore diameter of the semi permeable membranes used in the treatment of hemodialysis, it is unlikely that microorganisms will be able to overcome it, unlike its toxins.

The contact of water for hemodialysis contaminated by endotoxin with the blood of renal patients can lead to several pyrogenic reactions such as fever, chills, hypotension, malaise, tremors and nausea, or even long-term complications such as cachexia (extreme degree of weakness) and amyloidosis (abnormal protein accumulation in cell organs and tissues)<sup>31</sup>. In addition, contamination by high levels of endotoxins directly into the bloodstream is generally fatal<sup>24</sup>.

In most samples (95.2%), the fluoride levels were not quantified and consequently were lower than the MPL (LQ = MPL). For conductivity, only 0.5% of samples were lower than the LQ of the method. The percent non-compliance of the other parameters was lower and mostly ranged from to 1%. For most parameters, greater than 97% of the results were lower than the LQs (Table 2).

Two high and discrepant values were found for the conductivity parameter in 2010

(104 and 730  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ). These divergent results in 2010 came from the same dialysis service in the southern and south western regions of Minas Gerais regarding samples collected in the months of March and October.

This indicates that the results may be related to problems with Hemodialysis Water Treatment and Distribution System (STDAH), since the observed values are similar to the conductivity of natural waters (100 to 1000  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) and, not working properly, STDAH may not have been efficient in the treatment of water and, consequently, in the reduction of the original conductivity<sup>29</sup>.

No sulphate results were higher than the MPL. In the nitrate test, only four samples (0.6%) showed unsatisfactory results. Most sulphate (99.4%) and nitrate (91.1%) results were lower than the LQs. Additionally, there were no non-compliant results for the following parameters: antimony, arsenic, barium beryllium, cadmium, lead, copper, magnesium, mercury, potassium, selenium and thallium.

The microbiological parameters also had a high percentage of results that were lower than the LQs, including 914 samples (88.3%) for endotoxins, 533 (52%) for heterotrophic bacteria and 385 (47.5%) for *Pseudomonas aeruginosa*. There were 20 unsatisfactory samples (2%) for total coliforms found throughout the study period (Table 2).

The present study has indicated that some parameters were critical when analysing the results from the monitoring performed by the Minas Gerais Hemodialysis Unit Quality Monitoring Programme. Among them, conductivity, fluoride and microbiological parameters are notable. This suggests that these parameters could be used in preliminary tests and could be assessed before the remaining parameters. In general, most of the other results were lower than LQs, thus highlighting the high percentage of compliance among the study samples.

The annual average levels of 15 quality parameters were negatively correlated with the total monitoring time, and ten of these correlations were significant ( $p < 0.05$ ; Spearman's rank correlation test). The parameters with the most significant negative correlations were endotoxin (-0.594) and *Pseudomonas aeruginosa* (-0.825). Overall, the hemodialysis water quality has improved in the state of Minas Gerais throughout the years of programme monitoring.

For four parameters, significant decreases in the median concentration between the guidance (from 2008 to 2011) and inspection (from 2012 to 2016) periods of operation were also observed ( $p < 0.05$ ; Mann-Whitney U Test) (**Table 3**). These differences were observed in some of the critical parameters (conductivity, bacterial endotoxin and heterotrophic bacteria). This demonstrates the efficacy of changing the type of programme (from guidance to inspection) and its contribution to improving the quality of the water used for hemodialysis.

Total non-compliance decreased from 44% (2008) to 23% (2016). This indicated a general trend of improvement in meeting the limits established by ANVISA RDC nº 11/2014 and a consequent reduction in the percentage of un satisfaction for all the parameters analysed in the study period. This find highlights the role of the monitoring in preventing health problems in the patients, and the importance of continuing the Program in Minas Gerais state.

Although there was an absence of data regarding the monitoring of water quality for hemodialysis in the state of Minas Gerais, there are some studies regarding monitoring carried out in other regions of Brazil. As exposed by a study was carried out in São Paulo about the Monitoring Program for Treated Water for Hemodialysis<sup>13</sup>, similar to the existing Program in Minas Gerais. Despite the fact that it did not include all the hemodialysis services in the State, it showed a significant improvement in the quality standard between the study period (2007 and 2008), in relation to compliance with legal provisions.

In Natal, Rio Grande do Norte, a study was also carried out in several dialysis services in the State, between October 2012 and March 2013. The authors concluded that the evaluation contributed to the knowledge of the reality of the water quality situation for hemodialysis in the State and that there is a need for constant monitoring to ensure the adequacy of the systems, in order to eliminate probable risk factors<sup>14</sup>.

In another study carried out in São Luís, Maranhão, the presence of contaminants in the water used in the treatment of hemodialysis was found in 70% of the evaluated hospital units, among which bacterial endotoxin, heterotrophic bacteria and *Pseudomonas aeruginosa* stand out. The results

therefore indicated the need to review the water quality control procedures for hemodialysis in the referred hospital units<sup>15</sup>.

In a study carried out in Recife, Pernambuco, 359 laboratory reports from a hemodialysis clinic in the city, referring to the period between January and December 2011, were evaluated. In general, satisfactory results were found. However, it was stated that the referred satisfaction, by itself, does not guarantee adequate quality, being essential the continuity of the monitoring actions in all stages of treatment until the arrival at the patient<sup>31</sup>. Thus, it is necessary to establish assessment tools and systematic maintenance of STDAH, in order to ensure safety and quality of services.

The analysis by state mesoregion showed that although north-western Minas Gerais had one of the lowest numbers of renal dialysis units registered in the programme (two), this mesoregion had the highest percentage of non-compliance (84.6%). Among the 22 unsatisfactory samples from this mesoregion, 15 (68.2%) were from the same renal dialysis unit (unit 32; **Table 4**).

The results also showed that eight unsatisfactory samples from the Central Mineira mesoregion (47.1%) were from the same renal dialysis unit (unit 5). Of the 31 unsatisfactory samples from the northern Minas mesoregion, 12 of were from unit 39 (38.7%). In addition, ten unsatisfactory samples from the Mucuri Valley mesoregion were from renal dialysis unit 73 (**Table 4**).

Unit 6 of the Jequitinhonha mesoregion had six (75.0%) of the eight unsatisfactory samples of this mesoregion. The results also showed that nine (75.0%) of the 12 unsatisfactory samples of the Campo das Vertentes mesoregion were from renal dialysis unit 1, and ten (25.6%) of the 39 non-compliant samples of southern and southeaster Minas Gerais mesoregion were from unit 57. Of the 37 unsatisfactory samples of the Triângulo Mineiro and Alto Paranaíba mesoregion, 13 (35.1%) were from unit 70 (**Table 4**).

Among the Campo das Vertentes, Central Mineira, Jequitinhonha, north-western Minas, northern Minas, southern and southwestern Minas, Triângulo Mineiro and Alto Paranaíba, and Mucuri Valley mesoregions, one renal dialysis unit from each mesoregion showed a high percentage of

unsatisfactory samples (higher than 25%, which was the overall mean of unsatisfactory samples), totalling eight (67%) units that were considered to be critical. This indicates the possible existence of sporadic problems in these units and in the final quality of the water for hemodialysis, requiring a more systematic monitoring of future samples to be collected in these areas.

Finally, as the technologies associated with hemodialysis treatment develop, renal therapy is increasingly perfected, being, therefore, a health treatment in increasing evolution. Thus, it is emphasized the importance of dialysis services reporting their results of water quality surveillance aiming at the safety of the renal patient's health. It is necessary to establish, more than analytical monitoring practices, tools for the assessment of said monitoring and systematic maintenance of STDAH, in order to ensure safety and quality of services<sup>6</sup>.

## CONCLUSION

The present study indicated the relevance of particular parameters of the monitoring conducted within the Minas Gerais Hemodialysis Unit Quality Monitoring Programme, among which conductivity, fluoride and microbiological parameters are notable. The low variability and absence of non-compliant samples observed for most chemical components indicates that the other parameters are not critical for monitoring hemodialysis water. Therefore, the analytical tests that are routinely performed by the programme must be evaluated because testing only the most critical parameters as a preliminary screening could cut costs for the state without having negative health implications for renal patients.

The negative correlations assessed between parameters and monitoring years, as well as the decrease in the medians between the guidance and inspection periods indicate the role of the sanitary surveillance activities in protecting the health of renal patients at Minas Gerais state. In addition, the identification of renal dialysis units that recurrently failed to meet the legal limits suggests the need for a more consistent operation of the inspection bodies to ensure the safety of renal patients and to avoid their exposure to risks during treatment.

In general, the results showed that the quality of the water treated for hemodialysis in the state of Minas Gerais in the study period (from 2008 to 2016) improved in meeting the standards established by ANVISA. However, considering the gravity associated with the use of inadequate water, the finding of 25% non-compliant samples cannot be disregarded and indicates the importance of continuingly monitoring these parameters to ensure the safety of renal patients. Finally, the results of the present study indicate the importance of continuing the programme, especially inspections, which are key tools for controlling the quality of the water that is used for hemodialysis in the state of Minas Gerais.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the FUNED Chemistry and Microbiology Product Unit laboratories that were involved in the present study for sharing their monitoring data and the CEFET-MG for funding this research.

## REFERENCES

1. Medeiros MCWC, Sá MPC. Adesão dos portadores de doença renal crônica ao tratamento conservador. *Rev Rene*. 2011;12(1):65-72. Disponível em: <http://periodicos.ufc.br/rene/article/view/4135>
2. Menezes FG, Barreto DV, Abreu RM, Roveda F, Pecoits Filho RFS. Panorama do tratamento hemodialítico financiado pelo Sistema Único de Saúde – Uma perspectiva econômica. *J Bras Nefrol*. 2015;37(3):367-78. <https://doi.org/10.5935/0101-2800.20150057>
3. Ministério da Saúde (BR). 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(50):40-2.
4. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Tabelas - População nos Censos Demográficos, segundo as Grandes Regiões e as Unidades da Federação. Censo 2010. [acesso 2020 Out 01]. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/>

- [sociais/populacao/9662-censo-demografico-2010.html?=&t=resultados](https://doi.org/10.1111/sdi.12113)
5. Thomé FS, Sesso RC, Lopes AA, Lugon JR, Martins CT. Brazilian chronic dialysis survey 2017. *J Braz Nefrol*. 2019;41(2):208-14. <https://doi.org/10.1590/2175-8239-JBN-2018-0178>
  6. Coulliette AD, Arduino MJ. Hemodialysis and water quality. *Semin Dial*. 2013;26(4):427-38. <https://doi.org/10.1111/sdi.12113>
  7. Pouria S, Andrade A, Barbosa J, Cavalcanti RL, Barreto VT, Ward CJ et al. Fatal microcystin intoxication in hemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *Lancet*. 1998;352(9121):21-6. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)12285-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)12285-1)
  8. Jha V, Chugh KS. The practice of dialysis in the developing countries. *Hemodial Int*. 2003;7(3):239-49. <https://doi.org/10.1046/j.1492-7535.2003.00044.x>
  9. Braimoh RW, Mabayoje MO, Amira CO, Coker H. Quality of hemodialysis water in a resource-poor country: The Nigerian example. *Hemodial Int*. 2012;6(4):532-8. <https://doi.org/10.1111/j.1542-4758.2012.00682.x>
  10. Al-Naseri SK, Mahdi ZM, Hashim MF. Quality of water in hemodialysis centers in Baghdad, Iraq. *Hemodial Int*. 2013;17:517-22. <https://doi.org/10.1111/hdi.12027>
  11. Braimoh RW, Mabayoje MO, Amira CO, Bello BT. Microbial quality of hemodialysis water, a survey of six centers in Lagos, Nigeria. *Hemodial Int*. 2014;18(1):148-52. <https://doi.org/10.1111/hdi.12070>
  12. Buzzo ML, Bugno A, Almodovar AAB, Kira CS, Carvalho MFH, Souza A et al. A importância de programas de monitoramento da qualidade da água para diálise na segurança dos pacientes. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2010;69(1):1-6. Disponível em: [http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/10/rial69\\_1\\_completa/1249.pdf](http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/10/rial69_1_completa/1249.pdf)
  13. Marcatto MISJ, Grau MAF, Müller NCS. Projeto de reativação e implantação do Programa de Monitoramento da Água Tratada para Hemodiálise do Estado de São Paulo. *Bepa*. 2010;7(74):6-12. Disponível em: <http://periodicos.ses.sp.bvs.br/pdf/bepa/v7n74/v7n74a02.pdf>
  14. Souza AB, Mendonça AEO, Xavier SSM, Costa IKF, Torres GV. Caracterização dos pacientes com IRC em tratamento hemodialítico em uma clínica privada em Natal/RN. *Rev Cient FIEP*. 2010;80(2):1-6.
  15. Lima JRO, Marques SG, Gonçalves AG, Salgado Filho N, Nunes PC, Silva HS et al. Microbiological analyses of water from hemodialysis services in São Luís, Maranhão, Brazil. *Braz J Microbiol*. 2005;36(2):103-8. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822005000200001>
  16. Oliveira ICP, Santana SRG, Almeida S, Lima TBB, Santana VN, Marinho CLC. A legislação sanitária e a qualidade da água nas clínicas de hemodiálise de Salvador. *Rev Baiana Saúde Pública*. 2005;29(supl.1):57-65.
  17. Fundação Ezequiel Dias (Belo Horizonte - Brasil). Manual de coleta de amostras. 4.rev. Belo Horizonte (MG): Fundação Ezequiel Dias; 2019. Disponível em: <http://www.funed.mg.gov.br/wp-content/uploads/2018/10/Manual-da-Qualidade-DIOM-DIVISA-SGA-MQ-0001-1.pdf>
  18. Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais (MG). Lei nº 13.317, de 24 de setembro de 1999. Contém o Código de Saúde do Estado de Minas Gerais e define a competência do Estado no que se refere ao Sistema Único de Saúde. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG, 24 set. 1999.76 p. Disponível em: <https://www.almg.gov.br/consulte/legislacao/completa/completa-nova-minhtml?tipo=LEI&num=13317&comp=&ano=1999&texto=consolidado#texto>
  19. Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais (MG). Áreas Específicas de Atuação da Gerência de Vigilância Sanitária em Serviços de Saúde/Diálise. [acesso 2017 Ago 11]. Disponível em: <http://www.saude.mg.gov.br/cer/page/483-gerencia-de-vigilancia-sanitaria-em-servicos-de-saude-sesmg>
  20. American Public Health Association (US) - APHA. Standard methods for the examination of water and waste water. 22.ed. Washington, DC; 2012.
  21. United States Pharmacopeial Convention. The United States Pharmacopeia 2018: USP 41. 4.ed. Rockville (MD): United States Pharmacopeial Convention; 2018.

22. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 154, de 15 de junho de 2004. Estabelece o Regulamento Técnico para o funcionamento dos Serviços de Diálise. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 17 jun 2004. Seção 1, (115):65-9.
23. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - INMETRO. Coordenação Geral de Acreditação. Orientações sobre validação de métodos analíticos. Documento de caráter orientativo: DOQ-CGCRE-008: rev 05. Rio de Janeiro, RJ; 2016. Disponível em: [http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8\\_05.pdf](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_05.pdf)
24. Davenport A. Complications of hemodialysis treatments due to dialysate contamination and composition errors. *Hemodial Int*. 2015;19(Suppl 3):S30-3. <https://doi.org/10.1111/hdi.12350>
25. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Tabelas - Mesorregiões, microrregiões, municípios, distritos, subdistritos e bairros dos estados brasileiros. Censo 2010.
26. International Organization for Standardization (Switzerland). ISO nº 13.959, of April 15, 2009. Water for hemodialysis and related therapies. Geneva, Switzerland; 2009.
27. Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe (Europe). The European Pharmacopoeia. 10.ed. Strasbourg (FR): EDQM Council of Europe; 2007.
28. Ministério da Saúde (BR). Fundação Nacional de Saúde. Manual de controle da qualidade da água para técnicos que trabalham em ETAS. Brasília (DF): Funasa; 2014. 112p. Disponível em: <http://www.funasa.gov.br/documents/20182/38937/Manual+de+controle+da+qualidade+da+%C3%A1gua+para+t%C3%A9cnicos+que+trabalham+em+ETAS+2014.pdf/85bbdcbc-8cd2-4157-940b-90b5c5bcfc87>
29. Libânio M. Fundamentos de qualidade e tratamento de água. 2.ed. Campinas (SP): Editora Átomo; 2010.
30. Ramirez SS. Água para hemodiálise no estado do Rio de Janeiro: uma avaliação dos dados gerados pelo programa de monitoramento da qualidade nos anos de 2006-2007 [monografia especialização]. Rio de Janeiro (RJ): INCQS/FIOCRUZ; 2009.
31. Vasconcelos PDS. Monitoramento da água de diálise: Um estudo de caso em uma clínica do município de Recife. [monografia especialização]. Recife (PE): Fundação Oswaldo Cruz; 2012.



# Occurrence and diversity of ciliated protozoa in the most commonly consumed leafy greens in Brazil: a qualitative study

## Ocorrência e diversidade de protozoários ciliados nos vegetais folhosos mais consumidos no Brasil: um estudo qualitativo

RIALA6/1792

Taís Rondello BONATTI, Sandra YAMASHIRO, Pedro Ferreira de Castro Santana e FREITAS, Isabel Cristina Vidal SIQUEIRA-CASTRO, Regina Maura Bueno FRANCO\*

\*Corresponding author: Protozoology Laboratory, Biology Institute, University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil. Phone number: +55 19 3521 6285. E-mail: [reginamaurafranco@gmail.com](mailto:reginamaurafranco@gmail.com)

Recebido: 30.01.2020 - Aceito para publicação: 06.11.2020

### ABSTRACT

Ciliated protozoa are an ubiquitous group of eukaryotes that have been poorly reported on leafy greens. The present study aimed to verify the occurrence and diversity of ciliated protozoa in the leaves and roots of three of the most commonly consumed leafy greens in Brazil – lettuce, rocket and coriander. The vegetable samples were washed by manual agitation (3 minutes) in two different media (mineral water and Page’s Amoeba Saline solution). After washing, the contents were incubated in Petri dishes and aliquots were removed for microscopic identification and *in vivo* observation. A total of 21 ciliated protozoa species were found, most of which were bacterivorous. Leafy greens have commonly been associated with foodborne outbreaks and ciliated protozoa, which although they are not a Public Health concern, can act as “Trojan Horses” harboring bacteria, viruses and other protozoa cysts and oocysts and can suggest a new route towards microbiological quality related to the food chain. This is the first report of ciliated protozoa on leafy greens consumed in Brazil.

**Keywords.** ciliated protozoa, biodiversity, leafy greens, food contamination, foodborne diseases, food safety.

### RESUMO

Os protozoários ciliados constituem um grupo onipresente de eucariotos pouco relatados em vegetais folhosos. O presente estudo teve como objetivo verificar a ocorrência e a diversidade de protozoários ciliados nas folhas e raízes de três dos vegetais folhosos mais consumidos no Brasil - alface, rúcula e coentro. As amostras de vegetais foram lavadas por agitação manual (3 minutos) em dois meios diferentes (água mineral e Solução Salina para Ameba). Após a lavagem, o conteúdo foi incubado em placas de Petri e alíquotas foram retiradas para identificação microscópica e observação *in vivo* dos organismos. Um total de 21 espécies de protozoários ciliados foi encontrado, a maioria das quais era bacterívora. Tais hortaliças têm sido comumente associadas a surtos transmitidos por alimentos e os protozoários ciliados que, embora não sejam um problema de saúde pública, podem atuar como “Cavalos de Tróia” ao abrigar bactérias, vírus além de cistos e oocistos de protozoários o que pode sugerir uma nova rota para a avaliação da qualidade microbiológica relacionada à cadeia alimentar. Este é o primeiro relato de protozoários ciliados em folhas verdes consumidas no Brasil.

**Palavras-chave.** protozoários ciliados, diversidade biológica, vegetais folhosos, contaminação alimentar, doenças transmitidas por alimentos, segurança alimentar.

## INTRODUCTION

Recent years have seen a growing consensus that eating raw vegetables is essential for health maintenance, as such foods provide several important components such as water, iron, vitamins and mineral elements<sup>1-3</sup>. However, various pathogenic agents as bacteria, viruses and parasitic pathogens, have been implicated in foodborne outbreaks due to raw vegetable consumption<sup>4,5</sup>. According to the WHO<sup>6</sup>, the most frequent causes of foodborne illness are diarrheal disease agents, which cause 230,000 deaths per year in the whole world. In Brazil, the consumption of raw salads is very common and 6,632 foodborne outbreaks and 109 deaths were registered from 2007 to 2016, mostly caused by *Salmonella*<sup>7</sup>.

Ciliated protozoa are an ubiquitous group of eukaryotic heterotrophic organisms with several feeding habits. These organisms play an important ecological role as they serve as food for other organisms and are fundamental in terrestrial and aquatic food webs<sup>8,9</sup>. They have been widely studied in aquatic environments, often in relation to water quality, but there are few studies about the occurrence of this group in vegetables commonly consumed<sup>4,10,11</sup>.

Although some reports have shown that ciliated protozoa can prey on pathogenic protozoa cysts and oocysts as well as viruses and bacteria, there is no information about the maintenance of the infectivity of these forms inside feeding organelles, and so they may harbor these agents and act as “Trojan horses”<sup>9,12,13</sup>. Moreover, there is a possibility that these pathogenic forms, as *Giardia* spp. cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts for example, could survive inside ciliated protozoa and become protected from disinfectants such as chlorine, therefore being implicated as reasons for foodborne outbreaks<sup>4,9,11,14</sup>.

There are several ways that vegetables can become contaminated by pathogenic organisms, such as through the water used for irrigation and during collection, transport and preparation<sup>10,15</sup>. Furthermore, the role of the microbial communities associated with vegetables and their relationship with human pathogens has been poorly explored<sup>11</sup>. Ciliated protozoa are not considered in microbiological monitoring as they are classified as not dangerous from a Public Health perspective, although studies have shown that they can represent an indirect risk

for consumers by harboring infective pathogenic bacteria, such as that by Vaerewijk et al<sup>8</sup>.

The aim of the present study was to verify the occurrence and diversity of ciliated protozoa in leaves and roots of three of the most commonly consumed leafy greens in Brazil – lettuce, rocket and coriander.

## MATERIAL AND METHODS

Three different types of raw leafy greens were obtained from supermarkets, market-places and central open-air markets in Campinas, São Paulo, Brazil from March to June 2015: lettuce (n=5), rocket (n=6) and coriander (n=8).

Samples were collected under normal purchase conditions, randomly selected, and immediately taken to the Protozoology Laboratory of the Biology Institute of the University of Campinas. Some of the vegetables were pre-washed (“easy-to-eat”) before sale.

Approximately 30g of leaves and roots (hydroponic samples) were removed from the heads and put separately in sterile plastic bags for further washings, separately. These washings were performed by manual agitation for three minutes in two different media: mineral water (not sterile) and Page’s Amoeba Saline Solution<sup>4</sup>, using 50 mL of each media for each sample. There was no control sample processed for this study.

After washing, only the liquid content (50 mL) was immediately transferred to Petri dishes containing raw and crushed rice (approximately 3 grains) which was previously autoclaved to stimulate the growth of indigenous bacteria, flagellates, fungi and amoeba<sup>16</sup>, in order to support ciliated protozoa excystment and growth. Two plates were used for each sample: one with 50 mL of mineral water and the other with 50 mL of Page’s Amoeba Saline solution. Petri dishes were incubated in room temperature and more mineral water or Page’s Amoeba Saline solution were added one a week to prevent drying out.

Aliquots of each culture were taken for identification and *in vivo* observation. All plates were monitored three times a week, for one month in order to verify ciliated protozoa diversity. Other aliquots were also collected for qualitative examination of the details of the ciliature organization, macro and micronucleus. These features were revealed by the protargol impregnation technique proposed by Dieckman<sup>17</sup>.

The morphological aspects of ciliates *in vivo* and after protargol impregnation were observed and photo-documented by Axiocam MRC - Zeiss model scientific digital color camera attached to a microscope (Axio Imager) by differential interference contrast (DIC) microscopy (400X). Several guides and complementary literature<sup>16,18-24</sup> were consulted for the ciliated protozoa identification.

## RESULTS

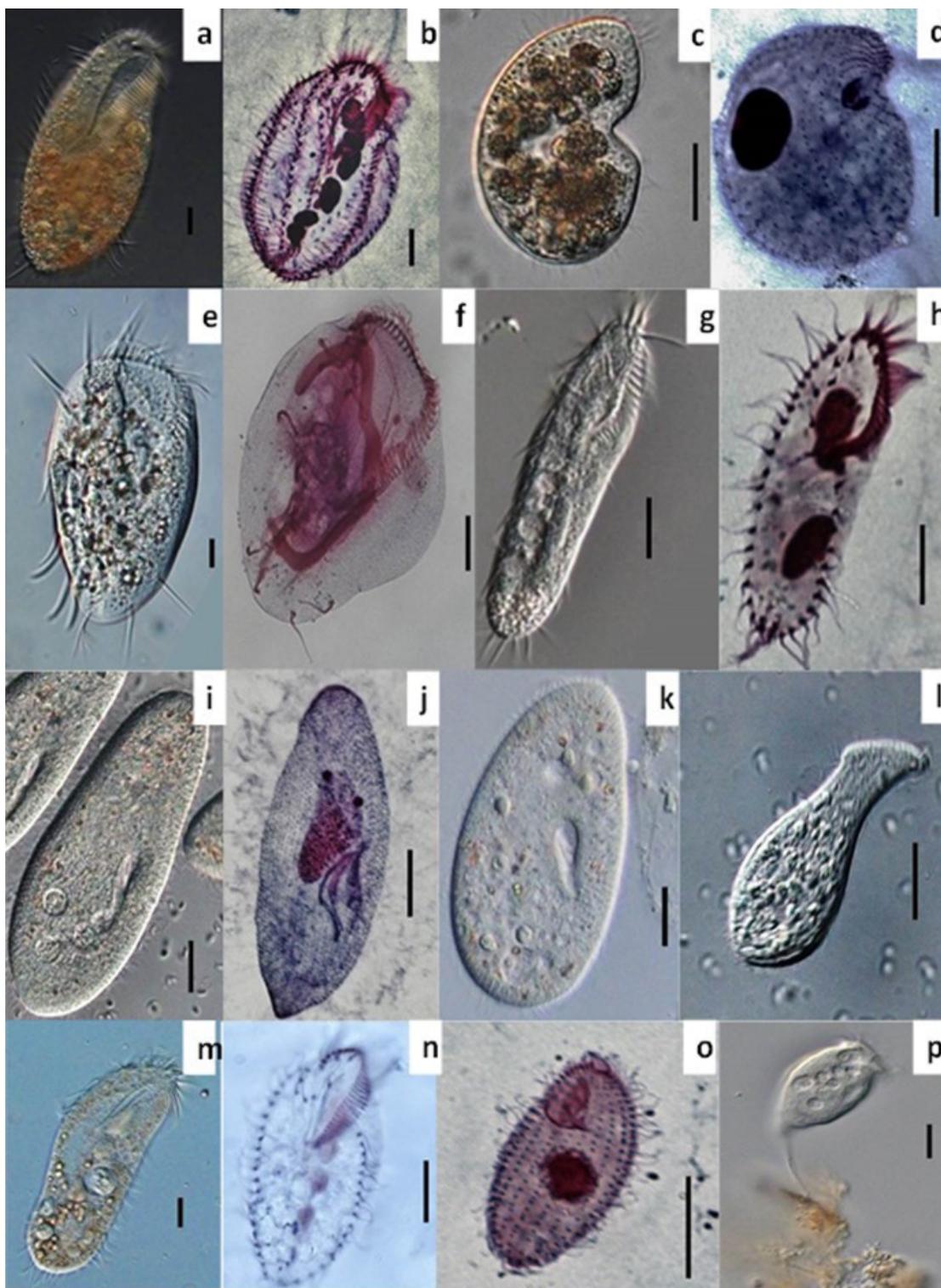
During this study and despite media used, we identified 16 ciliated protozoa species in lettuce, 12 in rocket and four in coriander (**Table; Figure**).

This is the first report of ciliated protozoa on leafy greens consumed in Brazil.

For lettuce and rocket samples, most of the species identified are bacterivorous ciliates (*Aspidisca cicada*, *Chilodonella* sp., *Colpidium colpoda*, *Colpoda inflata*, *Cyclidium glaucoma*, *Euplotes affinis*, *Opercularia* sp., *Paramecium aurelia*- complex, *Paramecium* sp., *Parentocirrus* sp., *Tetrahymena pyriformis*-complex, *Vorticella* sp. and *Uronema nigricans*). For coriander samples, most of the species recorded are bacterivorous and commonly found in terrestrial habitats (*Colpidium colpoda*, *Colpoda inflata* and *Gonostomum affine*).

**Table.** Ciliated protozoa taxa found on leafy green samples (leaves and roots)

| Lettuce                                 | Rocket                                  | Coriander                               |
|-----------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|
| <i>Aspidisca cicada</i>                 | <i>Acineria incurvata</i>               | <i>Colpidium colpoda</i>                |
| <i>Chilodonella</i> sp.                 | <i>Chilodonella</i> sp.                 | <i>Colpoda inflata</i>                  |
| <i>Colpidium colpoda</i>                | <i>Colpidium colpoda</i>                | <i>Gonostomum affine</i>                |
| <i>Colpoda inflata</i>                  | <i>Colpoda inflata</i>                  | <i>Tetrahymena pyriformis</i> - complex |
| <i>Cyclidium glaucoma</i>               | <i>Cyclidium glaucoma</i>               |                                         |
| <i>Euplotes affinis</i>                 | <i>Euplotes aediculatus</i>             |                                         |
| <i>Gonostomum affine</i>                | <i>Opercularia</i> sp.                  |                                         |
| <i>Heliophrya</i> sp.                   | <i>Paramecium aurelia</i> - complex     |                                         |
| Himenostomatida                         | <i>Paramecium</i> sp.                   |                                         |
| <i>Hipotrichida</i>                     | <i>Tetrahymena pyriformis</i> - complex |                                         |
| <i>Parentocirrus</i> sp.                | <i>Uronema nigricans</i>                |                                         |
| Prostomatida                            | <i>Vorticella</i> sp.                   |                                         |
| <i>Spathidium spatula</i>               |                                         |                                         |
| <i>Sterkiella cavicola</i>              |                                         |                                         |
| <i>Tetrahymena pyriformis</i> - complex |                                         |                                         |
| <i>Vorticella</i> sp.                   |                                         |                                         |
| <b>Total: 16</b>                        | <b>Total: 12</b>                        | <b>Total: 4</b>                         |



**Figure.** Photomicrographs of ciliated protozoa found on leafy green samples from Campinas, São Paulo, Brazil, observed in differential interference contrast (DIC) microscopy. Organisms *in vivo* (a; c; e; g; i; k; l; m; p) and following protargol impregnation (b; d; f; h; j; n; o); a-b: *Parentocirrus* sp.; c-d: *Colpoda inflata*; e-f: *Euplotes aediculatus*; g-h: *Gonostomum affine*; i-j: *Paramecium aurelia*; k: *Paramecium* sp.; l: *Spathidium spatula*.; m-n: *Sterkiella cavicola*; o: *Tetrahymena pyriformis*; p: *Vorticella* sp. Scale Bars = 10  $\mu$ m

## DISCUSSION

The habit of eating raw vegetables is critical for foodborne disease epidemiology<sup>15,25</sup>. According to the WHO<sup>6</sup>, beyond affecting individuals, foodborne diseases harm economic development, creating particular challenges for the tourism, agricultural and food (export) industries.

There are no criteria for ciliates in raw vegetables in contrast to pathogenic bacteria, worms and parasitic protozoa where several national and international microbiological limits have been published<sup>8</sup>. The presence of pathogens in vegetables is problematic as they can survive and even grow inside ciliated protozoa cells<sup>10,13,26</sup> such as *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Arcobacter butzleri* and *Yersinia enterocolitica*<sup>27</sup>. In addition, these bacteria are resistant to protozoan grazing<sup>27</sup>. Nadhanan and Thomas<sup>28</sup> reported that bacteria encapsulated by the fecal pellets of ciliated protozoa may be resistant to disinfectants commonly used in food manufacturing. In the present study, the most commonly registered ciliated protozoa were bacterivorous, which may indirectly evidence the presence of pathogens in these vegetables.

Also, even when preyed upon these pathogen or protozoan resistant forms such as cysts and oocysts may not be inactivated by the digestive process or by common vegetable disinfectants such as chlorine, which is unable to inactivate protozoa parasitic resistance forms<sup>8</sup>. Siqueira-Castro et al<sup>9</sup> found for the first time that *Giardia* cysts were preyed upon by ciliated protozoa, and confirmed predation on *Cryptosporidium* oocysts, also described in other works<sup>13,29-31</sup>.

There are few studies that show the presence of ciliated protozoa in vegetables and no register has been done in Brazil so far, although there are many other reports about pathogenic protozoa in these vegetables. Chavatte et al<sup>10</sup> found 30 ciliated protozoa morphospecies, with *Tetrahymena* sp. dominant among other ciliates on vegetable sprouts. In the present study species were found with *Tetrahymena pyriformis*-complex and *Parentocirrus* sp. the most commonly identified in the samples. Some studies that found morphologically similar hypotrich ciliates have used morphogenetic data to discriminate between species<sup>21,32</sup>.

*Tetrahymena* sp. is commonly used as a model in studies of its interaction with bacteria, such as *Campylobacter jejunii* and *Salmonella enterica*<sup>8,10</sup>. This ciliated protozoan is bacterivorous and, via the cytostome, ingests food particles, forming a food vacuole that is later digested<sup>33</sup>. In response to adverse conditions, the protozoan undergoes encystment, accompanied by the formation of resting non-feeding particles and cysts<sup>33</sup>. It has also been demonstrated *in vitro* that *Tetrahymena pyriformis* cysts were able to harbor viable and virulent *Listeria monocytogenes* cells<sup>33</sup>. McNealy et al<sup>34</sup> verified that *L. monocytogenes* cells were not destroyed by protozoa, as they escaped within the fecal pellets eliminated by the ciliates, such as *Tetrahymena* spp.

Gourabathini et al<sup>11</sup> found intact *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* in the expelled vesicles of ciliated protozoa and reported that these prokaryotic organisms can multiply inside these organelles, or even in the cytoplasm. Moreover, these authors suggest that ciliated protozoa can trap these enteric pathogen organisms in their cysts.

*Parentocirrus* sp. has been reported in an ephemeral garden birdbath<sup>35</sup>, activated sludge samples<sup>36-38</sup> and in mosses growing in the shore zone of a mesosaprobic river in Slovakia<sup>39</sup>.

It is important to highlight the finding of *Colpoda* sp. in coriander samples: Nadhanan and Thomas<sup>28</sup> verified *in vitro* experiments that the fecal pellets of this ciliate contained intact *Listeria monocytogenes* cells. Therefore, the protection provided by fecal pellets can explain the difficulty of decontaminating food-preparation facilities and the presence of *Colpoda* in vegetables may be a concern. It is important to address that this ciliated protozoan is bacterivore and commonly found in polisaprobic environments (associated with a high amount of organic matter available). On the other hand, Zou et al<sup>40</sup> indicate that bacterivore ciliated protozoa found in roots are related to the increase on primary production by raising nutrient availability.

Ciliated protozoa are a useful tool for water quality monitoring. The saprobic index is based on the degree of tolerance of the ciliate species to organic pollution, and this index has seven levels ranging from water lacking in or with a very low organic load, to exceptionally polluted water<sup>20,41,42</sup>.

On a recent study of the ciliated protozoa present in the Atibaia River, the main water supply for Campinas, it was found that most ciliated protozoa species were classified as polysaprobic and alfamesosaprobic<sup>43</sup>, revealing that this river, the waters of which are used for irrigating the vegetable production areas of the region, is strongly polluted. Some of these species found in the present study are classified as polysaprobic and alphamesosaprobic, such as *Acineriain curvata*, *Colpidium*, *Paramecium caudatum*, *Tetrahymena pyriformis-complex* and *Cyclidium glaucoma*. *T. pyriformis-complex*, *Acineria* sp., *Paramecium* sp., and *C. glaucoma* were also detected in interstitial liquid samples from a combined wastewater treatment system at the University of Campinas<sup>44</sup> and from an activated sludge system in southeastern Brazil<sup>45</sup>. Therefore, the presence of these ciliates in vegetables may indicate the contamination of water irrigation with untreated sewage.

Studies of the parasitic contamination of fresh vegetables show that lettuce has the highest prevalence. This may be related to the aspect of the leaf surface and the presence of structures such as stomata, which are capable of harboring parasitic forms and ciliated protozoa<sup>25,46</sup>. In the present study, most of the species were found in lettuce leaves.

In Brazil, the consumption of raw or lightly cooked vegetables throughout the year is common. This habit, combined with poor sanitation, can lead to foodborne outbreaks. According to Machado et al<sup>47</sup>, the pathogenic microorganism's contamination on vegetables is considered a national problem due to these high frequencies. According to the Brazilian Health Regulatory Agency<sup>48</sup>, fruit and vegetables are associated with almost 3% of the foodborne outbreaks in the country and a recent decree from the Health Ministry<sup>7</sup> made the notification of food-related diseases compulsory. In addition, the irrigation water has a variety of sources, and is a microbial risk, especially for leafy greens<sup>49</sup>. Decol et al<sup>49</sup> found a generic *E. coli* prevalence of 84.8% and 38.3% in irrigation water samples and on lettuces in southern Brazil. In these water samples, *E. coli* O157:H7 was detected by polymerase chain reaction.

Despite the importance of the presence of these organisms on leafy greens harboring pathogenic organisms, it is relevant to recognize that this is the

first report about their diversity on these vegetables. In Brazil, there are a few studies that had been conducted on ciliated protozoa diversity in different environments such as fresh waters. Some authors, as Cotterill et al<sup>50</sup>, reinforce the importance of local and global research on these organism's diversity once they are excluded from environmental management programs and biodiversity conservation. In addition, the taxonomic survey of the ciliates species is very important due to the rapid responses of these organisms to human activities such as the discharge of organic matter in water bodies. Also, the importance of biodiversity knowledge is also related to the great biotechnological potential they present. Several foodborne outbreaks have been reported in the USA and Europe relating to fresh vegetables and fruit and water used for irrigation. These products usually come from developing countries and, due to globalization, food distribution routes are shorter and the products can be used promptly<sup>51</sup>. The access of developing countries to food export markets will depend on their capacity to meet the international regulatory requirements determined by the Agreement on the Application of Sanitary and Phytosanitary Measures (SPS) of the World Trade Organization (WTO). Unsafe exports can lead to significant economic losses<sup>6</sup>. The present study is the first report of ciliated protozoa in fresh vegetables in Brazil and was performed over four months in 2015. It would be interesting to assess whether the compositions remain stable or change throughout the year. Also, it is necessary more studies to contribute on the occurrence and diversity of ciliated protozoa as there is a great potential to use these organisms as bioindicators and also for food monitoring purposes.

## CONCLUSIONS

Several species of ciliated protozoa with the potential to host pathogenic microorganisms related to foodborne outbreaks have been found in all vegetables samples considered the ones most commonly consumed in Brazil. The presence of these protozoa in fresh food, as well as the survival of pathogens within them, require further investigation and indicate new directions for microbiological quality related to the food chain.

## REFERENCES

1. Idahosa OT. Parasitic contamination of fresh vegetables sold in Jos markets. *Global J Med Res*. 2011;11(1):20-5.
2. US Department of Health and Human Services and US Department of Agriculture. 2015-2020 Dietary Guidelines for Americans. 8.ed. Washington (DC): USDA; 2015. [access 2019 dez 10] Available in: [https://health.gov/sites/default/files/2019-09/2015-2020\\_Dietary\\_Guidelines.pdf](https://health.gov/sites/default/files/2019-09/2015-2020_Dietary_Guidelines.pdf)
3. Wu QJ, Wu L, Zheng LQ, Xu X, Ji C, Gong TT. Consumption of fruit and vegetables reduces risk of pancreatic cancer: evidence from epidemiological studies. *Eur J Cancer Prev*. 2016;25(3):196-205. <https://dx.doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000171>
4. Vaerewijck MJM, Sabbe K, Baré J, Houf K. Occurrence and diversity of free-living protozoa on butterhead lettuce. *Int J Food Microbiol*. 2011;147(2):105-11. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.03.015>
5. Bennett SD, Sodha SV, Ayers TL, Lynch MF, Gould LH, Tauxe RV. Produce-associated foodborne disease outbreaks, USA, 1998-2013. *Epidemiol Infect*. 2018;146(11):1397-1406. <https://dx.doi.org/10.1017/S0950268818001620>
6. World Health Organization (WHO). WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. WHO; 2015 [access 2017 abr 15]. Available in: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/199350>
7. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil; 2016. [access 2017 may 01]. Available in: <http://portal.arquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/08/Apresenta---o-Surtos-DTA-2016.pdf>
8. Vaerewijck MJM, Baré J, Lambrecht E, Sabbe K, Houf K. Interactions of foodborne pathogens with free-living protozoa: potential consequences for food safety. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2014;13(5):924-44. <https://dx.doi.org/10.1111/1541-4337.12100>
9. Siqueira-Castro ICV, Greinert-Goulart JA, Bonatti TR, Yamashiro S, Franco RMB. First report of predation of *Giardia* sp. cysts by ciliated protozoa and confirmation of predation of *Cryptosporidium* spp. oocysts by ciliate species. *Environ Sci Pollut Res*. 2016;23:11357-62. <https://dx.doi.org/10.1007/s11356-016-6689-y>
10. Chavatte N, Lambrecht E, Van Damme I, Sabbe K, Houf K. Abundance, diversity and community composition of free-living protozoa on vegetable sprouts. *Food Microbiol*. 2016;55:55-63. <https://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2015.11.013>
11. Gourabathini P, Brandi MT, Redding KS, Gunderson JH, Berk SG. Interactions between food-borne pathogens and protozoa isolated from lettuce and spinach. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74(8):2518-25. <https://dx.doi.org/10.1128/AEM.02709-07>
12. Denoncourt AM, Paquet VE, Charette SJ. Potential role of bacteria packaging by protozoa in the persistence and transmission of pathogenic bacteria. *Front Microbiol*. 2014;21(5):1-11. <https://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00240>
13. King BJ, Monis PT, Keegan AR, Harvey K, Saint C. Investigation of the survival of *Cryptosporidium* in environmental waters. Cooperative Research Centre for Water Quality and Treatment, Salisbury. Research Report 47; 2007. [access 2019 dez 06]. Available in: <https://www.waterra.com.au/publications/document-search/?download=81>
14. King CH, Shotts Jr EB, Wooley RE, Porter KG. Survival of coliforms and bacterial pathogens within protozoa during chlorination. *Appl Environ Microbiol*. 1988; 54(12): 3023-33. <https://dx.doi.org/10.1128/AEM.54.12.3023-3033.1988>
15. Alhabbal AT. The prevalence of parasitic contamination on common sold vegetables in Alqalamoun region. *Int J Pharm Sci Rev Res*. 2015;30(1):94-7.
16. Foissner W, Agatha S, Berger H. Soil ciliates (Protozoa, Ciliophora) from Namibia (Southwest Africa), with emphasis on two contrasting environments, the Etosha Region and the Namib Desert. *Denisia*. 2002;5:1-1459. [access 2019 nov 20]. Available in: [http://www.wfoissner.at/data\\_prot/Foissner\\_et\\_al\\_2002\\_1-1063.pdf](http://www.wfoissner.at/data_prot/Foissner_et_al_2002_1-1063.pdf)
17. Dieckmann J. An improved protargol impregnation for ciliates yielding reproducible results. *Europ J Protistol*. 1995;31(4):372-82. [https://dx.doi.org/10.1016/S0932-4739\(11\)80449-9](https://dx.doi.org/10.1016/S0932-4739(11)80449-9)
18. Berger H. Monograph of the Oxytrichidae (Ciliophora, Hypotrichia). In: Dumont HI, Werger MJA (editors). *Monographiae Biologicae*, vol. 78. Springer Science; 1999.p.1-1080. <https://doi.org/10.1007/978-94-011-4637-1>
19. Berger H. Monograph of the Gonostomatidae and Kahliliidae (Ciliophora, Hypotricha). In: *Monographiae Biologicae*, vol. 90, Springer Science; 2011.p.1-741. <https://10.1007/978-94-007-455-8>

20. Foissner W, Berger H. A user-friendly guide to ciliates (Protozoa, Ciliophora) commonly used by hydrobiologists as bioindicators in rivers, lakes and waste water, with notes in their ecology. *Freshw Biol*. 1996;35(2):375-482. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1996.tb01775.x>
21. Foissner W, Blatterer H, Berger H, Kohmann F. Taxonomische und ökologische revision der ciliaten des Saprobien-systems. Band I: Ciliophorida, Oligotrichida, Hypotrichia, Colpodea. Informationsberichte des Bayerischen Landesamtes für Wasserwirtschaft; 1991.p.1-478 [access 2019 mai 09]. Available in: <https://www.protozoology.com/ciliateatlas-I/>
22. Foissner W, Berger H, Kohmann F. Taxonomische und ökologische revision der ciliaten des Saprobien-systems. Band II: Peritrichia, Heterotrichida, Odontostomatida. Informationsberichtetes Bayer. Landesamtes für Wasserwirtschaft; 1992.p.502. [access 2019 maio 09]. Available in: <https://www.protozoology.com/ciliateatlas/>
23. Foissner W, Berger H, Kohmann F. Taxonomische und ökologische revision der ciliaten des Saprobien-systems – Band III: Hymenostomata, Prostomatida, Nassulida. Informationsberichtetes Bayer. Landesamtes für Wasserwirtschaft; 1994.p.548.[access 2019 mai 09]. Available in: <https://www.protozoology.com/ciliateatlas-III/>
24. Lynn DH, Small EB. *Phylum Ciliophora*. In: Lee JJ, Bradbury PC, Leedale GF (editors.). An illustrated guide to the protozoa. Lawrence (KS): Society of Protozoologists; 2002.p.371-656.
25. Mohamed MA, Siddig EE, Elaagip AH, Edris AMM, Nasr AA. Parasitic contamination of fresh vegetables sold at central markets in Khartoum state, Sudan. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2016;15:17. <https://doi.org/10.1186/s12941-016-0133-5>
26. Bichai F, Dullemont Y, Hijnen W, Barbeau B. Predation and transport of persistent pathogens in GAC and slow sand filters: A threat to drinking water safety? *Water Res*. 2014;64:296-308. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.07.005>
27. Chavatte N, Baré J, Lambrecht E, Van Damme I, Vaerewijck M, Sabbe K et al. Co-occurrence of free-living protozoa and foodborne pathogens on dishcloths: implications for food safety. *Int J Food Microbiol*. 2014;191:89-96. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.030>
28. Nadhanan RR, Thomas CJ. *Colpoda* secrete viable *Listeria monocytogenes* within faecal pellets. *Environ Microbiol*. 2014;16(2),396-404. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12230>
29. Fayer R, Trout JM, Walsh E, Cole R. Rotifers ingest oocysts of *Cryptosporidium parvum*. *J Eukaryot Microbiol*. 2000;47(2):161-3. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2000.tb00026.x>
30. Stott R, May E, Matsushita E, Warren A. Protozoan predation as a mechanism for the removal of *Cryptosporidium* oocysts from wastewaters in constructed wetlands. *Water Sci Technol*. 2001;44(11-12):191-8. <https://doi.org/10.2166/wst.2001.0828>
31. Stott R, May E, Ramirez E, Warren A. Predation of *Cryptosporidium* oocysts by protozoa and rotifers: implications for water quality and public health. *Water Sci Technol*. 2003;47(3):77-83. <https://doi.org/10.2166/wst.2003.0166>
32. Chen L, Zhao X, Shao C, Miao M, Clamp JC. Morphology and phylogeny of two new ciliates, *Sterkiella sinica* sp. nov. and *Rubrioxytricha tsinlingensis* sp. nov. (Protozoa, Ciliophora, Hypotrichia) from north-west China. *Syst Biodivers*. 2017;15 (2):131-42. <http://dx.doi.org/10.1080/14772000.2016.1219426>
33. Pushkareva VI, Ermolaeva SA. *Listeria monocytogenes* virulence factor Listeriolysin O favors bacterial growth in co-culture with the ciliate *Tetrahymena pyriformis*, causes protozoan encystment and promotes bacterial survival inside cysts. *BMC Microbiol*. 2010;10:26. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-26>
34. McNealy T, Newsome AL, Johnson RA, Berk SG. Impact of amoebae, bacteria, and *Tetrahymena* on *Legionella pneumophila* multiplication and distribution in an aquatic environment. In: Marre R, Abu Kwaik Y, Bartlett C, Cianciotto NP, Fields BS, Frosch M et al. (editors). *Legionella*. Washington (DC): ASM Press; 2001.p.170-5.[access 2019 out15]. <https://doi.org/10.1128/9781555817985.ch30>
35. Voß HJ. Morphology and morphogenesis of *Parentocirrus hortualis* nov. gen., nov. spec: a new genus within the redefined family Kahliellidae sensu Eigner 1995 (Ciliophora, Hypotrichida). *Eur J Protistol*. 1997;33:30-47. [https://doi.org/10.1016/S0932-4739\(97\)80019-3](https://doi.org/10.1016/S0932-4739(97)80019-3)
36. Blatterer H, Foissner W. Morphological and ontogenetic comparison of two populations of *Parentocirrus hortualis* Voss 1997 (Ciliophora, Hypotrichida). *Linzer Biol Beitr*. 2003;35:831-54. [acesso 2018 abr 20]. Available in: [https://www.zobodat.at/pdf/LBB\\_0035\\_2\\_0831-0854.pdf](https://www.zobodat.at/pdf/LBB_0035_2_0831-0854.pdf)

37. Paiva TS, Silva-Neto, I. Description of *Parentocirrus brasiliensis* sp. n. (Ciliophora: Spirotrichea), a new ciliate protist present in activated sludge. *Zootaxa*. 2004;504(1):1-10. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.504.1.1>
38. Paiva TS, Silva-Neto I. Morphology and divisional morphogenesis of *Nudiamphisiella interrupta* Foissner, Agatha & Berger, 2002 (Ciliophora: Stichotrichia) based on a Brazilian strain. *Eur J Protistol*. 2009;45(4):271-80. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2009.04.001>
39. Benčaťová S, Tirjaková E, Vďačný P. Resting cysts of *Parentocirrus hortualis* Voß, 1997 (Ciliophora, Hypotrichia), with preliminary notes on encystation and various types of excystation. *Eur J Protistology*. 2016;53:45-60. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2015.12.003>
40. Zou K, Thébault E, Lacroix G, Barot S. Interactions between the green and brown food web determine ecosystem functioning. *Funct Ecol*. 2016;30(8):1454-65. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12626>
41. Sladeczek V. System of water quality from the biological point of view. *Adv Limnol*. 1973;7:1-218. <https://doi.org/10.1002/iroh.19740590412>
42. Madoni P. Ciliated protozoan communities and saprobic evaluation of water quality in the hilly zone of some tributaries of the Po River (northern Italy). *Hydrobiologia*. 2005;541(1):55-69. <https://doi.org/10.1007/s10750-004-4667-8>
43. Bonatti TR, Siqueira Castro ICV, Franco RMB. Checklist of ciliated protozoa from surface water and sediment samples of Atibaia River, Campinas, São Paulo (Southeast Brazil). *Rev Bras Zoocienc*. 2016;17(1):63-76. Available in: <https://periodicos.ufff.br/index.php/zoociencias/article/view/24631>
44. Yamashiro S. Removal of *Giardia* and *Cryptosporidium*, occurrence of microsporidia and characterization of microfauna from a combined system for wastewater treatment. [tese de doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2016. Available in: <http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/332149>
45. Siqueira-Castro ICV, Greinert-Goulart JA, Rosseto R, Guimarães JR, Franco RMB. Ciliated protozoa community of a combined UASB-activated sludge system in southeastern Brazil. *Environ Sci Pollut Res*. 2016;23:23804-14. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7591-3>
46. Macarisin D, Bauchan G, Fayer R. *Spinacia oleracea* L. leaf stomata harboring *Cryptosporidium parvum* oocysts: a potential threat to Food Safety. *Appl Environ Microbiol*. 2010;76(2):555-9. <https://doi.org/10.1128/AEM.02118-09>
47. Machado ER, Maldonado IR, Riquette RFR, Mendes VS, Gurgel-Gonçalves R, Ginani VC. Frequency of enteroparasites and bacteria in the leafy vegetables sold in Brazilian public wholesale markets. *J Food Prot*. 2018;81(4):542-8. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-358>
48. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos. Alves, R. III Encontro Nacional de Vigilâncias Sanitárias; agosto de 2014; São Paulo, SP. [access 2017 may 01]. Available in: [http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3\\_PAINEL\\_1\\_ApresentacaoRejaneAlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Agosto\\_2014\\_PDF.pdf](http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3_PAINEL_1_ApresentacaoRejaneAlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Agosto_2014_PDF.pdf)
49. Decol LT, Casarin LS, Hessel CT, Batista ACF, Allende A, Tondo EC. Microbial quality of irrigation water used in leafy green production in Southern Brazil and its relationship with produce safety. *Food Microbiol*. 2017;65:101-13. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.02.003>
50. Cotterill FPD, Al-Rasheid K, Foissner W. Conservation of protists: is it needed at all? *Biodivers Conserv*. 2008;17:427-43. <https://doi.org/10.1007/s10531-007-9261-8>
51. Robertson LJ, Van der Giessen JWB, Batz MB, Kojima M, Cahill S. Have foodborne parasites finally become a global concern? *Trends Parasitol*. 2013;29 (3):101-3. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.12.004>



# Avaliação da adequação nutricional de cardápios escolares em uma instituição da rede pública de ensino na região Sudeste de Minas Gerais

## Evaluation of the nutritional adequacy of school menus in a public school in the Southeast region of Minas Gerais

RIALA6/1794

Ana Elisa Winter ANTUNES<sup>1</sup>, Ludmyla Ruffo SILVEIRA<sup>1</sup>, Nathália Sernizon GUIMARÃES<sup>1</sup>, Anne Danieli Nascimento SOARES<sup>1\*</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Departamento 2, Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais, *campus* Barbacena, Rua Monsenhor José Augusto, 204, São José, Barbacena, MG, Brasil, CEP: 36205-018. Tel: 32 3333 2810. E-mail: [anne.soares@ifsudestemg.edu.br](mailto:anne.soares@ifsudestemg.edu.br)

Recebido: 25.04.2020 - Aceito para publicação: 16.11.2020

### RESUMO

Este estudo teve como objetivo verificar a adequação dos cardápios da alimentação escolar com a legislação do Programa Nacional de Alimentação Escolar (PNAE), quanto ao valor calórico, quantidade de macronutrientes, vitaminas A e C, cálcio, ferro, magnésio, zinco e fibras dietéticas. Foram avaliados 20 cardápios destinados a uma escola da rede pública que atende às faixas etárias de 6 a 10 anos e 11 a 15 anos, localizada no sudeste de Minas Gerais. Os cardápios analisados não contemplaram todas as recomendações de nutrientes e de energia para ambas faixas etárias, sendo a maior inadequação para o cálcio. Foi verificado que os mesmos cardápios e *per capita* eram utilizados para ambas faixas etárias, apesar do PNAE determinar necessidades nutricionais diferentes. Desta forma, as necessidades da faixa etária de 6 a 10 anos foi melhor atendida, com maior percentual de cardápios adequados em relação a carboidrato, proteína, lipídios, vitamina C, ferro, magnésio e zinco, quando comparado aos escolares de idade igual ou maior a 11 anos ( $p < 0,05$ ). Com os resultados obtidos, concluímos que ações corretivas em relação ao planejamento de refeições do cardápio da escola avaliada precisam ser realizadas respeitando a diferença entre as faixas etárias.

**Palavras-chave.** alimentação escolar, nutrição, programa nacional de alimentação escolar, política pública.

### ABSTRACT

This study aimed to verify the adequacy of school feeding menus with the legislation of the National School Feeding Program (PNAE), regarding caloric value, quantity of macronutrients, vitamins A and C, calcium, iron, magnesium, zinc and dietary fibers. We evaluated 20 menus destined to a public school that serves the age groups of 6 to 10 years and 11 to 15 years at Southeast of Minas Gerais. The menus analyzed did not contemplate all the nutrient and energy recommendations for both age groups being the greatest inadequacy for calcium. It was verified that the same menus and per capita were used for both age groups although the PNAE determined different nutritional needs. Thus, the needs of the 6 to 10 years old age group were better met, with a higher percentage of adequate menus in relation to carbohydrates, protein, lipids, vitamin C, iron, magnesium and zinc, when compared to children with aged 11 years or older ( $p < 0.05$ ). We conclude that corrective actions in relation to the meal planning of the menu of the school evaluated must be carried out respecting the difference between age groups.

**Keywords.** school feeding, nutrition, national school feeding program, public policy.

## INTRODUÇÃO

O termo “alimentação escolar” tem sido utilizado para caracterizar as refeições ofertadas segundo a padronização nutricional estipulada pelo Programa Nacional de Alimentação Escolar (PNAE) que, por sua vez, foi instituído no ano de 1955<sup>1</sup>. O PNAE é a política pública do Brasil de maior longevidade nacional na área de segurança alimentar e nutricional (SAN) e um dos programas públicos com maior duração e abrangência mundial na área de alimentação escolar<sup>2</sup>.

O PNAE propõe oferecer alimentação escolar a estudantes de todas as etapas da educação básica (educação infantil, ensino fundamental, ensino médio e educação de jovens e adultos), matriculados em escolas públicas, filantrópicas e entidades comunitárias conveniadas com o poder público, que atendam aos critérios estabelecidos pelo Fundo Nacional de Desenvolvimento da Educação/Ministério da Educação (FNDE/MEC) por meio da Resolução nº 06/2020<sup>3</sup>. A intenção é contribuir para o crescimento e o desenvolvimento biopsicossocial, a aprendizagem, o rendimento escolar e auxiliar na formação de bons hábitos alimentares dos alunos, por meio de ações de Educação Alimentar e Nutricional (EAN) e da oferta de refeições que cubram as necessidades nutricionais durante o período letivo<sup>3</sup>.

É uma exigência do PNAE que os cardápios da alimentação escolar sejam elaborados pelo responsável técnico nutricionista e, nesta perspectiva, este profissional define os horários das refeições e os alimentos ou preparações adequados a cada tipo de refeição, respeitando os hábitos alimentares regionais e, desta forma, viabilizando a sustentabilidade e a diversificação da agricultura local. Os cardápios contêm informações sobre o horário e tipo de refeição, o nome da preparação, os ingredientes que a compõem, bem como informações nutricionais de energia e macronutrientes, além da identificação e assinatura do nutricionista<sup>3</sup>. Como normativa, o PNAE determina que os cardápios devam ser planejados para atender de 20% a 70% das necessidades nutricionais diárias dos escolares do ensino básico de escolas públicas, incluindo escolas indígenas e quilombos. Este percentual varia de acordo com o público atendido ou período de funcionamento das instituições favorecidas<sup>3</sup>.

Apesar da legislação vigente estar bem estabelecida, algumas falhas são observadas na execução deste programa como, por exemplo, a inadequação do número de nutricionistas responsáveis pelas escolas; infraestrutura inadequada para preparo e distribuição das refeições; falta de capacitação das merendeiras; baixa aceitação da alimentação escolar oferecida; ausência de ações estratégicas em EAN e inadequação nutricional da alimentação ofertada<sup>4-7</sup>.

A ingestão alimentar inadequada pode comprometer o estado nutricional das crianças e/ou adolescentes e levar ao desenvolvimento de carências nutricionais que, por sua vez, estão associadas ao aumento de infecções e podem comprometer o crescimento e desenvolvimento<sup>8</sup>. Estudos sugerem que o retardo do crescimento na infância predispõe ao desenvolvimento de sobrepeso ou obesidade e doenças crônicas não-transmissíveis na vida adulta<sup>9,10</sup>.

Diante das consequências das inadequações aos parâmetros nutricionais do PNAE este estudo teve como objetivo avaliar a composição nutricional quantitativa dos cardápios da alimentação escolar de uma escola da rede pública e comparar os valores avaliados com os valores recomendados pela PNAE.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo observacional descritivo foi realizado no segundo semestre do ano de 2018 em uma escola da rede pública de ensino que atende alunos entre 6 e 15 anos, localizada no Sudeste de Minas Gerais. A pesquisa foi realizada após a assinatura do termo de anuência da Secretaria Municipal de Educação e da nutricionista da escola avaliada.

Os cardápios avaliados continham ingredientes e o *per capita* de cada preparação (isto é, quantidade destinada a cada comensal)<sup>11</sup>. A escola avaliada fornecia uma única refeição diariamente às crianças, porque funcionava em período parcial.

As medidas caseiras das preparações contidas nos cardápios foram transformadas em gramas ou mililitros com auxílio de tabela para avaliação de medidas caseiras<sup>12</sup>, para verificação das quantidades dos macronutrientes [carboidratos (g), proteínas (g), lipídios (g) e calorias (kcal) e fibras dietéticas (g)], e dos micronutrientes [vitamina A (mg), vitamina C (mg), cálcio (mg), ferro (mg), magnésio (mg) e zinco (mg)] estabelecidos por meio de tabelas

de composição de alimentos<sup>13,14</sup>. Em seguida, os valores diários fornecidos para cada nutriente foram comparados aos valores de referência recomendados pelo PNAE, estratificados segundo duas faixas etárias: (1) 6 a 10 anos e (2) 11 a 15 anos<sup>3</sup>.

Os nutrientes contidos nos cardápios foram tabulados em banco de dados utilizando o programa Microsoft Office Excel 2007<sup>®</sup>. Foi calculado o percentual de dias avaliados nos quais os cardápios estavam adequados (número de dias nos quais o cardápio esteve adequado para o nutriente ou energia/20 x 100) e o percentual de adequação mensal (média do valor de energia ou nutriente fornecido no mês de energia e nutriente recomendado pelo PNAE x 100).

As análises estatísticas foram executadas no software Stata<sup>®</sup> versão 11.0. Foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para avaliação da normalidade das variáveis. As variáveis categóricas foram descritas por meio de frequências absolutas (n) e relativas (%), enquanto os valores das variáveis contínuas foram

descritos através da média e desvio-padrão. Os testes *Exato de Fisher* e *Qui-quadrado de Pearson* foram utilizados para verificar possíveis diferenças estatísticas entre as faixas etárias quando avaliado o percentual de cardápios adequados em relação à energia e nutrientes. O nível de significância estatística considerado foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS

Ao total, vinte cardápios foram avaliados neste estudo, correspondendo ao período de um mês letivo (abril de 2018). Como primeiro resultado, foi observado que, independente da faixa etária, todos os estudantes receberam as mesmas preparações e consequentemente os mesmos ingredientes e *per capita*.

O percentual de cobertura de adequação dos cardápios (em dias) e o percentual de adequação mensal em relação ao recomendado para calorias e nutrientes recomendados pelo PNAE, segundo as faixas etárias, foram apresentados na **Tabela** abaixo.

**Tabela.** Adequação dos cardápios da alimentação escolar e percentual médio mensal atendido para energia e cada nutriente, segundo os valores de referência do Programa Nacional de Alimentação Escolar

| Variáveis alimentares | 6 - 10 anos           |                    | 11 - 15 anos          |                    | p-valor            |
|-----------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|--------------------|
|                       | % cardápios adequados | % adequação mensal | % cardápios adequados | % adequação mensal |                    |
| Energia (kcal)        | 65                    | 118                | 10                    | 79                 | 0,055 <sup>a</sup> |
| Carboidratos (g)      | 65                    | 111                | 10                    | 76                 | 0,006 <sup>a</sup> |
| Proteínas (g)         | 75                    | 142                | 50                    | 98                 | 0,001 <sup>a</sup> |
| Lipídios (g)          | 35                    | 112                | 15                    | 77                 | 0,001 <sup>a</sup> |
| Fibras (g)            | 65                    | 122                | 60                    | 108                | 1,000 <sup>a</sup> |
| Vitamina A (mg)       | 70                    | 549                | 60                    | 392                | 1,000 <sup>a</sup> |
| Vitamina C (mg)       | 70                    | 385                | 65                    | 224                | 0,003 <sup>a</sup> |
| Cálcio (mg)           | 5                     | 54                 | 5                     | 52                 | 1,000 <sup>b</sup> |
| Ferro (mg)            | 95                    | 182                | 80                    | 156                | 0,004 <sup>a</sup> |
| Magnésio (mg)         | 70                    | 147                | 35                    | 87                 | 0,001 <sup>a</sup> |
| Zinco (mg)            | 74                    | 119                | 25                    | 86                 | 0,006 <sup>a</sup> |

<sup>a</sup>Teste Qui-quadrado de Pearson

<sup>b</sup>Teste Exato de Fisher

A frequência da cobertura de cardápios adequados (em dias) foi menor para a faixa etária de 11 a 15 anos, principalmente devido ao déficit de calorias (adequação de 10% *versus* 65% para crianças de 6 a 10 anos,  $p=0,055$ ), carboidratos (adequação de 10% *versus* 65% para crianças

de 6 a 10 anos,  $p=0,006$ ), lipídios (adequação de 15% *versus* 35% para crianças de 6 a 10 anos,  $p=0,001$ ), magnésio (adequação de 35% *versus* 70% para crianças de 6 a 10 anos,  $p=0,001$ ) e zinco (adequação de 25% *versus* 74% para crianças de 6 a 10 anos,  $p=0,006$ ).

Dentre os micronutrientes avaliados, o fornecimento de cálcio foi muito baixo para ambas as faixas etárias (adequação de 5%,  $p=1,000$ ). Em contrapartida, o ferro foi o micronutriente fornecido corretamente em quase todos os cardápios, sendo a oferta menor que o recomendado em apenas um dia para a menor faixa etária e quatro dias para a maior faixa etária.

A quantidade fornecida das vitaminas A e C não atingiram ao recomendado em 30 a 40% dos dias para ambas as faixas etárias. Contudo, o percentual de adequação mensal foi maior que 100%. A análise do fornecimento de fibras dietéticas indicou o mesmo perfil das vitaminas, 30 a 35% dos dias não atingiu o recomendado, entretanto, o percentual de adequação mensal foi maior que 100%.

## DISCUSSÃO

Dentre os resultados principais desta pesquisa foi observado que os cardápios avaliados não atenderam as necessidades nutricionais mínimas em relação ao fornecimento energético, de macronutrientes e micronutrientes aos alunos em um mesmo dia, como determinado pela legislação do PNAE<sup>3</sup>. Houve inadequação energética em 35% dos cardápios avaliados para a faixa etária de 6 a 10 anos, mas verifica-se o atendimento de 118% das necessidades quando é calculada a adequação média mensal, o que aponta para a ocorrência de excessos em alguns dias e insuficiência em outros<sup>3</sup>. É importante ressaltar as oscilações nas ofertas de energia e nutrientes nos cardápios avaliados que podem estar associadas a dificuldade da administração financeira do (pequeno) recurso fornecido pelo governo<sup>2</sup>.

Percentual significativo de cardápios inadequados em relação à energia, proteína, lipídios, fibras, cálcio e magnésio para a faixa etária de 11 a 15 anos foi observado quando comparados com a faixa etária de 6 a 10 anos. Desta forma, verifica-se a necessidade de diferenciar o cardápio e/ou o *per capita* de acordo com as faixas etárias, a fim de atender as necessidades de escolares com idade superior a 11 anos<sup>3</sup>. Retondario et al<sup>6</sup> objetivaram determinar a composição nutricional das refeições oferecidas em creches municipais de Curitiba que atendiam crianças de 7 a 11 meses e de 12 a 36 meses, e também encontrou que o mesmo cardápio foi utilizado para

as diferentes faixas etárias em 95% dos dias avaliados, sendo oferecida a mesma porção para essas crianças. Dessa forma, para o grupo mais novo, as refeições servidas atenderam às recomendações da PNAE para energia, carboidratos, proteínas, conteúdo de cálcio, mas não atenderam para ferro e lipídios enquanto para o grupo de 12 a 36 meses, as porções servidas obedeceram aos valores do PNAE para proteínas e cálcio, mas não ofertaram quantidade suficiente de energia, carboidratos, lipídios, fibras e ferro.

Observamos que, para os macronutrientes, as menores frequências dos cardápios adequados ocorreram para os lipídios para ambos os grupos de alunos. A recomendação é de 25 a 35% das calorias da dieta sejam provenientes de lipídios, o que garante o fornecimento adequado de calorias. Além disso, a ingestão de gordura está ligada à saciedade e representa uma fonte de vitaminas lipossolúveis, bem como ácidos graxos essenciais usados na síntese de ácidos graxos insaturados de cadeia longa<sup>15,16</sup>. A adequação no fornecimento de macronutrientes foi previamente demonstrada pela literatura<sup>4-6</sup>. O consumo adequado de macronutrientes é essencial na infância e adolescência, devido o crescimento acelerado nessa fase, que requer energia e aminoácidos para construir novos tecidos, especialmente órgãos e músculos<sup>17</sup>. O aporte insuficiente de lipídios e carboidratos acarreta em utilização de proteínas como fonte energética, podendo assim acarretar um déficit no crescimento<sup>16,17</sup>.

O conteúdo de ferro oferecido seguiu as recomendações da PNAE em 95% dos dias para os escolares mais jovens e 80% dos dias para aqueles com idade maior do que 11 anos, sendo que o percentual de adequação mensal foi maior que 100% para ambos os grupos. A recomendação de ferro ser atingida é extremamente importante, pois no Brasil a anemia ferropriva tem elevada prevalência entre crianças<sup>18,19</sup> e a deficiência deste micronutriente está relacionada a prejuízos no desenvolvimento neuropsicomotor, afetando a capacidade de aprendizagem, além da diminuição da imunidade celular, que pode ocasionar menor resistência às infecções<sup>17</sup>. Em consonância com os dados avaliados pelo nosso estudo, a pesquisa de Silva e Gregório<sup>5</sup> também encontrou adequação no fornecimento de ferro para ambas as faixas etárias.

Quanto a oferta de vitamina C, o recomendado é oferecer 50 mg especialmente na forma de frutas

ou sucos de frutas em uma mesma refeição, para aumentar a oferta desta vitamina e a disponibilidade do ferro não-heme, que é dependente da solubilização do ferro ingerido no estômago e redução a forma ferrosa para absorção<sup>20</sup>. Neste sentido, foi possível verificar que a maioria dos cardápios avaliados seguiam o recomendado (65 *versus* 70%), mas que este percentual ainda estava longe da totalidade dos cardápios avaliados.

De modo alarmante, observou-se na nossa pesquisa que o teor de cálcio nos cardápios era mínimo em ambos os grupos avaliados. Pesquisa realizada em escolas públicas de Viçosa<sup>4</sup> e Belo Horizonte, MG<sup>21</sup> também apontou a inadequação de cálcio nas refeições avaliadas. A importância do cálcio está relacionada à mineralização óssea e as maiores necessidades deste mineral são durante períodos de rápido crescimento, como na infância e na adolescência, a fim de alcançar um pico de massa óssea adequado<sup>22</sup>. A inadequação deste micronutriente pode estar associada a deficiência de alimentos lácteos e vegetais verde escuros ou ainda, ao consumo excessivo de alimentos fonte de ferro, podendo haver competição do ferro com o cálcio durante a absorção destes micronutrientes<sup>23</sup>. Visando operacionalizar a alimentação do escolar, contemplando as recomendações de todos os micronutrientes, e evitando a competição por sítio de absorção, é proposto que nos dias que forem servidos alimentos fontes de cálcio, não devem ser oferecidos alimentos fonte de ferro. A sugestão é oferecer, no mínimo, 3 vezes na semana, refeição salgada com alimentos variados com fontes de ferro e oferecer suplementação com alimentos fonte de cálcio com alta biodisponibilidade, no mínimo, 2 vezes na semana<sup>24</sup>.

O percentual de adequação mensal acima de 100% para fibras em ambos os grupos de crianças, demonstra que a oferta dos vegetais oscilou ao longo dos dias, possivelmente não atingindo o mínimo recomendado pelo PNAE de 200 g/aluno em todas as semanas. É importante destacar que, de acordo com a legislação, as bebidas à base de frutas não substituem a obrigatoriedade da oferta de frutas *in natura*<sup>3</sup>. Em consonância, outros trabalhos encontraram fornecimento limitado de fontes de fibras alimentares na merenda escolar<sup>4-6,21</sup>. Isso é preocupante porque outros estudos já relatam o consumo restrito de frutas e vegetais por crianças e adolescentes<sup>25,26</sup> e sabe-se que o consumo adequado de fibras tem um importante

papel no funcionamento intestinal e reduz o risco de desenvolvimento de doença coronariana, hipertensão, obesidade, diabetes e câncer de cólon<sup>27</sup>.

As hortaliças, verduras e frutas são consideradas alimentos reguladores por serem fontes de vitaminas e minerais. Então, encontramos resultados semelhantes às fibras, para a vitamina A e C, isto é, 30 a 40% dos cardápios com inadequações, mas o percentual de adequação mensal foi acima de 100%. Além dos vegetais, fontes de carotenóides, a vitamina A pode ser encontrada pré-formada em fontes alimentares de origem animal, como no fígado, no leite integral e derivados, nos ovos e nas aves. Esta vitamina está envolvida na regulação de várias funções fisiológicas, como acuidade visual, integridade do tecido epitelial, resposta imunológica e expressão gênica, desempenhando assim um papel crucial no crescimento e desenvolvimento infantil<sup>28</sup>. Silva e Gregório<sup>5</sup> avaliaram o percentual de adequação médio em relação ao recomendado pelo PNAE, não analisando a adequação diária, e observaram o aporte suficiente para estas vitaminas para escolares de 6 a 15 anos, assim como o presente estudo. Em contraposição, no trabalho de Issa et al<sup>21</sup> a mediana do aporte de vitamina A estava inadequada nos cardápios planejados e naqueles executados para escolares de 6 a 15 anos.

Para o magnésio a inadequação foi maior do que aquela verificada para as vitaminas na faixa etária de 11 a 15 anos. Verificou-se 65% dos cardápios com aporte insuficiente de magnésio para esta faixa etária e 87% de adequação em relação ao recomendado pelo PNAE. Já para a menor faixa etária, o percentual de adequação foi de 147%, com inadequação em 30% dos dias analisados. As principais fontes alimentares de magnésio são os cereais integrais, vegetais folhosos verdes, espinafre, nozes, frutas, legumes e tubérculos, então, demonstra-se necessário aumentar as porções destes alimentos principalmente para a maior faixa etária. É importante atender às necessidades de magnésio, porque este mineral desempenha um papel crítico na manutenção da função normal dos nervos e músculos, excitabilidade cardíaca, integridade óssea e metabolismo da glicose e insulina. A deficiência tem sido associada a várias doenças crônicas, incluindo enxaquecas, doenças de Alzheimer, acidente vascular cerebral, hipertensão, doenças cardiovasculares e diabetes mellitus tipo 2<sup>29</sup>.

Ao final do estudo, os resultados da pesquisa foram apresentados para a nutricionista (responsável técnica da escola) e equipe de merendeiras objetivando correções, principalmente quanto ao melhor planejamento das refeições e preparações e adequação do tamanho das porções a serem oferecidas para os escolares. Nesta ocasião, foram discutidas estratégias corretivas como a interferência no abastecimento e verificação das características dos diferentes produtos (sazonalidade), combinação de alimentos levando em consideração a biodisponibilidade dos nutrientes, capacitação de merendeiras com ações de EAN, aproveitamento integral dos alimentos, promoção da utilização dos alimentos *in natura* e conversão dos valores em tabelas de composição alimentar.

A proposta deste estudo foi avaliar a composição nutricional dos cardápios, isto é, daquilo que foi planejado para alimentação do escolar. Neste trabalho, as preparações que realmente foram distribuídas aos alunos não foram avaliadas, e isto pode ser uma limitação, pois o estudo realizado no Maranhão apontou que apenas 16% das preparações oferecidas atenderam ao cardápio planejado<sup>30</sup> e estudo conduzido em Belo Horizonte identificou alterações em 79% dos cardápios planejados no momento da execução<sup>21</sup>. Outra limitação foi a ausência da avaliação qualitativa dos cardápios, não sendo possível discorrer a respeito da presença de aditivos químicos, açúcar, sódio, gorduras saturada e trans nos alimentos oferecidos. Esta abordagem seria importante em futura pesquisa, já que o consumo de alimentos ultraprocessados acarreta efeitos maléficos à saúde e as recomendações nutricionais da alimentação escolar devem ser atendidas principalmente por alimentos *in natura* ou minimamente processados<sup>31</sup>, sendo vedada a aquisição de bebidas e alimentos ultraprocessados descritos na legislação<sup>3</sup>.

## CONCLUSÃO

Os cardápios avaliados atenderam parcialmente às necessidades nutricionais dos estudantes com melhores resultados para a faixa etária de 6 a 10 anos. O pequeno suprimento de energia, carboidratos, lipídios e cálcio para a faixa etária de 11 a 15 anos comprometem as premissas estabelecidas pelo PNAE. Esta avaliação pode ser instrumento fundamental para

o nutricionista como responsável técnico da PNAE, de modo a embasar melhores planejamentos dos cardápios do município avaliado visando, desta forma, a garantia da segurança alimentar e nutricional dos alunos e, assim, a otimização desta política pública.

Ações estratégicas corretivas precisam ser realizadas com as equipes técnicas de modo contínuo, focando o melhor planejamento dos cardápios e adequações para cada faixa etária, bem como, monitoração contínua dos cardápios para evitar grandes flutuações dos aportes nutricionais ao longo dos dias.

## REFERÊNCIAS

1. Ministério de Educação e Cultura (BR). Divisão de Educação Extra-Escolar do Departamento Nacional de Educação Decreto nº 37.106, de 31 de março de 1955. Institui a Campanha de Merenda Escolar. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 02 abr 1955. Seção 1:1. Disponível em: <https://www.jusbrasil.com.br/diarios/2530102/pg-3-secao-1-diario-oficial-da-uniao-dou-de-02-04-1955>
2. Peixinho AML. A trajetória do Programa Nacional de Alimentação Escolar no período de 2003-2010: relato do gestor nacional. *Cienc Saude Colet*. 2013;18(4):909-6. <https://doi.org/10.1590/S1413-81232013000400002>
3. Ministério da Educação (BR). Fundo Nacional de Desenvolvimento da Educação. Resolução/CD/FNDE nº 06, de 08 de maio de 2020. Dispõe sobre o atendimento da alimentação escolar aos alunos da educação básica no âmbito do Programa Nacional de Alimentação Escolar - PNAE. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 12 mai 2020. Seção 1(89):38-44. Disponível em: <https://www.fn.de.gov.br/index.php/aceso-a-informacao/institucional/legislacao/item/13511-resolu%C3%A7%C3%A3o-n%C2%BA-6,-de-08-de-maio-de-2020>
4. Rocha NP, Filgueiras MS, Albuquerque FM, Milagres LC, Castro APP, Silva MA et al. Análise do programa nacional de alimentação escolar no município de Viçosa, MG, Brasil. *Rev Saude Publica*. 2018;52:16. <https://doi.org/10.11606/s1518-8787.2018052007090>

5. Silva MMDC, Gregório EL. Avaliação da composição nutricional dos cardápios da alimentação escolar das escolas da rede municipal de Taquaraçu de Minas -MG. *HU Rev*. 2012;37(3):387-94. Disponível em: <https://periodicos.ufff.br/index.php/hurevista/article/view/1734>
6. Retondario A, Silva DL, Salgado SM, Alves MA, Ferreira SM. Nutritional composition of school meals serving children from 7 to 36 months of age in municipal day-care centers in the metropolitan area of Curitiba, Paraná, Brazil. *Br J Nutr*. 2016;115(12):2203-11. <https://doi.org/10.1017/S0007114516001434>
7. Leão PV, Dias RM, Frazão AGF, Cavalcanti CDTD, Silva IRP, Andrade MA. Análise dos cardápios elaborados em um município do nordeste paraense. *Cad. Saude Colet*. 2019;27(3): 264-71. <https://doi.org/10.1590/1414-462x201900030033>
8. França TGD, Ishikawa LLW, Zorzella-Pezavento SFG, Chiuso-Minicucci F, da Cunha MLRS, Sartori A. Impact of malnutrition on immunity and infection. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2009;15(3):374-90. <https://doi.org/10.1590/S1678-91992009000300003>
9. Tanner S, Leonard WR, Reyes-García V, TAPS Bolivia Study Team. The consequences of linear growth stunting: influence on body composition among youth in the Bolivian Amazon. *Am J Phys Anthropol*. 2014;153(1):92-102. <https://doi.org/10.1002/ajpa.22413>
10. Hoffman DJ. Growth retardation and metabolic programming: implications and consequences for adult health and disease risk. *J Pediatr*. 2014;90(4):325-8. <https://doi.org/10.1016/j.jpmed.2014.04.005>
11. Vaz CS. Restaurantes: controlando custos e aumentando lucros. Brasília (DF): Editora LGE; 2006.
12. Pinheiro ABV, Lacerda EMA, Benzecry EH, Gomez MCS, Costa VM. Tabela para Avaliação de Consumo Alimentar em Medidas Caseiras. 4.ed. São Paulo (SP): Editora Atheneu; 2008.
13. Tabela brasileira de composição de alimentos - TACO. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação - NEPA, Universidade Estadual de Campinas. 4.ed., rev., ampl. Campinas (SP): NEPA-UNICAMP; 2011. Disponível em: [http://www.nepa.unicamp.br/taco/contar/taco\\_4\\_edicao\\_ampliada\\_e\\_revisada.pdf?arquivo=taco\\_4\\_versao\\_ampliada\\_e\\_revisada.pdf](http://www.nepa.unicamp.br/taco/contar/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf?arquivo=taco_4_versao_ampliada_e_revisada.pdf)
14. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009: tabelas de composição nutricional dos alimentos consumidos no Brasil. Rio de Janeiro: IBGE; 2011. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv50002.pdf>
15. Sociedade Brasileira de Pediatria. Manual de orientação para a alimentação do lactente, do pré-escolar, do escolar, do adolescente e na escola. 3.ed. Rio de Janeiro (RJ): SBP; 2012. Disponível em: [https://www.sbp.com.br/fileadmin/user\\_upload/publicacoes/14617a-pdmanualnutrologia-alimentacao.pdf](https://www.sbp.com.br/fileadmin/user_upload/publicacoes/14617a-pdmanualnutrologia-alimentacao.pdf)
16. Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids. Washington (DC): National Academies Press; 2002.
17. Vitolo MR. Nutrição da gestação ao envelhecimento. 2. ed., rev., ampl. Rio de Janeiro (RJ): Rubio; 2015.
18. Novaes TG, Gomes AT, Silveira KC, Magalhães EIS, Souza CL, Netto MP et al. Prevalência e fatores associados à anemia em crianças de creches: uma análise hierarquizada. *Rev Paul Pediatr*. 2017;35(3):281-8. <https://dx.doi.org/10.1590/1984-0462/2017;35;3;00008>
19. Oliveira TSC, Silva MC, Santos JN, Rocha DS, Alves CRL, Capanema FD et al. Anemia entre pré-escolares - um problema de saúde pública em Belo Horizonte, Brasil. *Cienc Saude Colet*. 2014;19(1):59-66. <https://doi.org/10.1590/1413-81232014191.1927>
20. Bortolini GA, Fisberg M. Orientação nutricional do paciente com deficiência de ferro. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2010;32(Supl.2):105-13. <https://dx.doi.org/10.1590/S1516-84842010005000070>
21. Issa RC, Moraes LF, Francisco RRJ, Santos LC, Anjos AFV, Pereira SCL. Alimentação escolar: planejamento, produção, distribuição e adequação. *Rev Panam Salud Publica*. 2014;35(2):96-103. Disponível em: <https://www.scielosp.org/article/rpsp/2014.v35n2/96-103>
22. Bueno AL, Czepielewski MA. A importância do consumo dietético de cálcio e vitamina D no crescimento. *J Pediatr*. 2008;84(5):386-94. <https://dx.doi.org/10.2223/JPED.1816>
23. Skibsted LH. Mineral nutrient interaction: improving bioavailability of calcium and iron. *Food Sci Biotechnol*.

- 2016;25(5):1233-41. <https://dx.doi.org/10.1007/s10068-016-0196-2>
24. Ministério da Educação (BR). Fundo Nacional de Desenvolvimento da Educação (FNDE) - Programa Nacional de Alimentação Escolar (PNAE). Referências Nutricionais para o Programa Nacional de Alimentação Escolar. Brasília (DF): FNDE; 2009.
25. Levy RB, Castro IRR, Cardoso LO, Tavares LF, Sardinha LMV, Gomes FS et al. Consumo e comportamento alimentar entre adolescentes brasileiros: Pesquisa Nacional de Saúde do Escolar (PeNSE), 2009. *Cienc Saude Colet*. 2009;15(Supl.2):3085-97. <https://dx.doi.org/10.1590/S1413-81232010000800013>
26. Costa LCF, Vasconcelos FAG, Corso ACT. Fatores associados ao consumo adequado de frutas e hortaliças em escolares de Santa Catarina, Brasil. *Cad Saude Publ*. 2012;28(6):1133-42. <https://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2012000600012>
27. Bernaud FSR, Rodrigues TC. Fibra alimentar: ingestão adequada e efeitos sobre a saúde do metabolismo. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2013;57(6):397-405. <https://dx.doi.org/10.1590/S0004-27302013000600001>
28. Martini S, Rizzello A, Corsini I, Romanin B, Fiorentino M, Grandi S et al. Vitamin A deficiency due to selective eating as a cause of blindness in a high-income setting. *Pediatrics*. 2018;141(Suppl. 5):S439-S44. <https://dx.doi.org/10.1542/peds.2016-2628>
29. Volpe SL. Magnesium in disease prevention and overall health. *Adv Nutr*. 2013;4(3):378S-83S. <https://dx.doi.org/10.3945/an.112.003483>
30. Costa CN, Capelli JCS, Rocha CMM, Monteiro GTR. Disponibilidade de alimentos na alimentação escolar de estudantes do ensino fundamental no âmbito do PNAE, na cidade de Codó, Maranhão. *Cad Saude Colet*. 2017;25(3):348-54. <https://dx.doi.org/10.1590/1414-462X201700030249>
31. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia alimentar para a população brasileira. 2.ed. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2014. Disponível em: [https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_alimentar\\_populacao\\_brasileira\\_2ed.pdf](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_alimentar_populacao_brasileira_2ed.pdf)



# Composição química e aceitabilidade de pão sem glúten desenvolvido com mucilagem de quiabo

## Chemical composition and acceptance of gluten-free bread developed with okra mucilage

RIALA6/1786

Vivian Cristina da Cruz RODRIGUES<sup>1</sup>, Kellen Cristina da Cruz RODRIGUES<sup>1</sup>, Cristiane Gonçalves de Oliveira FIALHO<sup>2</sup> *in memoriam*, Maria Inês Dantas BASTIANI<sup>3</sup>, Regina Célia Rodrigues Miranda MILAGRES<sup>3\*</sup>, Eliana Carla Gomes de SOUZA<sup>3</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>3</sup>Departamento de Nutrição e Saúde, Universidade Federal de Viçosa, Avenida Peter Henry Rolfs, s/nº, Campus Universitário, Viçosa, MG, Brasil, CEP: 36570-900. Tel: 31 3612 5185. E-mail: [reginamilagres@ufv.br](mailto:reginamilagres@ufv.br)

<sup>1</sup>Laboratório de Látexes, Probióticos e Prebióticos, Faculdade de Ciências Aplicadas, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Análise Instrumental de Alimento, Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brasil *in memoriam*

Recebido: 24.04.2019 - Aceito para publicação: 14.08.2020

### RESUMO

Com objetivo de produzir pão sem glúten com composição química aprimorada e boa qualidade sensorial, foram elaboradas três formulações com diferentes quantidades de mucilagem de quiabo: (F0) 0 mL; (F1) 100 mL; (F2) 150mL. Determinou-se: rendimento da mucilagem, composição centesimal, valor calórico e atributos sensoriais dos pães por meio de escala hedônica. A mucilagem aumentou o rendimento das F1 e F2. Não houve diferença no teor de proteínas e o teor de lipídios de 7,9 g 100 g<sup>-1</sup> (F1) e 6,0 g 100 g<sup>-1</sup> (F2) foram inferiores ao da F0. A umidade da F1 (32,15 g 100 g<sup>-1</sup>) foi menor que nas demais formulações, enquanto cinzas (0,70 g 100 g<sup>-1</sup>), carboidrato (56,75 g 100 g<sup>-1</sup>) e valor calórico (308,1 kcal 100 g<sup>-1</sup>) foram superiores. No teste sensorial, todos os atributos foram avaliados nas categorias “gostei ligeiramente” e “gostei extremamente” pela maioria dos julgadores. A F1 obteve avaliações superiores às da F2 para textura, cor e impressão global e não diferiu em nenhum dos atributos na F0. Conclui-se que a F1 pode ser uma opção viável na busca de pão sem glúten com composição química aprimorada, por conter menor teor de lipídio e umidade, maior teor de cinzas e boa aceitação sensorial.

**Palavras-chave.** polissacarídeos, hidrocolóides, *Hibiscus esculentus* L, doença celíaca.

### ABSTRACT

With the goal of producing gluten-free bread with improved chemical composition and good sensory quality, three formulations were prepared with different amounts of okra mucilage: (F0) 0 mL; (F1) 100 mL; (F2) 150 mL. From this was determined: mucilage yield, centesimal composition, caloric value and sensory attributes of bread by hedonic scale. Mucilage increased the yield of F1 and F2. There was no difference in protein content and the lipid content of 7.9 g 100 g<sup>-1</sup> (F1) and 6.0 g 100 g<sup>-1</sup> (F2) were lower than that of F0. The moisture content of F1 (32.15 g 100 g<sup>-1</sup>) was lower than the other formulations, while ash (0.70 g 100 g<sup>-1</sup>), carbohydrate (56.75 g 100 g<sup>-1</sup>) and caloric value (308.1 kcal 100 g<sup>-1</sup>) were higher. In the sensory test, attributes were rated in the categories “liked slightly” and “liked extremely” by most judges. F1 scored higher than F2 for texture, color and overall impression and did not differ in any of the attributes at F0. It can be concluded that F1 may be a viable option in the search for gluten-free bread with improved chemical composition, as it contains lower lipid and moisture content, higher ash content and good sensory acceptance.

**Keywords.** polysaccharides, hydrocolloids, *Hibiscus esculentus* L, celiac disease.

## INTRODUÇÃO

Doenças relacionadas ao consumo de glúten como a doença celíaca, a sensibilidade não celíaca ao glúten e a alergia ao trigo crescem a cada dia<sup>1</sup>. Vários fatores podem ter contribuído para esse crescimento, dentre eles a adesão extensiva da dieta mediterrânea em todo o mundo<sup>2</sup>, passando pelo uso crescente de pesticidas na agricultura que possibilitam o surgimento de trigos com peptídeos tóxicos de glúten<sup>3</sup> e tempo reduzido de fermentação dos produtos de panificação<sup>4</sup>. As proteínas do glúten (glutelinas e prolaminas) são resistentes ao processo de digestão, o que causa o aumento da permeabilidade intestinal por meio do rearranjo citoesqueleto, superexpressão da zonulina e disfunção das junções apertadas<sup>5</sup>.

O único tratamento para essas doenças relacionadas ao glúten é sua exclusão da alimentação, ou seja, qualquer preparação que tenha em sua composição trigo, cevada e centeio. Porém, a adesão a essa dieta torna-se um complicador para os pacientes, uma vez que há restrição dos alimentos que podem ser consumidos e mudanças de hábito alimentar<sup>6</sup>. Assim, alimentos como biscoitos, bolos, massas e pães que contenham glúten devem ter suas receitas adaptadas, já que o mesmo é o responsável por características específicas desses produtos, como estruturação, crescimento, maciez, viscosidade e elasticidade<sup>7</sup>.

As características supracitadas em massas que contêm glúten ocorrem quando suas principais frações proteicas (gluteninas e gliadinas) entram em contato com a água durante o processamento dos produtos<sup>7</sup>. Ao retirar o glúten, os produtos perdem essas características, o que influencia principalmente a qualidade sensorial. Para que os produtos sejam sensorialmente aceitáveis e com melhor qualidade, é necessária a adição de ingredientes como os hidrocolóides para substituição do glúten. Estes podem aumentar a retenção de umidade e a maciez do produto, a exemplo o miolo do pão, durante o armazenamento de pães sem glúten<sup>5</sup>.

Os hidrocolóides encontrados no quiabo (*Hibiscus esculentus*) têm sido estudados e utilizados pelas indústrias farmacêuticas e alimentícias, principalmente, por sua característica viscoelástica<sup>8</sup>. Apresentam propriedades emulsificante e de formação de espuma, boa capacidade de absorção de água e óleo e são fontes potenciais de antioxidantes<sup>9</sup>.

Além de conter carboidratos (açúcares e outros polissacarídeos), proteínas e minerais<sup>5</sup>.

Mesmo existindo inúmeros hidrocolóides derivados de várias matrizes alimentares, o extraído do quiabo é uma alternativa viável pela facilidade de extração. Além disso, este fruto é amplamente encontrado, possui preço acessível e é utilizado cotidianamente em refeições, o que facilita a aceitação pelos consumidores<sup>10</sup>. Ademais, não foram encontrados na literatura científica estudos que avaliaram o efeito da mucilagem do quiabo em pães sem glúten com a finalidade de melhorar características sensoriais.

O pão é um dos alimentos mais consumidos diariamente no Brasil e é relatado como um dos itens que mais fazem falta para pacientes que necessitam de uma alimentação isenta de glúten<sup>6</sup>. Os pães sem glúten perdem as características sensoriais esperadas, pois geralmente, possuem miolo compacto, volume e vida de prateleira reduzidos.

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi produzir pão sem glúten com diferentes teores de mucilagem, composição química aprimorada e boa qualidade sensorial.

## MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Departamento de Nutrição e Saúde (DNS) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) no período de março a outubro de 2015, submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFV, sob o número 474.773.

### Extração da mucilagem

O quiabo foi adquirido no comércio da cidade de Viçosa (MG), higienizado e fatiado em rodelas finas. Para a extração da mucilagem foram realizados pré-testes variando a proporção de água, tempo e temperatura de cozimento, sendo que a proporção de água e quiabo de 1,5:1 (v:v), na temperatura de 270°C por 10 min obteve a consistência desejada. Após cocção, a mistura foi submetida ao descanso, por aproximadamente 25 min à temperatura ambiente, para o resfriamento e posteriormente filtragem em tecido de algodão.

O rendimento da mucilagem foi calculado a partir da diferença entre o somatório dos ingredientes utilizados para a extração e o peso final da mucilagem.

### Preparo do pão

Três formulações de pães sem glúten foram elaboradas: F0 - Formulação controle (sem adição de mucilagem); F1 - Formulação adicionada de 100 mL de mucilagem de quiabo; F2 - Formulação com 150 mL de mucilagem de quiabo.

Para a elaboração dos pães, o fermento foi diluído em 45 mL de água e adicionado aos ingredientes secos, previamente misturados. Posteriormente, juntou-se água e mucilagem nas proporções de 100 mL e 150 mL de acordo com a formulação pretendida. A mistura foi homogeneizada em batedeira por 2 min. A massa foi colocada em formas untadas e polvilhadas e levadas para assar a 180°C em forno doméstico a gás. O tempo de cocção variou de acordo com a formulação: 32 min, 35 min e 46 min para as preparações controle, com a adição de 100 mL e 150 mL de mucilagem, respectivamente.

Os ingredientes utilizados nas formulações dos três pães foram os seguintes: Farinha de Arroz (225 g), Polvilho Doce (200 g), Açúcar Mascavo (21 g), Água (150 mL), Fermento Biológico Fresco (30 g), Óleo Vegetal (42,3 mL), Sal (1,1 g), Ovo (167,8 g) e Mucilagem de Quiabo (0mL - F0; 100 mL - F1 e 150 mL - F2).

### Composição centesimal

As determinações de composição centesimal foram conduzidas no Laboratório de Análise Instrumental de Alimentos da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF): *Umidade*: método gravimétrico, por meio de secagem em estufa a 105°C; *Cinzas*: método gravimétrico, por aquecimento a 550°C em mufla; *Proteína*: método de Micro-Kjeldahl, digestão com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, destilação com NaOH 50% e titulação com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,02 N. Foi utilizado o fator de conversão para proteína bruta de 6,25; *Lipídios*: extração com éter de petróleo, em aparelho do tipo Soxhlet; *Carboidrato total*: calculado pela diferença entre 100 e a soma dos conteúdos de umidade, proteínas, lipídios e cinzas<sup>11</sup>.

### Valor calórico

O valor calórico (kcal) foi calculado conforme os valores de conversão de Atwater

(4 kcal g 100 g<sup>-1</sup> para carboidratos e proteína e 9 kcal g 100 g<sup>-1</sup> para lipídios)<sup>12</sup>.

### Análise sensorial

A análise de aceitabilidade dos pães foi realizada no Laboratório de Análise Sensorial de Alimentos, do DNS/UFV. Julgadores não treinados, de ambos os sexos, participaram da análise, após leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

As amostras de pães, com peso aproximado de 10 g, foram codificadas com algarismo de três dígitos e apresentadas aos julgadores de forma monádica, de acordo com o delineamento de blocos inteiramente casualizados. Os consumidores avaliaram os atributos de cor, textura, sabor e aceitação global das formulações. Utilizou-se escala hedônica estruturada de nove pontos que variaram de: 1 = desgostei extremamente a 9 = gostei extremamente<sup>13</sup>.

### Análise estatística

Os resultados das análises sensoriais e da composição centesimal foram submetidos à análise de variância, de acordo com os procedimentos estabelecidos no *General Linear Model* do SAS/STAT9.3, para a verificação de diferenças estatisticamente significativas entre as médias das variáveis estudadas. Para a comparação entre as médias, empregou-se o teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

## RESULTADOS

### Rendimento da mucilagem

O rendimento da mucilagem foi de, aproximadamente, 66% em relação ao peso da mistura do quiabo com a água. O peso final da formulação controle foi de 786,7 g e com a adição de 100 mL e 150 mL de mucilagem, houve um aumento de 0,94% e 13,3%, respectivamente, no rendimento das preparações.

### Composição centesimal e valor energético dos pães

Na **Tabela 1** encontram-se os resultados da composição centesimal e do valor calórico das preparações.

**Tabela 1.** Composição centesimal e valor calórico das formulações de pães com e sem mucilagem de quiabo

| Parâmetros                                | F0                        | F1                        | F2                        |
|-------------------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Umidade (g 100 g <sup>-1</sup> )          | 36,8 ± 0,42 <sup>b</sup>  | 32,2 ± 0,11 <sup>c</sup>  | 42,8 ± 0,03 <sup>a</sup>  |
| Cinzas (g 100 g <sup>-1</sup> )           | 0,6 ± 0,01 <sup>b</sup>   | 0,7 ± 0,02 <sup>a</sup>   | 0,6 ± 0,01 <sup>b</sup>   |
| Proteína (g 100 g <sup>-1</sup> )         | 3,1 ± 0,32 <sup>a</sup>   | 2,5 ± 0,27 <sup>a</sup>   | 3,0 ± 0,25 <sup>a</sup>   |
| Lipídio (g 100 g <sup>-1</sup> )          | 8,3 ± 0,00 <sup>a</sup>   | 7,9 ± 0,01 <sup>b</sup>   | 6,0 ± 0,01 <sup>c</sup>   |
| Carboidrato (g 100 g <sup>-1</sup> )      | 51,3 ± 0,00 <sup>b</sup>  | 56,8 ± 0,00 <sup>a</sup>  | 47,6 ± 0,00 <sup>c</sup>  |
| Valor Calórico (kcal 100 g <sup>1</sup> ) | 292,0 ± 1,72 <sup>b</sup> | 308,1 ± 0,37 <sup>a</sup> | 256,8 ± 0,12 <sup>c</sup> |

F0 - Formulação controle; F1 - Formulação com 100 mL de mucilagem de quiabo; F2 - Formulação com 150 mL de mucilagem de quiabo. Médias seguidas da mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ )

### Análise sensorial dos pães

Um total de cinquenta e cinco (55) julgadores participaram da pesquisa. Todas as formulações

foram bem aceitas, com predomínio de notas acima de 6, entre os termos hedônicos “Gostei ligeiramente” e “Gostei extremamente” (**Tabela 2**).

**Tabela 2.** Análise sensorial das formulações de pães com e sem mucilagem de quiabo

| FORMULAÇÕES |            | COR                     | TEXTURA                  | SABOR                   | IMPRESSÃO GLOBAL         |
|-------------|------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
| F0          | média ± DP | 7,7 ± 1,11 <sup>a</sup> | 6,8 ± 1,52 <sup>ab</sup> | 6,4 ± 1,46 <sup>a</sup> | 6,8 ± 1,31 <sup>ab</sup> |
|             | 9 - 6* (%) | 96,4                    | 85,4                     | 76,4                    | 86,7                     |
|             | 5 - 2* (%) | 3,6                     | 14,6                     | 23,6                    | 13,3                     |
| F1          | média ± DP | 7,4 ± 1,38 <sup>a</sup> | 7,3 ± 1,22 <sup>a</sup>  | 6,8 ± 1,30 <sup>a</sup> | 7,2 ± 1,10 <sup>a</sup>  |
|             | 9 - 6* (%) | 74,6                    | 72,7                     | 76,4                    | 76,9                     |
|             | 5 - 2* (%) | 25,4                    | 27,3                     | 26,6                    | 23,1                     |
| F2          | média ± DP | 6,5 ± 1,62 <sup>b</sup> | 6,3 ± 1,88 <sup>b</sup>  | 6,3 ± 1,55 <sup>a</sup> | 6,6 ± 1,52 <sup>b</sup>  |
|             | 9 - 6* (%) | 89,1                    | 96,4                     | 87,3                    | 96,2                     |
|             | 5 - 2* (%) | 10,9                    | 3,6                      | 12,7                    | 3,8                      |

F0 - Formulação controle; F1 - Formulação com 100 mL de mucilagem de quiabo; F2 - Formulação com 150 mL e mucilagem de quiabo. \*Faixa de valores da escala hedônica. Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ )

## DISCUSSÃO

A formulação com 150 mL de mucilagem de quiabo (F2) apresentou aumento de 18% de umidade em relação à formulação sem adição de mucilagem (F0). O aumento da umidade pode estar relacionado à capacidade de retenção de água da mucilagem<sup>8</sup>, o que é desejável em produtos de panificação sem glúten. Vale destacar, que o conteúdo de umidade das F1 (100 mL de mucilagem) e F0 atendeu à legislação brasileira, que estipula teores máximos de 38% para pães tradicionais<sup>14</sup>.

Apesar da mucilagem de quiabo conter níveis significativos de proteína<sup>8</sup> devido à ligação entre a proteína e os polissacarídeos, não houve diferença

nos valores de proteínas entre as formulações neste estudo. Observou-se, ainda, que houve diferença entre os conteúdos lipídico das formulações. É possível que, o acréscimo de mucilagem tenha aumentado a massa total das preparações e, conseqüentemente, houve uma diluição dos teores lipídicos e protéicos das formulações testes.

A F1 apresentou teores maiores de carboidrato e cinzas que as demais formulações, o que pode ser explicado pelo fato da mucilagem do quiabo conter níveis significativos de carboidratos e minerais<sup>9</sup>. Em relação a F2, o teor de umidade foi significativamente maior que F0 e F1, o que fez com que aumentasse o volume da amostra e, conseqüentemente, reduzisse o teor de cinzas e também de carboidrato total.

A RDC nº 359, de 23 de dezembro de 2003, estabelece o valor energético médio de 150 kcal por porção (50g) para produtos de panificação<sup>15</sup>. Observou-se que a formulação F1 atendeu à legislação brasileira, em relação ao valor calórico.

Em relação às características sensoriais, em todos os atributos pesquisados (cor, textura, sabor e impressão global), entre 72,7 e 96,4% dos julgadores atribuíram notas entre 9 e 6 na escala hedônica, para todas as formulações, o que demonstra a boa aceitação dos pães desenvolvidos sem glúten.

Os julgadores atribuíram aos parâmetros de cor, textura e impressão global da F1 melhores avaliações quando comparadas com F2 e não observaram diferença da F0. Esses achados revelaram que a adição de 100 mL de mucilagem não influenciou negativamente nesses atributos sensoriais. Como a cor é uma importante ferramenta para a aceitação e posterior compra de um novo produto alimentício, a adição de 100 mL de mucilagem, pode ser considerada adequada. A textura também é um outro atributo sensorial de grande importância para a aceitação dos alimentos. A maior quantidade de fibras solúveis provenientes da mucilagem na F2, pode ter afetado a sua textura, levando a uma avaliação com menor pontuação pelos julgadores<sup>8</sup>.

Quanto ao parâmetro sabor, não houve diferença ( $p>0,05$ ) entre as amostras. O sabor é considerado um dos fatores indicadores da qualidade dos alimentos. Sendo assim, a adição da mucilagem de quiabo nas preparações não interferiu negativamente na aceitação e qualidade sensorial das formulações.

Vale ressaltar, que além da boa aceitação, o pão desenvolvido neste estudo também não continha leite permitindo que pessoas intolerantes à lactose, também possam consumi-lo.

## CONCLUSÃO

Em relação às características químicas e sensoriais pode-se afirmar que o pão adicionado de 100 mL de mucilagem de quiabo (F1) pode ser considerada como alternativa viável para consumidores de produtos sem glúten, uma vez que contém menor teor de lipídio e de umidade, maior teor de cinzas e boa aceitação sensorial em relação aos

demais pães avaliados, o que amplia as perspectivas de comercialização para este nicho de mercado. Ademais, o quiabo é acessível e bem aceito pelos consumidores e sua mucilagem é de fácil extração.

Outros estudos são necessários para dar continuidade à pesquisa, a fim de buscar o aprimoramento e a validação do método de extração da mucilagem do quiabo, e oferecer um produto de qualidade para o consumidor. Além disso, a quantificação de fibras alimentares das formulações e de outros nutrientes devem ser realizadas como forma de enriquecer o conhecimento proporcionado pela presente pesquisa.

## REFERÊNCIAS

1. Volta U, de Giorgio R. New understanding of gluten sensitivity. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012;9(5):295-9. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.15>
2. Gibert A, Espadaler M, Canela MA, Sánchez A, Vaqué C, Rafecas M. Consumption of gluten-free products: should be the threshold value for trace amounts of gluten be at 20, 100 or 200 p.p.m.? *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2006;18(11):1187-95. <https://dx.doi.org/10.1097/01.meg.0000236884.21343.e4>
3. Leite EA, Camilo Júnior MS, Leite RS, Caldas TCL, Silva SC. A importância de uma alimentação equilibrada para a pessoa com autismo. *Rev Campo do Saber*. 2017;3(3):20.
4. Gobbetti M, Rizzello CG, Di Cagno R, De Angelis M. Sourdough lactobacilli and celiac disease. *Food Microbiol*. 2007;24(2):187-96. <https://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2006.07.014>
5. Morais MB, Silva GAP. Environmental enteric dysfunction and growth. *J Pediatr*. 2019;95(Suppl 1):85-94. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jpeds.2018.11.004>
6. Resende PVG, Silva NLM, Schettino GCM, Liu PMF. Doenças relacionadas ao glúten. *Rev Med Minas Gerais*. 2017;27(Supl 3):51-8. <https://dx.doi.org/10.5935/2238-3182.20170030>
7. Blomfeldt TO, Kuktaite R, Johansson E, Hedenqvist MS. Mechanical properties and network structure of wheat gluten foams. *Biomacromolecules*. 2011;12(5):1707-15. <https://doi.org/10.1021/bm200067f>

8. Ahiakpa JK, Amoatey HM, Amenorpe G, Apatey J, Ayeh EA, Quartey EK et al. Mucilage content of 21 accessions of Okra (*Abelmoschus* spp L.). *Sci. Agric*. 2014;2(2):96-101. <https://dx.doi.org/10.15192/PSCPSA.2014.2.2.96101>
9. Gemedede HF, Haki GD, Beyene F, Rakshit SK, Woldegiorgis AZ. Indigenous Ethiopian okra (*Abelmoschus esculentus*) mucilage: A novel ingredient with functional and antioxidant properties. *Food Sci Nutr*. 2018;6(3):563-71. <https://doi.org/10.1002/fsn3.596>
10. Sinha P, Ubaidulla U, Nayak AK. Okra (*Hibiscus esculentus*) gum-alginate blend mucoadhesive beads for controlled glibenclamide release. *Int J Biol Macromol*. 2015;72:1069-75. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.10.002>
11. Official Methods of Analysis - AOAC (Washington - EUA). Association of Official Analytical Chemists. 19.ed. Gaithersburg (Maryland): AOAC International; 2012.
12. Merrill AL, Watt BK. Energy value of foods: basis and derivation. Washington (DC): United States Department of Agriculture; 1973.
13. Stone H, Sidel JL. Sensory Evaluation Practices. 2. ed. London: Academic Press; 1993.
14. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 90, de 18 de outubro de 2000. Aprova o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de pão. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 20 out 2000.
15. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 359, de 23 de dezembro de 2003. Aprova regulamento técnico de porções de alimentos embalados para fins de rotulagem nutricional. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 26 dez 2003. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2003/rdc0359\\_23\\_12\\_2003.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2003/rdc0359_23_12_2003.html)



# Parâmetros microscópicos de açúcar de coco comercializados na cidade de São Paulo, Brasil: identidade e qualidade

## Microscopic parameters of coconut sugar marketed in the city of São Paulo, Brazil: identity and quality

RIALA6/1791

Laís Fernanda de PAULI-YAMADA<sup>1\*</sup>, Cinthia Iara de AQUINO<sup>2</sup>, Maria Aparecida Moraes MARCIANO<sup>1</sup>, Augusta Mendes da SILVA<sup>1</sup>, Márcia Nogueira DIMOV<sup>1</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Núcleo de Morfologia e Microscopia, Centro de Alimentos, Instituto Adolfo Lutz, Avenida Dr. Arnaldo, 355, Pacaembu, São Paulo, SP, CEP 01246-000. Tel: 11 3068 2934. E-mail: lais.yamada@ial.sp.gov.br

<sup>2</sup>Centro de Laboratório Regional de Ribeirão Preto, Instituto Adolfo Lutz, Ribeirão Preto, SP, Brasil

Recebido: 06.08.2020 - Aceito para publicação: 08.10.2020

### RESUMO

O açúcar de coco vem se tornando popular no Brasil e no mundo devido às alegações nutricionais de ser um adoçante natural e mais saudável em relação a outros açúcares. Sua produção ocorre de forma artesanal a partir da extração da seiva do floema da inflorescência da palmeira. Este trabalho teve por objetivo analisar microscopicamente a identidade e a presença de matérias estranhas em amostras de açúcar de coco, bem como verificar sua conformidade em relação às legislações sanitárias brasileiras. Foram analisadas 13 amostras comerciais de açúcar de coco da cidade de São Paulo quanto aos ensaios de pesquisa e identificação de elementos histológicos e pesquisa de matérias estranhas. A identificação de elementos histológicos vegetais revelou a presença de amidos morfologicamente semelhantes ao padrão de *Triticum* sp. (trigo), *Manihot* sp. (mandioca) e *Oryza sativa* (arroz), além de amidos alterados. Também foram encontrados elementos histológicos vegetais compatíveis com padrão de *Saccharum officinarum* (cana-de-açúcar) e de *Cocos nucifera* (coco). Todas as amostras analisadas continham matérias estranhas com predomínio de fragmentos de insetos em 100% delas. Os resultados do estudo indicam falhas nas Boas Práticas de produção do açúcar de coco e a necessidade da adequação deste produto em relação às normas vigentes.

**Palavras chave.** análise de alimentos, controle de qualidade, fraude, boas práticas, inocuidade dos alimentos, vigilância sanitária.

### ABSTRACT

Coconut sugar has become popular in Brazil and worldwide due to the nutritional claims of being a natural and healthier sweetener compared to other sugars. Its production takes places in an artisanal way from the extraction of phloem sap from the inflorescence of the palm. The aim of this work was to microscopically analyze the identity and the presence of foreign matter in samples of coconut sugar, as well as to verify its compliance with Brazilian health legislation. Thirteen commercial samples of coconut sugar from the city of São Paulo were analyzed for the research and identification of histological elements and foreign matter. The identification of vegetable histological elements revealed the presence of starches morphologically similar to the *Triticum* sp. (wheat), *Manihot* sp. (cassava) and *Oryza sativa* (rice) pattern, besides altered starches. Vegetable histological elements compatible with the *Saccharum officinarum* (sugar cane) and *Cocos nucifera* (coconut) pattern were also found. All samples analyzed contained foreign matter with predominance of insect fragments in 100% of the samples. The results of the study indicate flaws in the Good Practices for the production of coconut sugar and the need to adapt this product to current standards.

**Keywords.** food analysis, quality control, fraud, good practices, food safety, health surveillance.

## INTRODUÇÃO

O açúcar de palma é um adoçante natural elaborado a partir da seiva elaborada coletada das inflorescências de diversas espécies de palmeiras, tais como: *Arenga pinnata*, *Borassus flabellifer*, *Nypa fruticans* e *Cocos nucifera*, sendo que o açúcar derivado desta última palmeira é denominado açúcar de coco<sup>1</sup>.

Apesar do alto valor comercial, o açúcar de coco vem se tornando muito popular no Brasil e no mundo como um adoçante natural, orgânico e mais saudável em relação a outros açúcares, principalmente quando comparado ao açúcar refinado de cana. Um grande apelo nutricional vinculado a esse produto é em relação ao baixo Índice Glicêmico<sup>1,2</sup>.

Indonésia, Filipinas e Tailândia são os maiores produtores e fornecedores de açúcar de coco para o mercado global<sup>3</sup>. Não foram encontrados dados sobre a produção de açúcar de coco no Brasil. Os produtores de açúcar de coco asiáticos não são certificados devido à falta de padronização na sua obtenção. Os modelos de produção variam de acordo com a região e são considerados artesanais, realizados por pequenos agricultores, baseados na própria experiência de produção e no conhecimento herdado de ancestrais<sup>4,5</sup>.

De maneira geral, o processamento do açúcar de coco é realizado pela extração da seiva feita por meio de cortes na inflorescência do coqueiro. O líquido é coletado e armazenado em recipientes amarrados à inflorescência e retirados a cada 5 horas para evitar sua fermentação. A seiva fresca é fervida para a evaporação da água e, em seguida, o conteúdo é esfriado, transformando-se primeiro em um xarope e depois em granulados, que são peneirados para a obtenção de partículas uniformes<sup>1,6</sup>.

A *Philippine Coconut Authority*, agência governamental responsável pelo desenvolvimento da indústria dos produtos de coco, juntamente com o *Food and Drug Administration* (FDA) e outros órgãos institucionais filipinos, desenvolveram o Código de Práticas Higiênicas para Açúcar de Coco<sup>7</sup>, que aborda os princípios para a obtenção do açúcar de coco envolvendo as boas práticas para a minimização dos riscos físicos e microbiológicos associados às etapas de obtenção deste açúcar.

No Brasil, não há regulamento técnico específico para o açúcar de coco que estabeleça a sua identidade e características mínimas de qualidade. A análise microscópica permite verificar a identidade vegetal dos alimentos e sua qualidade sanitária referente à presença de matérias estranhas. Para isso utiliza-se como referências legais, entre outros regulamentos específicos, a RDC ANVISA nº 259/2002<sup>8</sup>, que aprova o regulamento técnico sobre rotulagem de alimentos embalados, para os ensaios de pesquisa e identificação de elementos histológicos vegetais, sendo empregada a lista de ingredientes dos produtos como valor de referência; e a RDC ANVISA nº 14/2014<sup>9</sup>, que dispõe sobre as matérias estranhas em alimentos e seus limites de tolerância, para o ensaio de pesquisa de matérias estranhas.

O objetivo deste trabalho foi analisar microscopicamente a identidade vegetal e a presença de matérias estranhas em amostras de açúcar de coco, assim como verificar a sua conformidade em relação às legislações sanitárias existentes no Brasil.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 13 amostras de açúcar de coco colhidas no comércio varejista da cidade de São Paulo, enviadas para análise microscópica no Núcleo de Morfologia e Microscopia do Centro de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Central de São Paulo, em atendimento ao Programa Paulista de Análise Fiscal de Alimentos do segundo semestre de 2019. Em apenas uma amostra continha no rótulo a indicação da origem de produção: Indonésia. Essa informação não foi declarada nos rótulos das demais amostras.

Para o ensaio qualitativo de pesquisa de elementos histológicos vegetais foi utilizado o método de isolamento de elementos histológicos para açúcar de cana<sup>10</sup> e para a pesquisa de matérias estranhas foi realizada uma dissolução de 100 g do produto em água filtrada, seguida de uma tamisação úmida em tamis nº 230 e filtração a vácuo em papel qualitativo. O material foi examinado em microscópio estereoscópico e as sujidades foram quantificadas, identificadas e confirmadas em microscópio óptico composto quando necessário.

A análise dos dados foi realizada no programa Microsoft Excel 2010 para expressar a frequência

absoluta e relativa da presença de matérias estranhas nas amostras e para o cálculo de média e variação do quantitativo de matérias estranhas isoladas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Identidade do açúcar de coco

Os resultados da análise microscópica de pesquisa e identificação de elementos histológicos revelaram a presença de amidos e de elementos histológicos vegetais em todas as amostras. Foram encontrados amidos morfológicamente semelhantes ao padrão de *Triticum* sp. (trigo), *Manihot* sp. (mandioca) e *Oryza sativa* (arroz), e amidos alterados termicamente, que por apresentarem alteração em sua forma e tamanho não possibilitaram sua identificação. A presença de elementos histológicos compatíveis com padrão de *Saccharum officinarum* (cana-de-açúcar) foi detectada em 77% das amostras e, em 61%, foram observados elementos histológicos compatíveis com padrão de *Cocos nucifera* (coco), além de elementos histológicos de vegetais não identificados. Por esse ensaio também foi possível verificar a presença de partículas carbonizadas, leveduras, esporos e hifas de fungos e cristais de oxalato em todas as amostras, além de grãos de pólen e partículas de óleo em sua maioria. Por se tratar de uma análise qualitativa, a análise microscópica de identificação de elementos histológicos não permite a quantificação dos elementos detectados nas amostras.

Não foram encontradas referências na literatura científica ou em instituições oficiais sobre a composição vegetal do açúcar de coco para orientarem o ensaio de pesquisa e identificação de elementos histológicos vegetais. A avaliação da identidade microscópica do açúcar de coco torna-se ainda mais complexa por se tratar de um produto natural, artesanal e produzido em diferentes regiões da Ásia, sem uma padronização<sup>11</sup>.

Não é possível identificar a origem botânica do açúcar de coco por meio da análise microscópica por se tratar de produto cuja matéria prima é a seiva do floema da inflorescência da palmeira, que não possui caracterização microscópica por não conter qualquer tipo de elemento histológico vegetal. Entretanto há relatos da adição de diversas substâncias à seiva por questões tecnológicas, como a inclusão de conservantes como calcário em pó ou solução, lascas

de madeira de jaqueira, casca de mangostim, fibras da casca do coco ou uma combinação destes para evitar a fermentação da seiva fresca<sup>3,12</sup> e adição de óleo de coco ou coco ralado para evitar espumas durante a fervura<sup>4</sup>.

Considerando que existe a possibilidade de adição de outros ingredientes no processamento do açúcar de coco por motivações técnicas, a presença de amido e de elementos histológicos de vegetais nas amostras analisadas pode estar relacionada a esse fato. Todavia, a detecção de amidos íntegros indica que houve adição de ingredientes após o processamento térmico, caso contrário esses amidos estariam alterados pelo calor. A presença de elementos histológicos compatíveis com os de cana-de-açúcar na maioria das amostras adverte para a possibilidade de adulteração do produto, sugerindo uma possível fraude. Segundo Ananda Ventures<sup>5</sup>, a maior ameaça ao mercado de açúcar de coco é justamente sua adulteração com adição de açúcar de cana, que provoca alteração no sabor, porém não mostra diferença visual para o consumidor.

Wrage et al<sup>2</sup> também observaram, pela análise de isótopos <sup>12</sup>C/<sup>13</sup>C, a adição de açúcar de fonte botânica C4, característica de vegetais como o açúcar de cana, diferente da fonte botânica do coqueiro (C3), em 17% das 107 amostras de açúcar de coco avaliadas. Esse mesmo estudo relatou a presença de amidos em 8% das amostras, entre eles amidos característicos de trigo, e detectou a presença de glúten por ensaio imunoenzimático nas amostras que continham amido, além de óleo. O glúten é uma substância proteica, natural de cereais como trigo, centeio, cevada, aveia e seus derivados. Os autores levantam a possibilidade de adição de substâncias ao açúcar de coco tanto por motivações tecnológicas quanto com o intuito de aumento do rendimento.

A presença de elementos histológicos característicos de cana-de-açúcar alerta para uma problemática que pode ter implicações na saúde dos consumidores que optarem por consumir o açúcar de coco como alternativa ao açúcar tradicional, pela expectativa de ingerir um produto com menor índice glicêmico, como é indicado nos rótulos de todos os produtos. Embora o índice glicêmico não tenha sido objeto desse estudo, a presença de cana-de-açúcar nas amostras pode comprometer esses índices, assim como a detecção de amidos de

cereais, como o trigo, pode impactar na presença de glúten e acometer indivíduos celíacos.

A constatação da presença de leveduras nas amostras analisadas indica que esses produtos passaram por um processo de fermentação. Os componentes nutritivos da seiva da inflorescência do coqueiro a tornam altamente suscetível à fermentação natural espontânea ainda durante a colheita, principalmente sob a luz do sol, resultando em alterações físicas e microbiológicas do produto. As condições de coleta e armazenamento da seiva podem favorecer essas contaminações e promover variações no perfil de qualidade dos produtos<sup>1,13</sup>.

A legislação sanitária de rotulagem de alimentos, RDC ANVISA nº 259/2002<sup>8</sup>, prevê a obrigatoriedade da declaração de lista de ingredientes no rótulo dos alimentos embalados quando o produto é composto por mais de um ingrediente. As listas de ingredientes das amostras analisadas continham apenas açúcar de coco, açúcar da flor do coqueiro ou néctar de

coco, contrastando com a pesquisa de elementos histológicos, que constatou a presença de diversos elementos histológicos vegetais não declarados na relação de ingredientes como deveriam estar para a correta aplicação da legislação brasileira, independente de serem utilizados como aditivos ou coadjuvantes.

Dessa forma, é recomendado que os produtores, importadores ou distribuidores de açúcar de coco no Brasil conheçam os processos de fabricação desse produto e os ingredientes adicionados ao seu processamento e os incluam na lista de ingredientes contida no rótulo a fim de garantir maior transparência em relação ao seu padrão de identidade e adequação à legislação brasileira.

### Matérias Estranhas

Todas as amostras analisadas continham matérias estranhas em diversidade e quantidade variáveis, com destaque para a presença de fragmentos de insetos (FI), encontrados em 100% das amostras (**Tabela**).

**Tabela.** Frequência absoluta e relativa da presença de matérias estranhas e valor médio das matérias estranhas detectadas em amostras (n=13) de 100g de açúcar de coco analisadas no Instituto Adolfo Lutz em 2019

| Matérias estranhas       | Presença |     | Média | Variação |     |
|--------------------------|----------|-----|-------|----------|-----|
|                          | N        | %   |       | Mín      | Máx |
| Fragmentos de insetos    | 13       | 100 | 100   | 10       | 305 |
| Ácaros                   | 9        | 69  | 1     | 0        | 3   |
| Larvas de insetos        | 6        | 46  | 1     | 0        | 3   |
| Fragmento de pelo animal | 5        | 38  | 1     | 0        | 3   |
| Bárbula                  | 5        | 38  | 0     | 0        | 2   |
| Pelo animal inteiro      | 4        | 31  | 1     | 0        | 3   |
| Inseto inteiro           | 1        | 8   | 0     | 0        | 1   |

Além da alta frequência, os fragmentos de insetos estiveram presentes em quantidades elevadas na maioria das amostras, apresentando contagem máxima de 305 FI em uma das amostras. Entre as demais matérias estranhas encontradas, os ácaros foram as mais frequentes, porém com quantitativo de no máximo três ácaros em uma amostra. Em 62% das amostras foi observada a presença de ao menos três tipos de matérias estranhas simultaneamente, e uma das amostras apresentou um inseto inteiro da Ordem Psocoptera. Não foi possível identificar a origem animal dos pelos inteiros detectados por se tratarem de subpelos que, segundo Teerink<sup>14</sup>, são pelos

mais finos e ondulados, predominantes na pelagem do animal, porém de valor taxonômico limitado. Os fragmentos de pelos animais tampouco apresentavam regiões características para identificação.

A detecção de elevada quantidade de fragmentos de insetos nas amostras analisadas sugere que essa contaminação ocorreu em momento prévio ao processamento, caso contrário os insetos estariam íntegros. Apesar do reduzido número de amostras analisadas, a alta frequência de matérias estranhas observada indica que não houve a adoção de boas práticas na produção dessas amostras para atender a legislação sanitária brasileira.

Hebbar et al<sup>3</sup> relatam que a seiva coletada pelo método tradicional na Índia é contaminada por insetos, formigas, pólen e sujidades pela exposição durante a coleta. De acordo com a descrição das técnicas de obtenção do açúcar de coco<sup>1,3</sup> é possível conjecturar que o longo período de exposição da seiva ao ambiente durante a coleta possa colaborar para a ocorrência de matérias estranhas no produto, caso procedimentos que eliminem ou minimizem esta contaminação não forem adotados.

A literatura indica que há uma preocupação com a padronização deste produto em alguns países produtores de açúcar de coco a fim de melhorar sua qualidade. Na Índia, o *Central Plantation Crops Research Institute* desenvolveu um coletor de seiva refrigerado e fechado para impedir a contaminação da matéria prima<sup>3</sup>. O Código de Práticas Higiênicas para Açúcar de Coco<sup>7</sup>, desenvolvido pela *Philippine Coconut Authority* e FDA, aborda os princípios para a obtenção do açúcar de coco e afirma que o produto deve estar livre de matérias estranhas.

Somawiharja et al<sup>12</sup> investigaram o modelo de processamento do açúcar de coco de uma região da Indonésia e relataram que a seiva é passada por um filtro de malha fina para que as sujidades como insetos, formigas, pólen e resquícios das flores, sejam removidas, minimizando a ocorrência de matérias estranhas no produto final. Esses autores concluíram que, para melhorar a qualidade deste produto, estudos mais aprofundados para investigar técnicas melhores e mais seguras de extração, coleta e processamento da seiva de coco fresca são urgentemente necessários. Recentemente, ainda na Indonésia, foi realizado um programa de desenvolvimento de aldeias parceiras sobre a produção de açúcar de palma e coco por meio de orientações e treinamentos baseados em inovação, aplicação de boas práticas e saneamento durante a colheita, o processamento e o armazenamento<sup>15</sup>.

Considerando que a produção do açúcar de coco é uma atividade extrativista e artesanal, todas as etapas da cadeia de produção devem ser consideradas como prováveis pontos de infestação por artrópodes, mamíferos e aves, tanto durante a extração da seiva, como no processamento, transporte e armazenamento. Apesar das iniciativas de melhorias na qualidade de produção do açúcar de coco observadas na literatura,

os resultados encontrados indicam para a efetiva necessidade de melhorias nas Boas Práticas e adoção de medidas de controle de forma a ofertar um produto de qualidade e atender as exigências sanitárias de países importadores como o Brasil.

## CONCLUSÃO

As amostras de açúcar de coco analisadas foram consideradas insatisfatórias perante as legislações sanitárias brasileiras tanto em relação ao parâmetro microscópico de identidade quanto ao de qualidade sanitária, o que sugere a necessidade de revisão das técnicas de produção e melhoria das condições higiênicossanitárias para sua adequação junto às normas vigentes no país.

São necessários estudos futuros com maior amostragem e inclusão de outros parâmetros analíticos para uma melhor avaliação deste produto.

## REFERÊNCIAS

1. Saputro AD, Van de Walle D, Dewettinck K. Palm Sap Sugar: A Review. *Sugar Tech*. 2019;21(6):862-7. <https://doi.org/10.1007/s12355-019-00743-8>
2. Wrage J, Burmester S, Kuballa J, Rohn S. Coconut sugar (*Cocos nucifera* L.): Production process; chemical characterization, and sensory properties. *LWT Food Sci Technol*. 2019;112:108227. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.125>
3. Hebbar KB, Arivalagan M, Manikantan MR, Mathew AC, Thamban C, Thomas GV et al. Coconut inflorescence sap and its value addition as sugar-collection techniques, yield, properties and market perspective. *Curr Sci*. 2015;109(8):1411-7. <https://doi.org/10.18520/v109/i8/1411-1417>
4. Sumarni W, Sudarmin, Wiyanto, Supartono. The reconstruction of society indigenous science into scientific knowledge in the production process of palm sugar. *J Turkish Sci Educ*. 2016;13(4):281-92. Disponível em: <https://www.tused.org/index.php/tused/article/view/168>
5. Ananda Ventures - Social Venture Fund. Sweetening the pot developing the market for palm & coconut sugar in southeast Asia. *Grow Asia* [Internet].

- Junho de 2017; 98p. Disponível em [http://exchange.growasia.org/system/files/Sweetening%20the%20Pot-PalmCocoSugarSoutheastAsia\\_Final.pdf](http://exchange.growasia.org/system/files/Sweetening%20the%20Pot-PalmCocoSugarSoutheastAsia_Final.pdf)
6. Philippine Coconut Authority (Quezon City - Philippines). Coconut Sap Sugar. Technology Series No. 1. Philippines: Philippine Coconut Authority; 2012. Disponível em: <http://www.pca.da.gov.ph/coconutrde/images/sugarpdfs/CocoSugarFlyer.pdf>
  7. Bureau of Agriculture and Fisheries Standards - Philippine National Standard (Quezon City: Philippines). Code of Hygienic Practice for Coconut Sap Sugar. Philippines: Bureau of Agriculture and Fisheries Standards; 2015. Disponível em: [https://members.wto.org/crnattachments/2015/SPS/PHL/15\\_2906\\_00\\_e.pdf](https://members.wto.org/crnattachments/2015/SPS/PHL/15_2906_00_e.pdf)
  8. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 259, de 20 de setembro de 2002. Aprovar o Regulamento Técnico sobre Rotulagem de Alimentos Embalados. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 23 set 2002. Seção 1(184):33-4. Disponível em: [https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2002/rdc0259\\_20\\_09\\_2002.html](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2002/rdc0259_20_09_2002.html)
  9. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 14, de 28 de março de 2014. Dispõe sobre matérias estranhas macroscópicas e microscópicas em alimentos e bebidas, seus limites de tolerância e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 31 mar 2014. Seção 1(61):58-61. Disponível em: [https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0014\\_28\\_03\\_2014.pdf](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0014_28_03_2014.pdf)
  10. Rodrigues MMS, Atuí MB, Correia M. Métodos de análise microscópica de alimentos: isolamento de elementos histológicos. São Paulo: Letras & Letras; 1999.
  11. CBI (Netherlands). Palm Sugar in Germany. Ministry of Foreign Affairs. Netherlands: CBI; 2016. Disponível em: [https://www.importpromotiondesk.de/fileadmin/user\\_upload/Publikationen/factsheet/zutaten/palm-sugar-in-germany.pdf](https://www.importpromotiondesk.de/fileadmin/user_upload/Publikationen/factsheet/zutaten/palm-sugar-in-germany.pdf)
  12. Somawiharja Y, Wonohadidjojo DM, Kartikawati M, Suniati FRT, Purnomo H. Indigenous technology of tapping, collecting and processing of coconut (*Cocos nucifera*) sap and its quality in Blitar Regency, East Java, Indonesia. *Food Res*. 2018; 2(4):398-403. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.2\(4\).075](https://doi.org/10.26656/fr.2017.2(4).075)
  13. Xia Q, Li R, Zhao S, Chen W, Chen H, Xin B et al. Chemical composition changes of post-harvest coconut inflorescence sap during natural fermentation. *Afr J Biotechnol*. 2011;10(66):14999-15005. <https://doi.org/10.5897/AJB10.2602>
  14. Teerink BJ. Hair of West-European Mammals. Cambridge (UK): Cambridge University Press;1991.
  15. Kurniawati E, Karimah RN, Suryana AL, Destarianto P. Implementation of good manufacturing practice (GMP) on coconut palm sugar processing at craftsmen business group in Wonosobo-Banyuwangi Village as Helicos Center. The Second International Conference on Food and Agriculture, 2019. Bali (ID): Proceedings of The Second International on Food and Agriculture; 2019.p.127-34.



# Hygienic-Sanitary Conditions of Hospital Nutrition Services in Southern Brazil

## Condições higienicossanitárias dos serviços de nutrição e dietética em hospitais do Sul do Brasil

RIALA6/1796

Larissa Slongo FACCIOLI<sup>1</sup>, Ana Lúcia SERAFIM<sup>2</sup>, Virgílio José STRASBURG<sup>3</sup>, Janaína Guimarães VENZKE<sup>4\*</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>4</sup>Departamento de Nutrição, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2.400, Sala 405, Santa Cecília, Porto Alegre, RS, Brasil, CEP: 90035-002. Tel: 55 51 3308 5585. E-mail: [janaina.venzke@ufrgs.br](mailto:janaina.venzke@ufrgs.br)

<sup>1</sup>Programa de Pós Graduação em Ciências da Nutrição, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Rio Grande do Sul

<sup>2</sup>Programa Ciências e Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul

<sup>3</sup>Departamento de Nutrição, Centro de Estudos em Alimentação e Nutrição, HCPA/UFRGS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Recebido: 08.05.2020 - Aceito para publicação: 11.12.2020

### ABSTRACT

This study evaluated the good handling practices in the ten Hospital Nutrition Services of the respective hospitals in the South of Brazil, classified as general hospitals. For data collection, there was used a Checklist for Good Handling Practices for Food Services based on current legislation. Among the results, the average of adequacy of the hospitals stand out, showing that the items related to responsibilities and edifications had the lowest adequacies, 67% and 73%, respectively, followed by the food handler block, with 76% of adequacies. The block referring to food handlers showed that few of them sanitize the hands during the change of activity. The classification of hospitals in relation to Good Handling Practices was satisfactory, however, greater failure was observed related to the practices of the food handlers, which are crucial for the safety of food produced in Hospital Nutrition Services.

**Keywords.** food hygiene, food handling, quality control, food service hospital.

### RESUMO

Este estudo avaliou as boas práticas de manipulação em 10 serviços de nutrição e dietética de hospitais do Sul do Brasil, classificados como hospital geral. Para a coleta de dados, utilizou-se uma Lista de Verificação em Boas Práticas para Serviços de Alimentação baseada na legislação vigente. Dentre os resultados destacam-se a média de adequação dos hospitais, mostrando que os itens relacionados a responsabilidades e edificações apresentaram as menores adequações, 67% e 73%, respectivamente, seguidos com o bloco de manipuladores, com 76% de adequações. O bloco referente aos manipuladores de alimentos mostrou que poucos deles higienizam as mãos durante a troca de atividade. A classificação dos hospitais em relação à Boas Práticas de Manipulação foi satisfatória, no entanto, observou-se que falta o cumprimento de alguns itens, relacionados com as práticas dos manipuladores, que são cruciais para a segurança dos alimentos produzidos nos serviços de alimentação.

**Palavras-chave.** higiene dos alimentos, manipulação de alimentos, controle de qualidade, serviço hospitalar de nutrição.

## INTRODUCTION

The Hospital Nutrition Services (HNS) is responsible for developing activities related to food and nutrition of the hospitalized patients as well as of the companions and the collaborators of the hospital. Since the foods offered are complementary to the medical treatment, they should contribute to the recovery of the individual's health through nutritionally balanced and safe meals from the point of view of hygiene and sanitary quality<sup>1</sup>.

In cases of poor hygienic-sanitary conditions, the safety of the food is lost and consequently, the meal can become a source of ill<sup>1</sup>. Food borne Diseases are caused by various types of pathogenic microorganisms that are able to contaminate food in different stages of preparation, as contamination places of production, processing or supply<sup>2</sup>. According to the World Health Organization, 1 in 10 people in the world become sick after eating contaminated food, reaching around 600 million people and causing 420 000 to die every year<sup>3</sup>. In Brazil, the epidemiological bulletin published by the Ministry of Health informs that between the year 2016 and 2019, 2,504 outbreaks of waterborne and food borne diseases (DTHA) were reported. Of these, 5.8% occurred in Hospitals and Health Units (5.8%)<sup>4</sup>.

In order to achieve all the necessary hygienic-sanitary care and guarantee a safe food for the commensal, a control related to the implementation of quality tools is essential, highlighting the Good Handling Practices. This program includes all stages of food preparation, from the choice of supplier to the distribution of the meal to the commensal. Once implemented, the Good Handling Practices provide a parameter of quality in the service through correct procedures of hygiene and manipulation of the food<sup>1</sup>.

On September 15, 2004, the Brazilian Ministry of Health ANVISA resolution n° 216 was released so that the responsible professionals could guide and evaluate the Food Services regarding to the Good Handling Practices in Brazil. There should be emphasized that, within the scope of application of this legislation, the Health Care Services are excluded<sup>5</sup>.

Until the mid-2014, there was no current legislation in Brazil specifically aimed at implementing Good Handling Practices in Hospital Nutrition Service<sup>1</sup>. On September 29, 2014, RDC n° 52 added in RDC n° 216

other areas of application of this resolution, including the units of nutrition and health services<sup>6</sup>.

In the form of a checklist, in Rio Grande do Sul, a current legislation (Ordinance n° 78), approves a Good Handling Practices Checklist for Food Services, and, it also approves Good Handling Practice Courses<sup>7</sup>. Through Ordinance n° 78, it is possible to identify the nonconformities of the service so that later a plan of action is performed. In 2014, Ordinance n° 1224 amended Ordinance n° 78, including, within the scope of application, the units of food and nutrition of the health services to suit the amendment made in the federal level<sup>7,8</sup>.

Based on that, the HNS should provide to the patients' foods in appropriate conditions of hygienic-sanitary to consumption and comply with the nutritional needs of patients and satisfying them. So, linking safe food with sensory and nutritional characteristics is a challenge for professionals working in HNS. The objective of this study is to evaluate the application of the legislation in good handling practice in the Hospital Nutrition Services of the hospitals of Porto Alegre, RS.

## MATERIAL AND METHODS

Descriptive cross-sectional study where sixteen hospitals in the city of Porto Alegre were invited to participate. The selection of hospitals was performed through the National Classification of Health Facilities (NCHF), which was stratified to compose the sample only the general hospitals. Were used as inclusion criteria the hospitals had produce and distribute meals for patients and have at least one responsible nutritionist.

The research was submitted and approved by the Research Ethics Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) under the registration number 66453917.7.0000.5347. The invitation to participate in this study, as well as the explanation of the project was carried out by the researchers via email and by phone directly with the local nutritionist. After the first contact, the researchers visited to the interested HNS to present the project and clarify possible doubts. Then the project was submitted to as well as was sent to the Research Ethic Committee of each the partner institution. After approval by both ethics' committees, was collected the institutional acceptance of participation in the research and the Free Prior and Informed Consent Term was signed.

For data collection a good handling practice checklist for feeding services was applied by a single trained researcher, based on the federal health legislation. The application of the checklist occurred in the second half of 2017, in a single visit lasting five hours in each HNS, during a day shift. The checklist that was used has 152 items, divided into 12 blocks: 1) Buildings, facilities, equipment, furniture and utensils (34); 2) Hygiene facilities, equipment, furniture and utensils (17); 3) Integrated pest control (07); 4) Water supply (09); 5) Waste management (03); 6) Food handlers (15); 7) Raw materials, ingredients, and packaging (12); 8) Food preparation (26); 9) Storage and transportation of prepared food (06); 10) Exposure to consumption of food prepared (09); 11) Documentation and registration (07); and 12) Responsibility (07)<sup>7</sup>.

After the application of the checklist, the overall adequacy of Hospital Nutrition Service and they were classified as good, when they presented from 76 to 100% of attendance of the items; regular, with 51 to 75% of attendance of the items, and poor, with less than 51% of suitability<sup>5</sup>.

The results of the evaluations were presented in relative frequencies and the responses of the questionnaires described qualitatively.

## RESULTS AND DISCUSSION

The study sample consisted of 10 hospitals being 5 private and 5 public. Still of these, in relation to the size 5 were considered small, 3 medium and 2 large. The rest of the sample did not accept to participate. The hospitals named H1, H3, and H4 were classified as regular (51 to 75%) and the others were classified as good (76 to 100%). It is observed that none of the HNS obtained a poor classification in relation to the adequacy of the Good Handling Practices.

The data was also analyzed in blocks and the results are described in **Table**. Regarding the “Responsibility” block, one of the hospitals obtained a percentage equal to zero in the block referring to responsibilities and training, because despite having a technician in charge, no evidence was found of training and updates in good handling practice. Also in relation to updates of responsible in good handling practice in the hospital, only 50% of hospitals were adequate. It should be noted that all hospitals had a nutritionist. The item Responsibility of the current hygiene and sanitary legislation refers to the person responsible for food handling practice who that must be submitted to a specific Good Handling Practices Course.

**Table.** Percentage of overall adequacy and for items of Hospital Nutrition Services, in Southern Brazil, according Ordinance nº 78/2009

| Evaluated items                                           | Number of Items | H1* (%AD)** | H2* (%AD) | H3* (%AD) | H4* (%AD) | H5* (%AD) | H6* (%AD) | H7* (%AD) | H8* (%AD) | H9* (%AD) | H10* (%AD) |
|-----------------------------------------------------------|-----------------|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| Buildings, facilities, equipment, furniture, and utensils | 34              | 38          | 71        | 67        | 65        | 79        | 88        | 76        | 91        | 94        | 65         |
| Hygiene facilities, equipment, furniture, and utensils    | 17              | 88          | 100       | 82        | 88        | 93        | 100       | 93        | 100       | 100       | 94         |
| Integrated pest control                                   | 07              | 100         | 100       | 100       | 100       | 100       | 100       | 86        | 86        | 100       | 71         |
| Water supply                                              | 09              | 100         | 100       | 100       | 100       | 50        | 100       | 100       | 100       | 50        | 100        |
| Waste management                                          | 03              | 67          | 100       | 100       | 33        | 100       | 100       | 100       | 100       | 100       | 100        |
| Food handlers                                             | 15              | 36          | 80        | 43        | 80        | 93        | 93        | 93        | 87        | 73        | 80         |
| Raw materials, ingredients, and packaging                 | 12              | 58          | 92        | 83        | 75        | 100       | 100       | 83        | 92        | 67        | 83         |
| Food preparation                                          | 26              | 85          | 100       | 78        | 75        | 100       | 88        | 91        | 95        | 86        | 84         |
| Storage and transportation of food prepared               | 06              | 67          | 83        | 67        | 67        | 100       | 100       | 67        | 100       | 83        | 67         |
| Exposure to consumption of food prepared                  | 09              | 57          | 100       | 25        | 75        | 100       | 88        | 88        | 100       | 88        | 88         |
| Documents and recording                                   | 07              | 57          | 100       | 86        | 100       | 100       | 100       | 29        | 100       | 71        | 86         |
| Responsibility                                            | 07              | 0           | 67        | 25        | 67        | 100       | 100       | 71        | 71        | 71        | 100        |
| Overall adequacy                                          | 152             | 60          | 88        | 71        | 76        | 92        | 94        | 81        | 93        | 85        | 81         |

\*H= Hospital; \*\* %AD = Percentage of overall adequacy

As important as training is how often happen. As far as those responsible for food handling are concerned, there was observed that 67% of the sample had adequate training. The responsible for food handling must be guide the food handlers regarding to good handling practices, through training and updates. Training food handlers in the workplace is a way to bring theory closer to practice and ensure that they understand and assimilate the learning to reproduce in their work<sup>9</sup>.

Many factors are involved in the adequacy of Good Handling Practices. Even though the hospitals were classified as regular and good, some points related to the handling of the food itself reached low percentages, which may be related to the lack of responsible for good handling practice and nonconformities in buildings. These findings corroborate with study of Lääkkö-Roto et al<sup>10</sup>, numerous barriers can contribute to the lack of compliance in places where food is manipulated, among them are the lack of commitment and time of supervisors regarding the requirement of care in production; insufficient education of food handlers, and lack of adequate investment. Adding to that, the study of Stangarlin-Fiori et al<sup>1</sup> proposed that the lack of building and physical installations can be decisive in the failure to implement Good Handling Practices.

The buildings, facilities, equipment, furniture and utensils block was the second with the highest percentage of nonconformities. In addition, only 10% of the evaluated hospitals had a door in the preparation and storage area with automatic closing and barriers for the protection of vectors and pest. These have been seen as physical planning items that directly reflect the hygienic-sanitary conditions of the food service and need to be thought and structured to prevent cross-contamination<sup>2</sup>. Besides, with proper layout planning, it is possible to protect food, maintain hygienic-sanitary conditions, and improve aspects of cleaning and pest control in place.

According to the current legislation<sup>6</sup>, grease boxes must be located outside the area of food production and storage. In this study only 40% of the facilities were in compliance. In addition, only 20% of the HNS that have been visited presented drain with closing system. These items, if are not adequate, allow the entry of vectors and pests into food production.

All the evaluated hospitals presented illumination in order to provide adequate visualization of the activities, without compromising the hygiene and the sensorial characteristics of the food.

It is important to reinforce that the temperature control is considered one of the items with the greatest health risk and for the effectiveness of this control in any food service the thermometer must be calibrated in order to guarantee reliable temperatures to food safety<sup>11</sup>. Regarding thermometers all HNS had. However, calibration was reported by only 33% of the sample and of these, only 66% of them presented the calibration registration.

In the item referring to hand washing of food handlers during the exchange of activity or interruption of work, there was observed that 20% of the food handlers did it. According to Lima et al<sup>12</sup>, who evaluated the practice of hand sanitization through microbiological analysis of Food Services employees, a high number of microorganisms, bacteria and yeasts was observed, possibly due to the inefficiency of hand washing. Based on these studies, there was observed that hand washing remains a problem in Food Services, including HNS, which represent a place where hygienic-sanitary care needs to be even more rigorous to ensure safety.

The hands when not sanitized can spread pathogenic microorganisms in the environment and in food. Hand washing is an indispensable item to contributing to guarantee food safety<sup>12</sup>.

In this study, 67% of the hospitals had exclusive hand washing sink with all the necessary items for correct hygiene. In the absence of these items, the risk of microbiological contamination of food is present. Still, it is not enough to show conformity in the physical structure if the hand washing of the food handlers does not happen in fact. As described by Cunha et al<sup>11</sup>, the personal hygiene of the food handlers is capable of directly interfering with food safety and, therefore, endangers the health of patients, their companions and employees.

It was identified that the health control of the food handlers occurred in accordance with the legislation and the document confirming was available in 50% of the samples analyzed. Sithole et al<sup>13</sup> evaluating hospital workers in relation to a possible food outbreak in the hospital cafeteria in Zimbabwe and there was found that the possible

source of contamination could have been the food itself or could have been contaminated by the food handlers during preparation or storage of food. With this, the need for do the examinations and health control of the food handlers is reinforced.

In the block related to food preparation, there was observed that in all hospitals the heat treatment guaranteed the temperature of at least 70°C in all parts of the food, according to requiring the legislation<sup>5</sup>. Heat treatment is extremely important and necessary to ensure the food safety. However, the registration of hot storage temperature was performed correctly in only 44% of the HNS. Lack of verification and incomplete registrations were some of the nonconformities of this item.

Concerning the transportation of prepared foods, 30% of the hospitals checked the temperature of the food in the process, with registration, verification, date and signature. The absence of food temperature control during the transportation phase can compromise both the hygiene and sanitary quality of food and patient satisfaction<sup>1</sup>.

In hospital practice, there is a considerable time between the period of filling of the meal and the consumption of it by the patient. The lack of temperature control in this period is a determinant factor for microbial multiplication, so it is of the utmost importance that the service has a control measure in order to avoid the long exposure of the food at room temperature.

The lack of binomial time and temperature control during refrigeration, cooking, holding and distribution are responsible for approximately 80% of the occurrences of food borne diseases outbreaks<sup>2</sup>. Thus, the control of the time-temperature binomial is essential to ensure hygienic-sanitary quality in HNS. Maintaining the adequate temperature of the meal served in order to favor and stimulate the eating of the commensal is as important, since temperature is one of the main complaints of hospitalized patients<sup>14</sup>.

In the item related to packaged and identified prepared foods if stored under refrigeration or freezing, 60% of the HNS were compliant. The main nonconformities observed included stored foods without wrappings, unsuitable packaging materials and damaged packaging. As well as a study that evaluated the profile of food services (commercial restaurants, snack bars, grocery stores and others) in around 14.900 facilities between 2005 and 2015

in the city of Curitiba, southern Brazil, who found irregularities (70.1%) such as unidentified products and inadequate packaging<sup>15</sup>.

Most of the hospitals evaluated (80%) used disposable cleaning cloths and they were changed with each use. A study that contaminated cloths commonly used in food services with microorganisms verified that none of the studied strains presented significant growth in the two hours of incubation. However, the guideline is that disposable cloths should be discarded every 2 hours, not exceeding 3 hour<sup>7</sup>.

Integrated pest control is a measure of prevention against transmission of pathogenic microorganisms and possible food borne diseases<sup>2</sup>. Although the chemical control described in the pest and vector control block was being carried out, one of the preventive measures, concerning the block of buildings it was not met because were not identified barriers on doors to prevent the entry of vectors who is an item that, although it is present in the buildings block, is related to pest control. Thus, as important as being in conformity, the interconnection of blocks is necessary for the correct hygiene-sanitary control.

In the block referring to water supply, the use of drinking water was in conformity in all hospitals. However, 20% of them presented nonconformities in the item referring to the hygiene of water reservoirs. Therefore, the water potability may be impaired.

The high adequacy of water supply and integrated pest control in HNS in most hospitals can be justified by the fact that they have frequent visits by different inspection bodies due to the fact that it is an environment that requires greater hygienic care<sup>1</sup>.

The Manual of Good Handling Practices is the document that should include all the procedures that involve the activities of the area of preparation and distribution of food of a certain institution. It is an instrument that, according to Ordinance nº 78/2009, must be accessible to employees<sup>7</sup>. In this study, most hospitals presented the Manual of Good Handling Practices, however, due to the percentage of nonconformities, it is inferred that the Manual is not being effective.

## CONCLUSION

Can be concluded that all hospital nutrition services had good to regular ratings. However, fail that

interfere in the hygiene-sanitary quality of the foods offered, such as the absence of hand washing during the exchange of activity and lack of temperature control during food transportation were observed. Reiterates the importance to conduct further studies in the area of hospital nutrition services in order to improve the diagnosis of the applicability of legislation in hospital environments.

## REFERENCES

1. Stangarlin-Fiori L, Medeiros LB, Serafim AL, Bertin RL, Medeiros CO, Hecktheuer LH. Good hygiene practices in hospital nutrition services: the view of internal and external auditors. *Food Sci Technol*. 2016; 36(3): 461-7. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-457X.00315>
2. Horn AL, Friedrich H. Locating the source of large-scale outbreaks of food borne disease. *J R Soc Interface*. 2019;16(151):20180624. <https://doi.org/10.1098/rsif.2018.0624>
3. World Health Organization - WHO. Food Safety. Geneva, Switzerland: WHO; Apr 2020. [accessed 2020 Dec 10]. Available on line: <https://www.who.int/NEWS-ROOM/FACT-SHEETS/DETAIL/FOOD-SAFETY>
4. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Informe sobre surtos notificados de doenças transmitidas por água e alimentos – Brasil, 2016-2019. *Boletim epidemiológico*. 2020;51(32):27-31. Disponível em: <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2020/August/17/Boletim-epidemiologico-SVS-32.pdf>
5. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional 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 União*. Brasília, DF, 16 set 2004.
6. Ministério de Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 52, de 29 de setembro de 2014. Altera a Resolução RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004, que dispõe sobre o Regulamento Técnico de Boas Práticas para os Serviços de Alimentação. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 01 out 2014. Seção 1(189):51.
7. Secretaria da Saúde (RS). Centro Estadual de Vigilância em Saúde do Rio Grande do Sul. 2009. 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. [acesso 2019 Set 27] Disponível em: <https://www.cevs.rs.gov.br/upload/arquivos/201612/26090340-portarias-rs-nu-78-de-2009.pdf>
8. Secretaria da Saúde (RS). Centro Estadual de Vigilância em Saúde do Rio Grande do Sul. 2014. Portaria nº 1224 de 02 de setembro de 2014. Altera a Portaria nº 78, de 30 de janeiro de 2009, que 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. [acesso 2019 Jul 30]. <https://www.cevs.rs.gov.br/upload/arquivos/202004/17095204-portarias-rs-nu-1-224-de-2014.pdf>
9. McIntyre L, Vallaster L, Wilcott L, Henderson S, Kosatsky T. Evaluation of food safety knowledge, attitudes and self-reported hand washing practices in foodsafe trained and untrained food handlers in British Columbia Canada. *Food Control*. 2013;30(1):150-6. <https://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.06.034>
10. Lääkkö-Roto T, Lunden J, Heikkilä J, Nevas M. Prerequisites for effective official food control. *Food Control*. 2016;61:172-9. <https://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.09.043>
11. Cunha DT, Oliveira ABA, Saccol ALF, Tondo EC, Silva Junior EA, Ginani VC et al. Food safety of food services within the destinations of the 2014 FIFA World Cup in Brazil: development and reliability assessment of the official evaluation instrument. *Food Res Int*. 2014;57:95-103. <https://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.021>
12. Lima MS, Maia SR, Santos AT, Uchoa FNM, Foschetti DA, Cerqueira GS et al. Análise microbiológica da lavagem de mãos em funcionários de uma unidade de alimentação e nutrição de Fortaleza-CE. *Rev Inter*. 2015;8(3):61-9. <http://dx.doi.org/10.22280/revintevol8ed3.218>

13. Sithole Z, Juru T, Chonzi P, Banqure D, Shambira G, Gombe NT et al. Food borne illness amongst health care workers, at a Central Hospital, Harare, Zimbabwe, 2016: a retrospective cohort study. *BMC Res Notes*. 2017;10(1),715. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-3030-x>
14. Fernández-Martínez B, Alguacil-Pau AI, Crespo-Sevilla R, García-Veja A. Predictores de la satisfacción de los pacientes con la alimentación de un hospital público de Madrid. *Rev Calid Asist*. 2013;28(3):155-62. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cali.2012.09.005>
15. Olmedo PV, Stangarlin-Fiori L, Medeiros CO, Tondo EC, Ferreira SMR. A profile of food services in Curitiba and a critical analysis of the results of sanitary inspections at these establishments. *J Food Saf*. 2018;38:e12377. <https://doi.org/10.1111/jfs.12377>



# Cálculo da estimativa da incerteza de medição associada ao ensaio de contagem de bactérias heterotróficas em matriz água purificada através da técnica de detecção por fluorescência

## Measurement uncertainty calculation associated with heterotrophic bacterial count in purified water matrix using the fluorescence detection technique

RIALA6/1784

Ellen Gameiro HILINSKI<sup>1</sup>, Fernando Pontes de Lima e SILVA<sup>1</sup>, Fernanda Fernandes FARIAS<sup>1</sup>, Edilene Afonso VIEIRA<sup>1</sup>, Adriana Aparecida Buzzo ALMODOVAR<sup>1</sup>, Terezinha de Jesus Andreoli PINTO<sup>2</sup>, Adriana BUGNO<sup>1</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes, Instituto Adolfo Lutz, Av Dr. Arnaldo nº 355, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 01246-000. Tel: 11 3068 2963. E-mail: [ellen.hilinski@ial.sp.gov.br](mailto:ellen.hilinski@ial.sp.gov.br)

<sup>2</sup>Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

Recebido: 26.11.2019 - Aceito para publicação: 22.04.2020

### RESUMO

A incerteza de medição representa o nível de confiança no resultado. Para a estimativa da incerteza de medição foi empregado o cálculo do desvio padrão da reprodutibilidade intralaboratorial de 48 ensaios de contagem de bactérias heterotróficas pela técnica da membrana filtrante com detecção por fluorescência pelo uso de substrato fluorogênico em amostras de água purificada contaminadas artificialmente entre 10 e 100 UFC/mL. O valor obtido,  $1,3 \times 10^{-3}$  ( $\log_{10}$ ), indica que a técnica utilizada pode ser uma alternativa para a estimativa da incerteza de medição em ensaios microbiológicos quantitativos de contagem de bactérias heterotróficas em amostras de água purificada.

**Palavras-chave.** incerteza, contagem de colônia microbiana, água purificada, detecção por fluorescência.

### ABSTRACT

Measurement uncertainty represents the confidence level in the result. To estimate the expanded measurement uncertainty, the standard deviation of intra-laboratory reproducibility of 48 heterotrophic bacterial count assays by fluorescence detection by the use of fluorogenic substrate on artificially contaminated purified water samples between 10 and 100 CFU/mL was used. The value obtained,  $1.3 \times 10^{-3}$  ( $\log_{10}$ ), indicates that the technique used can be an alternative to estimate measurement uncertainty in quantitative microbiological heterotrophic bacterial count assays in purified water samples using fluorogenic substrate.

**Keywords.** uncertainty, microbial colony count, purified water, fluorescence detection.

A incerteza de medição é definida como parâmetro associado com o resultado de uma medição que caracteriza a dispersão dos valores que poderia razoavelmente ser atribuída ao mensurando<sup>1</sup>.

Em geral, o resultado das medições são somente aproximações ou estimativas dos valores do mensurando e, portanto são considerados completos quando acompanhados da declaração do valor da incerteza<sup>2</sup>.

De acordo com a ISO/IEC 17025<sup>3</sup>, os laboratórios de ensaios devem identificar e avaliar as contribuições de suas análises para a incerteza de medição do método, sendo, portanto, um requisito obrigatório para os laboratórios acreditados pela Coordenação Geral de Acreditação, segundo os requisitos desta norma quando o laboratório realizar uma declaração de conformidade frente a uma especificação.

O documento de caráter orientativo da Coordenação Geral de Acreditação do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO)<sup>2</sup> informa que para a expressão da incerteza de medição, na grande maioria dos casos, faz-se necessário identificar e estimar as fontes individuais da variabilidade que contribuem para a incerteza do processo de medição. Entretanto, este mesmo documento enfatiza que os ensaios microbiológicos geralmente se enquadram na categoria que dispensa o cálculo rigoroso, metrológico e estatisticamente válido da incerteza de medição. Para este grupo de ensaios, a estimativa da incerteza de medição deve ser, portanto, realizada por meio de uma abordagem global, baseada no cálculo do desvio padrão referente à reprodutibilidade.

Como um procedimento analítico microbiológico contempla distintas etapas, como diluições, inoculação da amostra em meios de cultura adequados, período de incubação para crescimento e contagem para confirmação do número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC), podemos afirmar que a variabilidade operacional resultará do efeito conjunto destas etapas. Desta maneira, a incerteza total do resultado relacionado aos ensaios de contagens microbianas, deve ser estimada após a obtenção do resultado final devido à variação característica inerente aos ensaios de contagens.

Desta forma, para a estimativa da incerteza de medição em ensaios microbiológicos, o processo é

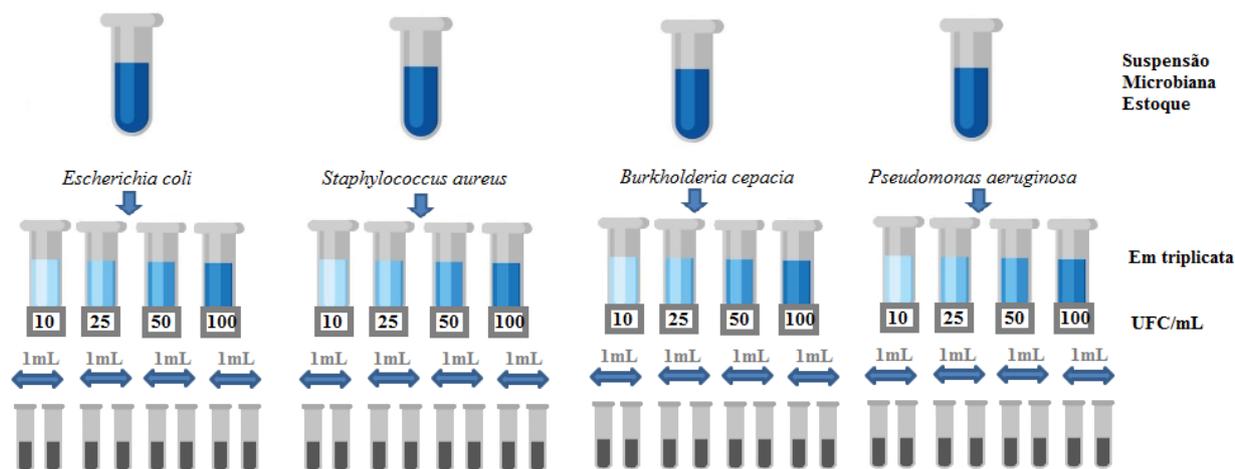
baseado na variabilidade total do processo analítico, o que resulta na utilização de uma abordagem global, que inclui a precisão observável (componente aleatório) e a tendência (bias) (componente sistemático). Para estes casos, a estimativa da incerteza de medição é derivada do desvio padrão experimental da reprodutibilidade do resultado final do processo de medição<sup>2</sup>.

O ensaio de contagem de bactérias heterotróficas em amostras de água purificada por meio da técnica de filtração por membrana utilizando detecção por fluorescência é um método microbiológico rápido que possibilita a redução de aproximadamente 67% do tempo analítico comparado com métodos microbiológicos compendiais.

O objetivo do trabalho foi calcular e expressar incerteza associada a resultados de determinações quantitativas em matriz água purificada e fornecer subsídios que possam auxiliar os laboratórios prestadores de serviços públicos e privados responsáveis pelo controle de qualidade de distintas categorias de águas tratadas, a atender este requisito estabelecido na norma ISO/IEC 17025:2017.

Os ensaios foram realizados pelos analistas A e B, em dias distintos. Foram preparadas, de acordo com as recomendações dos respectivos fabricantes, suspensões microbianas individuais, em triplicata, para quatro microrganismos, descritos a seguir: *Escherichia coli* NCTC 12923 (Biomerieux, Austrália), *Staphylococcus aureus* NCTC 10788 (Biomerieux, Austrália), *Burkholderia cepacia* NCTC 10743 (Biomerieux, Austrália) e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (Microbiologics, Estados Unidos da América)<sup>4,5</sup>. Foram realizadas diluições seriadas para cada suspensão microbiana obtida, utilizando solução de cloreto de sódio 0,9 % (p/v), de forma a obter quatro faixas de concentrações compreendidas entre 10 e 100 UFC/mL para cada um dos microrganismos utilizados no estudo.

A faixa de trabalho das suspensões microbianas empregadas na condução dos ensaios incluiu como valor inferior o limite de quantificação da metodologia (10 UFC/placa) e como valor superior a especificação regulatória estabelecida para a contagem de bactérias heterotróficas em amostras de água purificada<sup>6</sup> e água para hemodíalise<sup>7</sup>. Uma representação simplificada deste procedimento é demonstrada na **Figura** a seguir.



**Figura.** Representação simplificada da etapa experimental

Em sequência, 1 mL de cada inóculo microbiano foi transferido, em duplicata, de forma a contaminar artificialmente 100 mL de água purificada estéril. Com o auxílio do sistema Milliflex® Quantum (Millipore, Alemanha), foi realizada a filtração das amostras de água purificada, em membrana de ésteres mistos de celulose (HAWG) com tamanho de poro de 0,45 µm e diâmetro de 47 mm, contaminadas com os inóculos microbianos, compreendendo a faixa de concentração entre 10 e 100 UFC/mL<sup>8</sup>.

Após a filtração, a membrana foi asepticamente transferida para uma placa pré envasada com ágar R2A (Millipore, Alemanha), e o conjunto placa e membrana, então, incubado em estufa bacteriológica à temperatura de 24,0 ±

4,0°C pelo período de 40 horas. Após o período de incubação, a membrana foi asepticamente transferida para uma base de celulose umedecida com 2 mL do reagente de fluorescência (Millipore, Alemanha), e o conjunto incubado por 30 minutos na temperatura de 32,5 ± 2,5 °C para difusão do reagente. Após os 30 minutos de incubação, foi realizada a contagem das colônias fluorescentes utilizando o leitor Milliflex® Quantum.

A transformação logarítmica da média das contagens das colônias obtidas para cada um dos ensaios realizados pelos analistas A e B, seguido pelo cálculo da variância para cada par de ensaios realizado (analista A e B). Os valores de variância obtidos nos 48 pares de ensaios são apresentados na **Tabela** a seguir.

**Tabela.** Valores de variância obtidos nos 48 pares de ensaios de contagem de bactérias heterotróficas

| Concentração teórica do inóculo/mL | Microrganismo                  |                                 |                              |                                   |
|------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|
|                                    | <i>S. aureus</i><br>NCTC 10788 | <i>B. cepacia</i><br>NCTC 10743 | <i>E. coli</i><br>NCTC 12923 | <i>P. aeruginosa</i><br>ATCC 9027 |
| 10 UFC                             | 0,00039                        | 0,00000                         | 0,00000                      | 0,00203                           |
|                                    | 0,00035                        | 0,00000                         | 0,00193                      | 0,00000                           |
|                                    | 0,00596                        | 0,00000                         | 0,00999                      | 0,00105                           |
| 25 UFC                             | 0,00099                        | 0,00026                         | 0,00029                      | 0,00004                           |
|                                    | 0,00047                        | 0,00007                         | 0,00117                      | 0,00003                           |
|                                    | 0,00086                        | 0,00049                         | 0,00028                      | 0,00054                           |
| 50 UFC                             | 0,00112                        | 0,00002                         | 0,00002                      | 0,00000                           |
|                                    | 0,00036                        | 0,00002                         | 0,00000                      | 0,00001                           |
|                                    | 0,00131                        | 0,00000                         | 0,00000                      | 0,00008                           |

Continua na página 4/5

Continuação

| Concentração teórica do inóculo/mL | Microrganismo                  |                                 |                              |                                   |
|------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|
|                                    | <i>S. aureus</i><br>NCTC 10788 | <i>B. cepacia</i><br>NCTC 10743 | <i>E. coli</i><br>NCTC 12923 | <i>P. aeruginosa</i><br>ATCC 9027 |
| 100 UFC                            | 0,00020                        | 0,00000                         | 0,00022                      | 0,00050                           |
|                                    | 0,00013                        | 0,00000                         | 0,00000                      | 0,00001                           |
|                                    | 0,00000                        | 0,00000                         | 0,00011                      | 0,00002                           |

NOTA: Para o cálculo da variância foi empregado a equação  $\left(\frac{y_a - y_b}{2}\right)^2$ , onde y é o logaritmo ( $\log_{10}$ ) da contagem média de cada analista (A e B)

Em seguida, o desvio padrão foi calculado através da equação 1 contemplando a variância dos 48 pares de ensaios. A incerteza de medição expandida (U)

foi determinada através da equação 2, considerando um fator  $k=2$ , uma vez que este valor corresponde a um nível de confiança de aproximadamente 95%<sup>9</sup>.

$$(Equação 1) \quad S_{repro}(\log_{10}) = \sqrt{\frac{\text{Variância Ensaio}_1 + \text{Variância Ensaio}_2 + \dots + \text{Variância Ensaio}_{48}}{48}}$$

$$(Equação 2) \quad U = S_{repro} \times k$$

A somatória dos valores de variância obtidos foi 0,03128 e o valor do desvio padrão da reprodutibilidade intralaboratorial calculado foi de  $6,5 \times 10^{-4}(\log_{10})$ , resultando em uma incerteza expandida (U) de  $1,3 \times 10^{-3}(\log_{10})$ .

Os controles de fontes de variação, tais como processos operacionais, equipamentos, condições ambientais, contribuem para minimizar os erros associados à medição de valores relacionados aos ensaios microbiológicos. O cálculo da estimativa de incerteza, embora não esteja previsto em legislações destinadas às avaliações de águas, constitui-se como importante ferramenta para a detecção de possíveis erros associados à medição de valores. Para minimizar estes erros, é importante que exista constante capacitação da equipe de analistas nas técnicas utilizadas; manutenção e calibração de equipamentos; controle e registro das condições ambientais.

Portanto, empregar o cálculo do desvio padrão da reprodutibilidade intralaboratorial, como demonstrado, pode ser uma alternativa viável e de fácil execução para ser utilizada pelos laboratórios de ensaios acreditados pela CGCRE como forma de determinar a incerteza de medição em ensaios

microbiológicos quantitativos de contagem de bactérias heterotróficas, auxiliar na detecção de possíveis fontes de erros que possam impactar nos resultados analíticos e consequentemente, atender a norma ISO/IEC 17025:2017.

## FINANCIAMENTO

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Processo nº 17/13374-7

## REFERÊNCIAS

- Grupo de Trabalho 1 do Comitê Conjunto para Guias em Metrologia (JCGM). Avaliação de dados de medição: Guia para incerteza de medição – JCGM 100:2008. Rio de Janeiro: INMETRO; 2008. 126p. Disponível em: [http://www.inmetro.gov.br/noticias/conteudo/iso\\_gum\\_versao\\_site.pdf](http://www.inmetro.gov.br/noticias/conteudo/iso_gum_versao_site.pdf)
- Coordenação Geral de Acreditação (CGCRE) - INMETRO. Exemplos de estimativa de incerteza de medição em ensaios microbiológicos - DOC-CGCRE-053-00. Rio de Janeiro: INMETRO; 2014. 15p. Disponível em: <http://www.inmetro.gov>

- [br/credenciamento/organismos/doc\\_organismos.asp?tOrganismo=CalibEnsaio](http://br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?tOrganismo=CalibEnsaio)
- Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração - ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017. 3.ed. Rio de Janeiro: ABNT; 2017. 32p.
  - Biomérieux. Bioball® MultiShot 550. [acesso 2020 Jan 10]. Disponível em: <http://bioball.com/wp-content/uploads/2019/02/BIOBALL-MultiShot-550-IFU-2018-09-portugese.pdf>
  - Microbiologics. Recommended culture methods for microorganisms. [acesso 2020 Jan 10]. Disponível em: <https://www.microbiologics.com/core/media/media.nl?id=563&c=915960&h=7973622f91a75e047f37&xt=.pdf>
  - Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Farmacopeia Brasileira. 6.ed. v.2. Brasília; 2019. IF032-00. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33832/259143/IFA+e+ESP+Pronto.pdf/1d16f9e9-affc-495b-bb8f-6806c2cef0fe>
  - Ministério da Saúde (BR). 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 e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 14 mar 2014. Seção 1(50):40-2. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0011\\_13\\_03\\_2014.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0011_13_03_2014.pdf)
  - American Public Health Association (APHA). *Standard methods for examination of water and wastewater*. 23th ed. Baltimore: Port City Press; 2017.
  - International Organization for Standardization (ISO). *Microbiology of the food chain — Estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations*. ISO 19036:2019. Geneva: ISO; 2019. 38p.



# Preservação de ovos de helmintos e cistos de protozoários em iodo-mercurato de potássio. Revisitando experimentos realizados há cerca de 40 anos

Preservation of helminth eggs and protozoan cysts in potassium iodine-mercurate. Revisiting experiments carried out about 40 years ago

RIALA6/1788

Sansão da Rocha WESTPHALEN<sup>1</sup>, Thiago Kury Moreno de SOUZA<sup>1</sup>, Pedro Luiz Silva PINTO<sup>2</sup>, José Eduardo TOLEZANO<sup>1</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Núcleo de Parasitoses Sistêmicas, Centro de Parasitologia e Micologia, Instituto Adolfo Lutz. Av Dr. Arnaldo, 351, 8º andar, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 01246-000. Tel: 11 3068 2891. E-mail: [parasitosesistemicas@ial.sp.gov.br](mailto:parasitosesistemicas@ial.sp.gov.br)

<sup>2</sup>Núcleo de Enteroparasitas, Centro de Parasitologia e Micologia, Instituto Adolfo Lutz

Recebido: 10.03.2020 - Aceito para publicação: 26.08.2020

## RESUMO

Foi realizada reavaliação sobre o estado de preservação de ovos de helmintos e cistos de protozoários mantidos por cerca de 40 anos em solução de iodo-mercurato de potássio a 0,2%. Foi observado que ovos de *Schistosoma mansoni*, Ancylostomidae e *Trichuris trichiura* e oocistos de *Isospora belli* mantiveram-se em condições adequadas para a sua identificação ao microscópio ótico comum. No material examinado, foi possível verificar a presença de miracídio em ovo de *Schistosoma mansoni*, forma larvada em ovo de *T. trichiura* e esporozoitos em oocistos de *I. belli*.

**Palavras-chave.** armazenamento de substâncias, produtos e materiais, compostos de mercúrio, helmintos, oocistos.

## ABSTRACT

A reassessment was carried out on the preservation status of helminth eggs and protozoan cysts maintained for about 40 years in 0.2% potassium iodine-mercurate solution. It was observed that *Schistosoma mansoni*, Ancylostomidae and *Trichuris trichiura* eggs and *Isospora belli* oocysts were kept in conditions suitable for their identification under a common light microscope. In the examined material, it was possible to verify the presence of miracidium in *S. mansoni* egg, larvae in *T. trichiura* egg and sporozoites in *I. belli* oocysts.

**Keywords.** storage of substances, products and materials, mercury compounds, helminths, oocysts.

Em 1981, Aguiar et al<sup>1</sup> publicaram os resultados sobre a avaliação do bi-iodeto de mercúrio como preservativo de material biológico de interesse em Parasitologia. Tais resultados foram obtidos a partir de experimentos realizados em 1980, com objetivo de selecionar uma formulação capaz de conservar protozoários e helmintos (ovos e exemplares adultos). A preservação de amostras biológicas para o estudo de parasitos, por meio de preparações contendo compostos de mercúrio, é antiga e foi muito empregada, no passado, por diferentes pesquisadores<sup>2-4</sup>. Baseados em tais trabalhos, Aguiar et al<sup>1</sup> elaboraram solução de iodo-mercurato de potássio nas formulações a 0,2% com formol - descrita abaixo e a 0,1% com benzeno e procederam à análise periódica de sedimentos de amostras de fezes, tratados com ambas as preparações em momentos distintos, para avaliarem o potencial preservativo em comparação às soluções controle de Railliet-Henry<sup>5</sup>, MIF<sup>6</sup> e Schaudinn<sup>2</sup>, num período de seis meses. Decorrido este intervalo de tempo, os autores concluíram que a formulação a 0,2% com formol apresentou o melhor desempenho conservativo das estruturas dos parasitos, incluindo cistos, oocistos e trofozoítos de protozoários e ovos e exemplares adultos de helmintos. A exceção foi verificada para ovos de *Hymenolepis nana* e *H. diminuta*<sup>1</sup>, em que a preparação que respondeu, adequadamente, foi a de 0,1% com benzeno. Entretanto, tal solução não demonstrou eficiência à conservação de cistos, oocistos e trofozoítos de protozoários.

Solução de iodo-mercurato de potássio a 0,2% (Aguiar et al)<sup>1</sup>:

|                                   |         |
|-----------------------------------|---------|
| Bi-iodeto de mercúrio             | 2 g     |
| Iodeto de potássio                | 2 g     |
| Formol a 40%                      | 5 mL    |
| Álcool a 99,5°GL                  | 500 mL  |
| Solução fisiológica a 0,85% q.s.p | 1000 mL |

Nesta revisita ao trabalho original e levando-se em consideração as restrições atuais quanto à utilização de compostos de mercúrio, devido à elevada toxicidade deste elemento químico e de suas

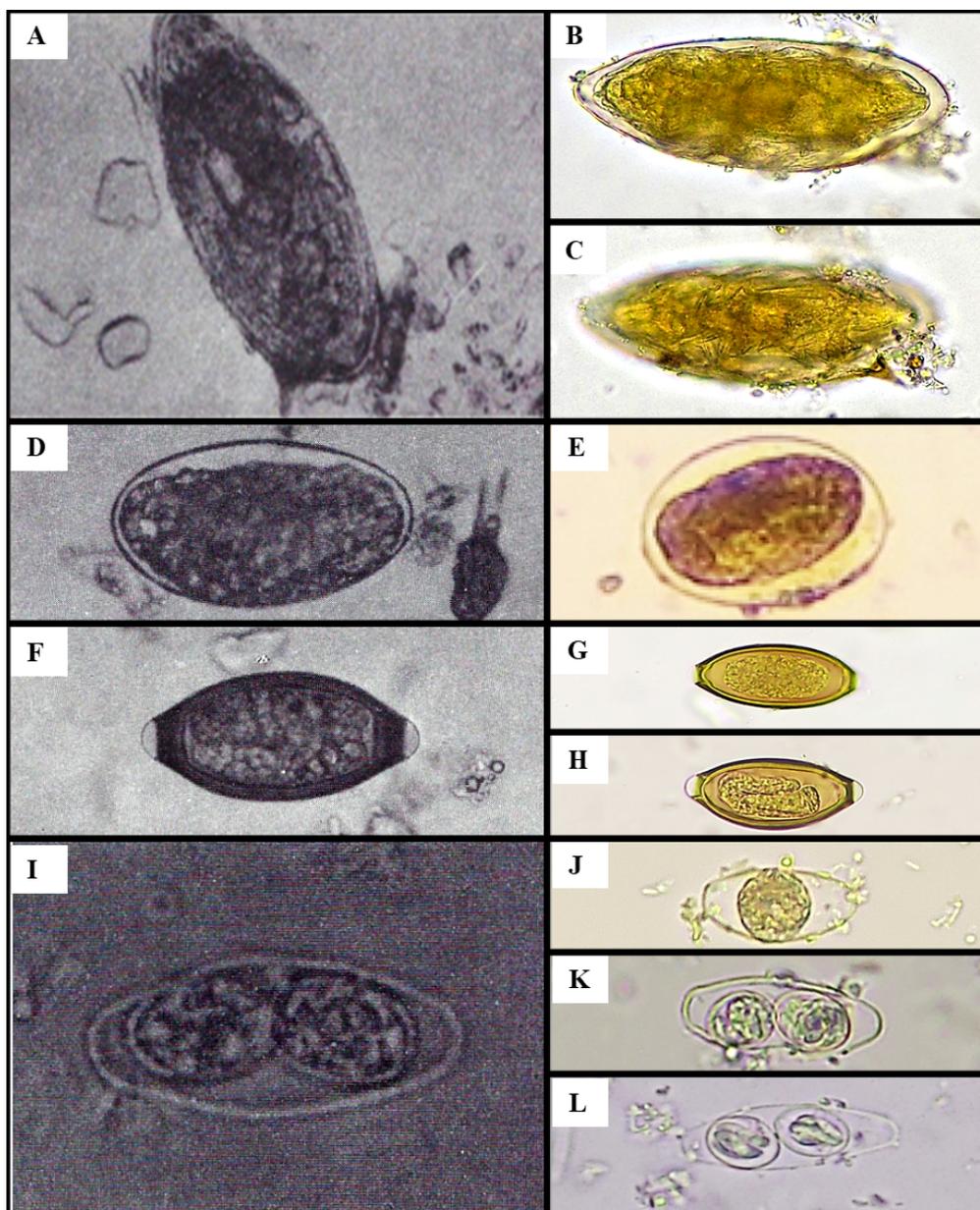
<sup>1</sup> Na publicação original<sup>1</sup>, não há explanações sobre os possíveis fatores relacionados à não conservação dos ovos de *H. nana* e *H. diminuta* pela solução de iodo-mercurato de potássio a 0,2% com formol.

implicações nas esferas de saúde, segurança e meio ambiente, foram examinadas alíquotas das amostras de fezes preservadas, que estavam depositadas em coleção parasitológica do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz (**Figura 1**). Durante todo o período de conservação, o material foi mantido em temperatura ambiente. Suas alíquotas foram recolhidas, centrifugadas, examinadas e, também, mantidas em temperatura ambiente.



**Figura 1.** Tubos de ensaio contendo material biológico preservado, por cerca de quatro décadas, em solução de iodo-mercurato de potássio

A observação microscópica, processada em microscópio óptico comum, revelou a presença de ovos de *S. mansoni*, Ancylostomidae e *T. trichiura*, além de oocisto de *I. belli*, todos em estado de preservação adequado para sua correta identificação (**Figura 2**). Na publicação original de 1981, Aguiar et al<sup>1</sup> registraram que o conservante empregado apresentava propriedade de não aglutinar partículas. Esta característica permaneceu presente após um intervalo de, aproximadamente, quatro décadas de conservação das amostras. Em relação ao estado de manutenção das estruturas dos parasitos, destaca-se a presença de miracídio em ovo de *S. mansoni*, larva no interior de ovo de *T. trichiura* e esporozoítos em oocistos de *I. belli* (**Figura 2**).



**Figura 2.** Ovos de helmintos e oocistos de *I. belli*, provenientes de material biológico preservado em solução de iodo-mercurato de potássio a 0,2% e visualizados em diferentes épocas. **A:** Ovo de *S. mansoni* em 1981, após seis meses de conservação; **B e C:** Ovos de *S. mansoni* em 2018, cerca de quatro décadas de preservação; **D:** Ovo de Ancylostomidae em 1981, após seis meses de conservação; **E:** Ovo de Ancylostomidae em 2018, cerca de quatro décadas de preservação; **F:** Ovo de *T. trichiura* em 1981, após seis meses de conservação; **G e H:** Ovos de *T. trichiura* em 2018, cerca de quatro décadas de preservação; **I:** Oocisto de *I. belli* em 1981, após seis meses de conservação; **J, K e L:** Oocistos de *I. belli* em 2018, cerca de quatro décadas de preservação

Diante do constatado potencial conservativo do iodo-mercurato de potássio, a partir da metodologia empregada, verifica-se a possibilidade de sua aplicação em propósitos científicos e acadêmicos, relacionados à pesquisa e ao âmbito didático, respectivamente. Neste contexto, esta preparação permitiria a criação de uma grande

biblioteca de amostras biológicas preservadas, com vistas à produção de diferentes e numerosos estudos, ao longo do tempo.

Apesar das referidas restrições ao uso de compostos de mercúrio, na atualidade, seriam válidas avaliações e discussões quanto às possibilidades de seu emprego para um número

restrito de experimentos. No que diz respeito ao iodo-mercuro de potássio, pesam ao seu favor as questões da aplicabilidade, acima descrita, e da utilização de um baixo quantitativo de bi-iodeto de mercúrio no preparo da solução. Entretanto, é importante salientar que tal insumo, por conter mercúrio em sua composição, mesmo que a baixas concentrações, apresenta toxicidade e pode causar uma série de doenças e agravos à saúde e danos ambientais. Segundo a Organização Mundial da Saúde<sup>7</sup>, o mercúrio está entre os dez produtos químicos associados a importantes problemas de saúde pública. A exposição a este metal pesado, decorrente de inalação, ingestão e contato com a pele e os olhos, pode ser prejudicial aos sistemas: digestivo; imunológico; nervoso, com a ocorrência de transtornos neurológicos envolvendo tremores, insônia, perda de memória, efeitos neuromusculares, cefaleia e disfunções cognitivas e motoras; respiratório e urinário. Neste último caso, as complicações causadas, nos rins, podem ocasionar quadros que variam de proteinúria à insuficiência renal, dependendo da dose e do tempo de exposição pelos quais o indivíduo foi submetido<sup>7</sup>.

Deste modo, se faz imprescindível a obediência das normas de biossegurança quando do manuseio, do armazenamento, do processamento e do descarte de produtos compostos por mercúrio. Neste âmbito, as medidas comumente adotadas são: uso de equipamentos de proteção individual (EPIs) - avental, luvas, máscaras e óculos de proteção; manipulação dos materiais em exaustor ou capela; armazenamento dos insumos em recipientes hermeticamente fechados e em local seco e fresco, devendo estar distante de substâncias incompatíveis e separado de alimentos e medicamentos; descarte dos resíduos químicos em embalagens padronizadas e identificadas e seu posterior encaminhamento a empresas de deposição de resíduos, licenciadas por órgãos ambientais locais, para o seu devido fim<sup>8</sup>.

Por último, esta nota científica acena para a importância de visitar experimentos do passado e ratificar seus resultados décadas após a sua realização. Isto valoriza os estudos originais e as suas observações, além da possibilidade de agregar novos achados a eles. No caso aqui descrito, verificou-se

o potencial conservativo do iodo-mercuro de potássio em um período superior ao avaliado e determinado pelo trabalho original: enquanto que, no passado, a eficácia da solução foi comprovada após seis meses de preservação do material biológico testado, a análise atual revelou que, decorridos cerca de quarenta anos da elaboração do experimento, sua capacidade preservativa permanece eficiente.

## REFERÊNCIAS

1. Aguiar PR, Ventura VR, Burkart IHV, Nascimento JA, Lima IAR, Westphalen SR. Avaliação do biiodeto de mercúrio como preservativo de material biológico. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 1981; 41(1):47-52. Disponível em: [http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/80/rial\\_41\\_1\\_1981/h522.pdf](http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/80/rial_41_1_1981/h522.pdf)
2. Meyer KF, Johnstone HG. Laboratory Diagnosis of Amebiasis. *Am J Public Health Nations Health*. 1935; 25(4):405-14. <http://dx.doi.org/10.2105/ajph.25.4.405>
3. Coutinho JO. Notas sobre modificações do “MIFC” na conservação de fezes para pesquisa de cistos de protozoários. *Arq Fac Hig Saúde Púb Univ São Paulo*. 1956; 10(1/2):65-70.
4. Junod C. Technique coprologique nouvelle essentiellement destinée a la concentration des trophozoites d'amibes. *Bull Soc Pathol Exot*. 1972; 65(3):390-8.
5. Amato Neto V, Corrêa LL. Exame parasitológico de fezes. 4.ed. São Paulo (SP): Sarvier; 1980.
6. Saperó JJ, Lawless DK. The MIF stain-preservation technic for the identification of intestinal protozoa. *Am J Trop Med Hyg*. 1953; 2(4):613-9. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.1953.2.613>
7. Organização Mundial da Saúde - OMS. El mercurio y la salud. [acesso 2020 Ago 15]. Disponível em: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/mercury-and-health>
8. Organização Mundial da Saúde. Manual de segurança biológica em laboratório. 3.ed. Genebra; 2004. Disponível em: <https://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/BisLabManual3rdwebport.pdf>

## AGRADECIMENTOS

*O ano de 2020 foi marcado pelo início da pandemia do (COVID-19) impactando de maneira expressiva as nossas vidas. A grave situação sanitária que ceifou milhares de vidas do convívio familiar, também impôs mudanças de ordem econômica e social significativas, com repercussão nas relações humanas e nos processos de trabalho. Apesar de tudo, profissionais dos diferentes setores econômicos seguiram determinados no cumprimento de suas missões. Nossos agradecimentos a todos e profundo respeito.*

**Pedro Luiz Silva Pinto**  
Editor da RIAL

O Corpo Editorial agradece a todos os relatores abaixo relacionados que com seu trabalho voluntário e anônimo ao longo de 2020 contribuíram para o bom andamento das atividades e elevação do nível dos artigos publicados pela Revista

- **Alcyone Artioli Machado** Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Clínica Médica. Ribeirão Preto, SP
- **Amanda Marília da Silva Sant'Ana** Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Gestão e Tecnologia Agroindustrial, Centro de Ciências Humanas, Sociais e Agrárias. João Pessoa, PB
- **Amauri Antiquera Leite** Universidade Estadual de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Araraquara, SP
- **Anelise Christ Ribeiro** Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química e Alimentos. Rio Grande, RS
- **Aurélia Santos Faraoni** Universidade Federal de Sergipe, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. São Cristóvão, SE
- **Benício Alves de Abreu Filho** Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Centro de Ciências da Saúde. Maringá, PR
- **Cláudio Gustavo Stefanoff** Ministério da Saúde, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Laboratório de Pesquisa Clínica, Coordenação de Pesquisa (CPq). Rio de Janeiro, RJ
- **Cleide Marques Ferreira** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Laboratórios Regionais de Campinas, Núcleo de Ciências Biomédicas. Campinas, SP
- **Christiane Soares Pereira** Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Departamento de Bacteriologia. Rio de Janeiro, RJ
- **Daniel Paiva Barros de Abreu** Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia (COPPE). Rio de Janeiro, RJ
- **Daniele Leal** Audi Nutri. Araçoiaba da Serra, SP
- **Dirce Mithico Yamaoka Yano** Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP
- **Eliandra Mirlei Rossi** Universidade do Oeste de Santa Catarina, Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico em Microbiologia. São Miguel do Oeste, SC
- **Fillipe de Oliveira Pereira** Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Educação e Saúde, Unidade Acadêmica de Saúde. Cuité, PB
- **Francisca Janaina Soares Rocha** Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde. Recife, PE
- **Françoise Vasconcelos Botelho** Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica. Uberlândia, MG



- **Geni Rodrigues Sampaio** Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Nutrição. São Paulo, SP
- **Jeane Santos da Rosa** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Agroindústria de Alimentos. Rio de Janeiro, RJ
- **Jeanice de Azevedo Aguiar** Prefeitura do Município de Cajamar, Divisão de Alimentação Escolar. Cajamar, SP
- **João Carlos Minozzo** Secretaria de Estado da Saúde, Centro de Produção de Imunobiológicos. Piraquara, PR
- **Juliana Damieli Nascimento** Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Laboratório de Parasitologia. Araraquara, SP
- **Juliana Cunha de Andrade** Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, RJ
- **Laís Anversa Trevejo** Centro de Laboratório Regional de Bauru, Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas. Bauru, SP
- **Laís Fernanda de Pauli Yamada** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Alimentos, Núcleo de Morfologia e Microscopia. São Paulo, SP
- **Larissa Mont'Alverne Jucá Seabra** Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Nutrição. Natal, RN
- **Lígia Manuel Martins** Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP
- **Ludmilla Santana Soares e Barros** Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. Cruz das Almas, BA
- **Márcia Dimov Nogueira** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Alimentos, Núcleo de Morfologia e Microscopia. São Paulo, SP
- **Marcia Regina Beux** Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas. Curitiba, PR
- **Maria das Graças Gomes de Azevedo Medeiros** Universidade Federal Fluminense, Faculdade de Nutrição. Rio de Janeiro, RJ
- **Maria Helena Iha Matias** Centro de Laboratório Regional de Ribeirão Preto, Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas. Ribeirão Preto, SP
- **Maria Isabel Andrekowisk Fioravanti** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Laboratório Regional de Campinas, Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas. Campinas, SP
- **Maria Regina Branquinho** Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Departamento de Microbiologia, Setor de Biologia Molecular. Rio de Janeiro, RJ
- **Mariângela Dutra de Oliveira** Instituto Federal do Espírito Santo. Vitória, ES
- **Rafael Lawson Ferreira** Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Microrganismos de Referência. Rio de Janeiro, RJ
- **Rubens Antonio Silva** Superintendência de Controle de Endemias, Departamento de Controle de Vetores. São Paulo, SP
- **Sidinéia Cordeiro de Freitas** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos, Laboratório de Físico-Química e Minerais. RJ
- **Silvia Yuko Eguchi Allergisa** Pesquisa Dermato-Cosmética. São Paulo, SP

- **Talita Maira Goss Milani** Fundação Educacional de Penápolis. Penápolis, SP
- **Vivian Zollar** Qualy Food Assessoria e Consultoria em Nutrição S/S Ltda. São Paulo, SP
- **Viviane de Paula Acosta Iglesia** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Alimentos, Núcleo de Química, Física e Sensorial. São Paulo, SP
- **Agradecimento especial pela revisão do inglês**
- **Mirthes Ueda**
- **Josué de Moraes**





SECRETARIA  
DA SAÚDE

