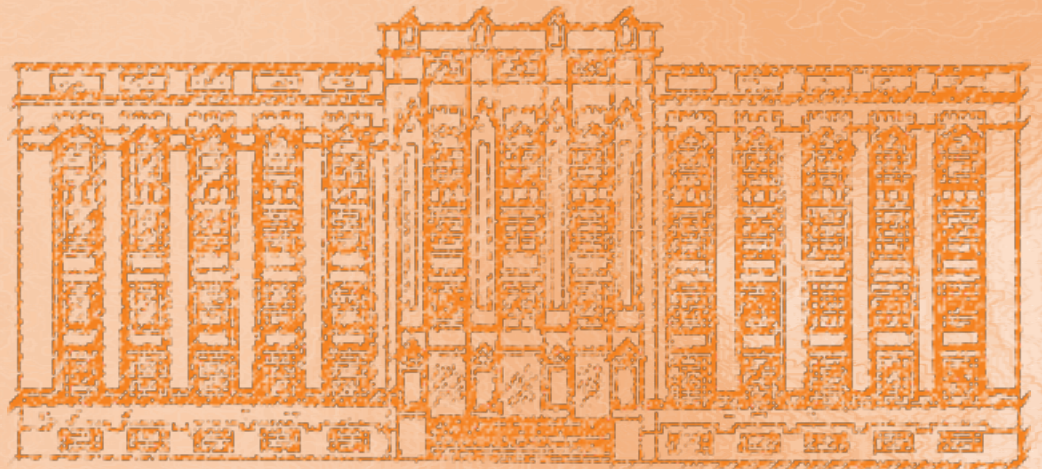


ISSN: 1983-3814 (*on-line*)
RIALA6

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

Volume 81 número único, 2022



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

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Volume 81, 2022

Diretor Geral do Instituto Adolfo Lutz

Adriana Bugno

Editores Assistentes

Adriana Aparecida Buzzo Almodovar
Adriana Palma de Almeida
Aurea Silveira da Cruz Garçon
Daniela Etlinger Colonelli
Eliete Candida de Lima Cortez
Leonardo José Tadeu Araújo
Mahyara Markievicz Mancio Kus Yamashita
Maria Aparecida Moraes Marciano
Maria de Fátima Costa Pires
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

Acará Estúdio Gráfico

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.
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.
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
2022, 81

CDD₁₈ 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

■ ARTIGO DE REVISÃO/ REVIEW ARTICLE

e37177 A relação entre polimorfismos de IL-4 e asma: uma revisão sistemática

The relationship between IL-4 polymorphisms and asthma: a systematic review

Marcos Jessé Abrahão SILVA, Ellerson Oliveira Loureiro MONTEIRO, Bianca Benicio e SILVA, Debora Zoila da Conceição MARTINS, Andrei Santos SIQUEIRA, Bárbara Brasil SANTANA

■ ARTIGO ORIGINAL/ORIGINAL ARTICLE

e39118 Avaliação das rotulagens de alimentos frente à legislação vigente e do uso de alegações não regulamentadas

Evaluation of food labeling before legislation and the use of nonregulated claims

Valdeir de Oliveira GUIMARÃES, Hatanne Carla Fialho Moraes e LIMA, Allan Robledo Fialho e MORAES

e37179 Avaliação de resíduos de agrotóxicos em amostras de farinha de trigo por espectrometria de massas

Evaluation of pesticide residues in wheat flour by mass spectrometry

Alan Roberto COSTA, Lucas Monteiro Santa CRUZ, Vitor Agreli FERNANDES, Viviane Emi NAKANO, Iracema de Albuquerque KIMURA, Janete ALABURDA

e37985 Suplemento alimentar de vitamina C: fiscalização durante o período de adequação à nova legislação

Vitamin C dietary supplement: inspection during adequacy period of new legislation

Lucile ABE-MATSUMOTO, Nelson DIAS, Viviane de Paula Acosta IIGLESIA, Mahyara KUS-YAMASHITA

e37903 Lipídios e ácidos graxos em fórmula infantil: comparação de metodologias de extração convencional x direta

Determination of lipids and fatty acids in infant formula: comparison of the conventional x direct method

Mahyara Markievicz Mancio KUS-YAMASHITA, Sabria AUED-PIMENTEL, Jorge MANCINI-FILHO

e37165 Ensaio multiparamétrico de triagem para diagnóstico de micoses de interesse em Saúde Pública: padronização da metodologia

Multiparametric assay of screening for the diagnosis of mycoses of interest in Public Health: standardization of methodology

Camila Mika KAMIKAWA, Adriana Pardini VICENTINI

e37178 Ocorrência de perigos físicos em alimentos

Occurrence of physical hazards in food

Elaine Cristina de MATTOS, Laís Fernanda de PAULI-YAMADA, Augusta Mendes da SILVA, Márcia Dimov NOGUEIRA, Márcia Bittar ATUI, Maria Aparecida Moraes MARCIANO

e37345 Resultados da razão sinal da amostra sobre o cutoff da reação no ensaio Abbott Architect rHTLV-I/II permite prever a detecção de DNA proviral por PCR em tempo real

Results of a sample-to-cutoff ratio using Abbott Architect rHTLV-I/II assay allow to predict detection of HTLV-1 and HTLV-2 proviral DNA by real-time PCR

Lucas José do Nascimento CRUZ, Carolina de Alcântara MANESCHY, Katarine Antonia do Santos BARILE, Maurício Koury PALMEIRA, Carlos Eduardo de Melo AMARAL

e36756 Detecção de antígenos em cortes parafinados de vermes e caramujos infectados por *Angiostrongylus cantonensis* pela reação de imunofluorescência

Detection of antigens in paraffin sections of worms and snails infected by *Angiostrongylus cantonensis* by immunofluorescence reaction

Felipe Correa Rezende de SOUZA, Leyva Cecília Vieira de MELO, Cristina KANAMURA, Dan Jessé Gonçalves da MOTA, Silvia Gabriel CHIODELLI, Pedro Luiz Silva PINTO

e37253 Uso de metodologias laboratoriais para confirmação de surto de doença diarreica aguda causada por múltiplos patógenos

Use of laboratory methodologies to confirm an outbreak of acute diarrheal disease caused by multiple pathogens

Maria Aparecida Moraes MARCIANO, Rafaela Aparecida SILVA, Maria Luísa BARBOSA, Pedro Luiz da Silva PINTO, Ricardo GAVA, Vera Lucia PEREIRA-CHIOCCOLA

e37824 Serviços de controle de infecção hospitalar e de medicina do trabalho no enfrentamento à pandemia de COVID-19 na saúde ocupacional

Use of laboratory methodologies to confirm an outbreak of acute diarrheal disease caused by multiple pathogens

Angela Aparecida Silva VIEIRA, Suelaine Antônia de CARVALHO, Angela de Souza FLORIANO, Gabriela Miranda de Oliveira CASTRO, Aleida Nazareth SOARES, Adelino de Melo FREIRE JÚNIOR, Amanda Damasceno de SOUZA

■ COMENTÁRIOS TÉCNICO-CIENTÍFICOS/ TECHNICAL-SCIENTIFIC COMMENTS

e37170 Desafios e soluções na gestão do Núcleo de Inovação Tecnológica do Instituto Adolfo Lutz (NIT-IAL)

Challenges and solutions in the management in the Technological Innovation Center of the Adolfo Lutz Institute, NIT-IAL

Eloane Cristina de Paiva SILVA, Denise Hage RUSSO

■ COLABORADORES

■ INSTRUÇÕES AOS AUTORES

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



The relationship between IL-4 polymorphisms and asthma: a systematic review

A relação entre polimorfismos de IL-4 e asma: uma revisão sistemática

Marcos Jessé Abrahão Silva¹ , Ellerson Oliveira Loureiro Monteiro¹ , Bianca Benicio e Silva¹ ,
Debora Zoila da Conceição Martins¹ , Andrei Santos Siqueira² , Bárbara Brasil Santana¹ 

¹ Universidade da Amazônia, Ananindeua, Pará, Brazil.

² Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Tecnologia Biomolecular, Pará, Brazil.

*Corresponding author/Autor de correspondência: jesseabrahao10@gmail.com

Received/Recebido: 12.10.2021 - Accepted/Aceito: 14.01.2022

ABSTRACT

Asthma is a chronic and heterogeneous disease of the airways that begins in childhood and persists, in many cases, into adulthood. The disease is the result of environmental, epigenetic and genetic interactions. This work aims to review the polymorphisms described in the literature in the IL-4 gene associated with susceptibility or protection to the development of asthma. This is a systematic literature review, carried out in PubMed, MEDLINE and Science Direct databases in the time frame from 2000 to July 2021, revealing the following key points: IL-4, Polymorphisms and Asthma. The search resulted in 29 articles, all in English. Despite some divergent studies, the SNP rs2243250, which was the most studied in populations from different countries, was also the one that found the most correlations of susceptibility with the disease. It is concluded that although there is controversial data on IL-4 SNPs related to the disease, the association of pangenomic studies has brought a list of genes and their variations associated with the risk of developing asthma, such as the rs2243250 SNP that was well related in populations of several countries analyzed.

Keywords. Polymorphisms, Interleukin-4, Asthma.

RESUMO

A asma é uma doença crônica e heterogênea das vias aéreas que tem início na infância e persiste em muitos casos até a vida adulta. A doença é resultado de interações ambientais, epigenéticas e genéticas. Este trabalho tem como objetivo revisar sobre os polimorfismos descritos na literatura no gene IL-4 associados à susceptibilidade ou proteção ao desenvolvimento da asma. Trata-se de uma revisão sistemática da literatura, feita nos bancos de dados PubMed, MEDLINE e Science Direct no corte temporal de 2000 a julho de 2021, ressaltando os seguintes pontos-chave: IL-4, Polimorfismos e Asma. A pesquisa resultou em 29 artigos, sendo em sua totalidade em língua inglesa. Apesar de alguns estudos divergentes, o SNP rs2243250, que foi o mais estudado em populações de diversos países, também foi o que mais encontrou correlações de susceptibilidade com a doença. Conclui-se que, apesar de haver dados controversos sobre os SNPs de IL-4 relacionados à doença, a associação dos estudos pangenômicos tem trazido uma lista de genes e variações deles associados com o risco de desenvolver a asma, como o SNP rs2243250 que foi bem relacionado em populações de vários países analisados.

Palavras-chave. Polimorfismos, Interleucina-4, Asma.

INTRODUCTION

According to The Global Initiative for Asthma (GINA), asthma can be defined as a multifactorial chronic inflammatory disease that affects the lower airways with hyperresponsiveness¹. Asthma is one of the most frequent chronic inflammatory diseases in developed countries. It is estimated that it affects more than 300 million people globally and that causes great socioeconomic damage to countries in the health-disease binomial². Pulmonary function measures, such as the percentage value of forced expiratory volume in one second (FEV1), which reflects the characteristics of lung capacity, are decisive for classifying severe asthma³.

Antigens are normally introduced into the respiratory tract by inhalation and by diffusion into the mucosa, sensitizing B lymphocytes that produce allergen-specific immunoglobulin (Ig) E, IgE specifically binds to its high-affinity receptor on the mast cell membrane⁴. When exposed to the same allergen again, mast cells degranulate, resulting in the rapid release of chemical compounds such as histamine, leukotrienes, prostaglandins and other pro-inflammatory mediators⁵. These molecules play a central role in the immunopathogenesis of asthma, producing a cascade of events that act as a trigger for a greater inflammatory response, largely responsible for airway hyperresponsiveness and reversible airflow obstruction, generating the main asthma symptoms that include wheezing, coughing, and dyspnea⁵.

Asthma is linked to atopic phenotypes and is typically caused by a type 1 hypersensitivity reaction, which results in a T helper (Th) 2 lymphocyte response, mediated by inflammatory cells, with increased production of cytokines such as interleukins (IL) 4, IL-5 and IL-13 and IgE antibodies⁶. High serum total IgE levels are a clinical condition associated with asthma and atopy in western communities⁷ and were related to a range of genetic and environmental risk factors⁸.

Dendritic cells (DCs) are the main antigen-presenting cells (APCs) that act as pattern recognition receptors (PRRs), which are ideal for the main contact between the immune system and external allergens. During the primary response, dendritic cells originating from the bone marrow are attracted by inflammatory chemokines, such as macrophage inflammatory protein -3 α (MIP-3 α) to the tissues. Costimulatory molecules on the surface of APCs, in particular, the B7.2/CD28 interaction participates in primary and secondary allergic sensitization and can lead to *naive* T cell proliferation, which is also mediated by binding between the T cell-specific receptor (TCR) and the APC MHC-II complex, thus undergoing differentiation into Th2. Dendritic cells have the ability to produce CC chemokine ligand 22 (CCL22) and CCL17 which are chemotactic for Th2 cells⁹.

IL-4 is related to the recruitment of polymorphonuclear cells, for example, basophils and eosinophils. IgE produced in asthmatic airways binds to high-affinity receptors for IgE (Fc ϵ RI) on mast cells and basophils, preparing them for their activation by antigen. In this sense, immediate hypersensitivity is generated when there is cross-linking of a multivalent antigen to the IgE molecules previously bound to the Fc ϵ RI receptor, which is present in these cells, activating them. IL-4 also upregulates the endothelial expression of vascular adhesion molecule 1 (VCAM-1) on the endothelium. The interaction of VCAM-1 with the very late activating antigen 4 (VLA-4) promotes the recruitment of eosinophils. IL-4 also induces chemotaxis and fibroblast activation and, together with IL-3, promotes the growth of human basophils and eosinophils. Eosinophils are activated by IL-5, generated by the Th2 subpopulation. Mast cells, basophils, and eosinophils also produce IL-4¹⁰.

It also exerts effects on monocytes and macrophages. It increases the surface expression of class II Histocompatibility Complex (MHC class II) molecules and the antigen-presenting capacity of macrophages

but inhibits macrophage colony formation and tumor necrosis factor (TNF) cytokine release, IL-1, IL-12, interferon-alpha (IFN- α), IL-8 and macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1 α). Along with other cytokines, such as granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and IL-6, IL-4 can promote the growth of mast cells and myeloid and erythroid progenitors. IL-4 has inhibitory effects such as suppression of metalloproteinase biosynthesis in human alveolar macrophages, inhibition of inducible nitric oxide synthase (NOS) expression in human epithelial cells, and reduction of CCL5 and IL-8 expression in human airway smooth muscle cells. With the rapid activation of macrophages, there is the production of reactive oxygen species (ROS)¹¹.

The main activity of IL-4 is to profile the Th2 immune response. The differentiation of Th2 cells from *naive* CD4 T cells is typically dependent on the presence of IL-4 in the local cytokine environment, as it requires transcription factors such as GATA3 and STAT6, which prepare Th2 cells for cytokine secretion. Binding of the IL-4 receptor (IL-4R) induces JAK1/3-mediated phosphorylation and signal transducer and activator of transcription-6 (STAT6) dimerization. pSTAT6 dimers then translocate to the nucleus and induce GATA3 expression¹².

Thus, following genetic predisposition, *naive* T lymphocytes from asthmatic individuals undergo differentiation into Th2 after exposure to allergens. Elevated frequencies of Th2 cells in the airways release specific cytokines that control the rebound of allergic inflammation, including IL-4¹³. In addition, IL-4 is very important in driving the differentiation of helper T lymphocyte precursors into Th2 response cells¹⁴.

IL-4 is a lymphokine that acts as a growth factor (CSF) that induces the Th2 response while inhibiting the Th1 response, further increasing the expression of low-affinity IgE receptors (Fc ϵ R2) in non-activated B cells and macrophages. The cited cytokine also plays a role in the activation of B cells by increasing the expression of MHC class II molecules, as well as increasing the expression of CD23, CD40 and the alpha chain of the IL-2 receptor (IL-2RA)¹⁵.

The Th2 subpopulation response synthesizes cytokines that, in turn, promote B lymphocyte differentiation. B lymphocytes differentiate into antibody-secreting cells (plasmocytes) resulting in the expression of IgE messenger RNAs (short and long) and generating the synthesis of specific IgE proteins for specific allergens. In activated B cells, IL-4 mainly promotes the production of IgE (by switching immunoglobulin class) and IgG1, and its effect is antagonized by IFN- γ ¹⁶.

The process of IgE secretion by B cells induced by T lymphocytes was called the two-signal model. The first signal is related to the production of IL-4 and IL-13. These interleukins share the IL-4 receptor α chain (IL-4R α) as these cytokines bind to receptors on B cells. Once combined, translocation to the STAT6 nucleus stimulates transcription of the C ϵ gene locus containing the coding sequences (exons) for the heavy chain and IgE constant regions. The second occurs by contact by the interaction between a transmembrane protein called CD40 Ligand (CD40L or CD15) expressed on the surface of activated helper T lymphocytes and the CD40 receptor, a co-stimulating molecule of B lymphocytes¹⁷.

The mutual action between the two molecules triggers genetic reorganization (recombination of loss of transformation), bringing all elements of the heavy chain back into function. The result is the complete multi-exon genetic coding of the heavy chain. The combination of these two signals determines a class switch for IgE cell and B cell proliferation. Complementary interactions between other pairs of ligands and receptors (between B7-2/CD28 and B7-2/CTLA-4 and between a L β 2 integrin and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) may add to or modulate the activation of B cells dependent on T cells after the binding of CD40 to its ligand. These functional capabilities of the cytokine make it extremely important for the immunopathogenesis of allergic asthma¹⁸.

The highlighted cytokine may play a role in both defending and exacerbating the inflammatory process of asthma. Elevated IL-4 levels are related to monocyte polarization to M2-type macrophages, increased Th17 and Th2 cell counts, NLRP3 inflammasome activation, impaired IgA expression and B-cell autophagy¹⁹⁻²³. The human IL-4 gene (OMIM#: 147780) is found on the long arm of chromosome 5 (5q31.1), is nearly 10 kilobases (kb) in length, and has 4 exons and 3 introns²⁴.

The joint participation of cells (such as eosinophils, mast cells, fibroblasts, macrophages/monocytes and neutrophils), cytokines such as IL-4, IL-5, IL-8, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, TGF- β , INF- γ , TNF- α , adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1, CD18 and CD11) and other elements of inflammation in asthma provide the basis for genes that could be studied. Immunogenetic studies are important because they make it possible to associate, among other objectives, genetic polymorphisms with the development of the disease and with interpersonal variability in the response to therapy. It is estimated that more than 80% of the variability in therapeutic response has a genetic basis²⁵.

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) are the most common type of variation in the human genome and they are primarily equivalent to the nitrogenous bases Adenine (A), Thymine (T), Cytosine (C) and Guanine (G)²⁶. They can affect coding regions (exons) or non-coding regions (introns). SNPs in exons are subdivided into synonyms and non-synonyms. Synonymous or silent SNPs are the types that do not affect protein structure, as they do not produce changes in amino acid sequences. On the other hand, non-synonymous SNPs can generate amino acid substitutions, affecting the function of the encoded protein or generating stop codons. Insertions and deletions can cause functional gene changes depending on whether they preserve or break the reading frame. Consequently, polymorphic variants of the IL-4 gene are of great interest for assessment of sensitivity or protection against asthma²⁷.

In this context, the following research problem arises: which IL-4 SNPs are associated with asthma susceptibility or protection?

MATERIAL AND METHODS

This is a systematic literature review, which aims to theoretically and conceptually describe the correlations between IL-4 gene polymorphisms and the development of asthma published in the literature.

The study followed the formation stages: 1) Elaboration of the research question and problem; 2) Stipulation of inclusion and exclusion criteria; 3) Choice of the sample; 4) Analysis of the articles; 5) Interpretation, discussion, and presentation of the review²⁸.

For the elaboration of the research question, the PICO strategy was used, related to the anagram: population; intervention; comparison; and outcome, as this generates greater integration of results and resolution of the highlighted problem²⁹.

Thus, the following question was raised: which SNPs exist in the IL-4 gene that are proven to cause susceptibility or protection to the development of asthma? Following the questions: Patient: patients with asthma / Intervention – evaluate IL-4 SNPs for each population studied and asthma / Comparison – IL-4 and asthma SNPs / Outcome – identification of which IL-4 SNPs are associated with susceptibility or protection to asthma.

In this way, the research question was asked, through which the following keywords were selected as a search strategy: “IL-4” and “Polymorphisms” and “Asthma”, with the Boolean operator “AND”. The search took place in the following databases: US National Library of Medicine National Institutes of Health (PubMed), Cochrane Collaboration and Medical Literature Analysis and Retrieval System Online (MEDLINE) and Science Direct.

As inclusion criteria, available articles, complete in the original categories in Portuguese, English and Spanish, of the types cross-sectional studies, case series, case-control, cohort studies, comparative studies, experimental studies (randomized clinical trials, field trials, community trials) and *in vitro* and *in vivo* trials from 2000 to July 2021. This period was used in order to seek to extend the research to more data. The exclusion criteria were articles published before the year 2000, articles that were duplicated, only the abstract available, letters to the editor, and articles with topics not relevant to the research question. In this way, we arrived at the final sample, characterized by all the steps, including and excluding them.

The data selection step for the search visualization was performed by consensus of two investigators (MJAS and EOLM) independently. To classify the studies, the Grading of Recommendations Assessment, Development, and Evaluation (GRADE system) was used, which is a system created to identify the degree of evidence and the strength of health recommendations³⁰. The Excel software was used to organize and sort the titles and abstracts and the GRADE pro GDT software to classify the articles in the system.

The data retrieved from the articles for data extraction and synthesis were based on the collection and evaluation of the following: author, year, title, methodology, study population, country and results. The accepted SNPs were from both the introns and exons of the highlighted gene. The PRISMA flowchart, based on the PRISMA protocol, was used to present the steps followed for the present study³¹.

RESULTS

A total of 155 studies were listed in the search for articles in the databases. After excluding 10 duplicate studies, in addition to 10 letters to the editor, and 20 studies with only the abstract available, 86 studies irrelevant to the topic were removed based on title, abstract and body text (Figure). The final sample consisted of 29 articles (Table).

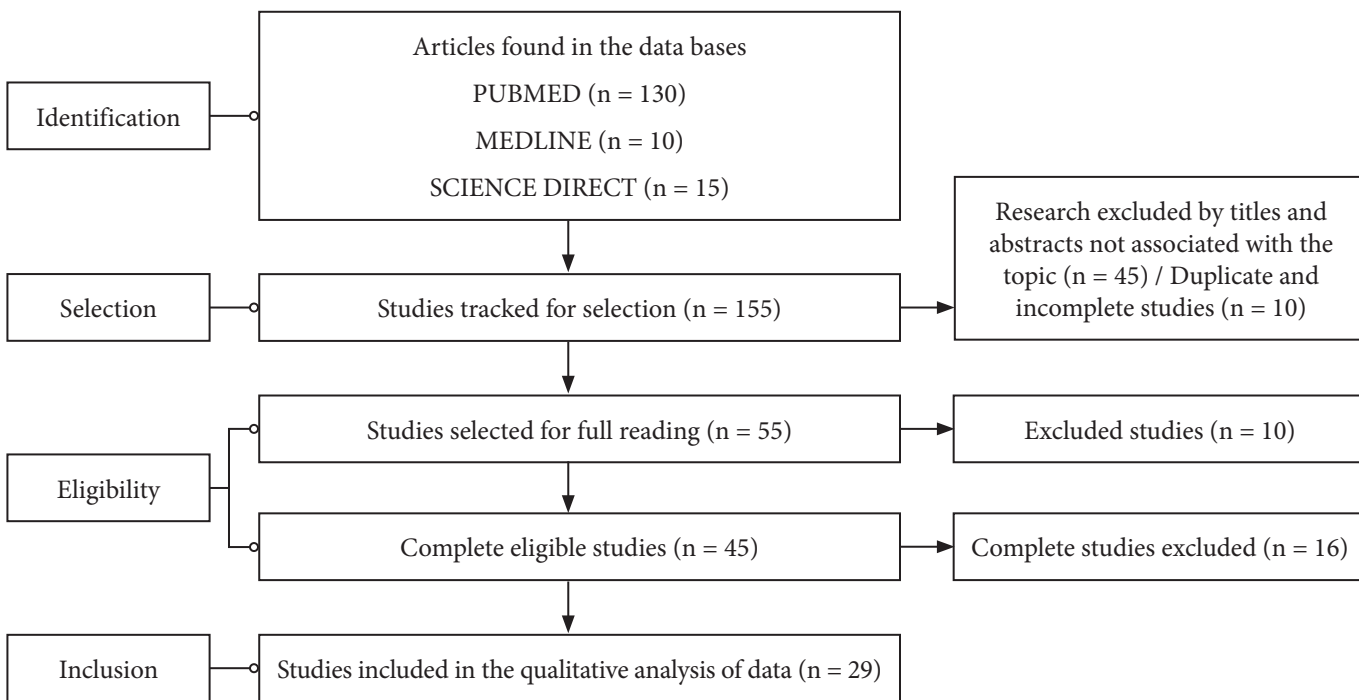


Figure. Flowchart of procedures for identification, selection, eligibility and inclusion of articles for analysis. Belem, PA, Brazil

Table. Characteristics of the studies included in the systematic review

Manuscript	Year of publication	Database	Methodology/ Population Size	Country	SNP	Results
Single nucleotide and copy-number variants in IL-4 and IL-13 are not associated with asthma susceptibility or inflammatory markers: a case-control study in a Mexican-mestizo population ³² .	2020	PUBMED	Case-control/ 486 individuals	Mexico	rs2070874.	There were no statistically significant relationships.
Maternal genetic variants of IL-4/IL-13 pathway genes on IgE with "Western or Eastern Environments/Lifestyles" ³³ .	2014	PUBMED	Cohort study/ 1208 individuals	Finland and Russia	rs2243250; rs2070874; rs2227284.	For SNP rs2243250, in C>T, the mutant allele: increased serum IgE and susceptibility to asthma. For SNP rs2070874, in C>T, the mutant allele: increased serum IgE and susceptibility to asthma. For SNP rs2227284, in G>T, the mutant allele: serum IgE elevation and susceptibility to asthma.
Polymorphisms of the IL-12B, IL-1B, and TNFA genes and susceptibility to asthma ³⁴ .	2013	PUBMED	Case-control/ 376 individuals	Spain	rs2243248; rs2243250; rs2070874.	For all analyzed SNPs, no associations were possible.
Relationship between polymorphisms in IL-4 and asthma in Japanese women: the Kyushu Okinawa Maternal and Child Health Study ³⁵ .	2013	PUBMED	Case-control/ 1370 individuals	Japan	rs2243250; rs2070874; rs2227284; rs2243290.	For SNP rs2243290, in C>A, the mutant allele: asthma susceptibility. For the other SNPs, no associations were possible.
Interleukin-4 (IL-4) and Interleukin-4 receptor (IL-4Rα) polymorphisms in asthma: a case control study ³⁶ .	2005	PUBMED	Case-control/ 212 individuals	Spain	rs2070874.	In C>T, the mutant allele: asthma risk.
Association of a 4-locus gene model including IL-13, IL-4, FCER1B, and ADRB2 with the asthma predictive index and atopy in Chinese Han Children ³⁷ .	2018	PUBMED	Case-control/ 385 children	China	rs2243250.	In C>T, the mutant allele: susceptibility to asthma and atopy.

Continues on the next page

Manuscript	Year of publication	Database	Methodology/ Population Size	Country	SNP	Results
Genetic polymorphisms and asthma: findings from a case-control study in the Madeira island population ³⁸ .	2014	MEDLINE	Case-control/ 282 individuals	Portugal	rs2243250; RP2.	For SNP rs2243250, in C>T, the mutant allele: about 2-fold increased risk of developing moderate asthma and 4-fold increased risk for severe asthma. For the RP2 SNP, genotypes 253183/183183: 2-fold increased risk of moderate asthma and about 3-fold increased risk for severe asthma.
Immunological parameters and gene polymorphisms (C-590T IL-4, C-597A IL-10) in severe bronchial asthma in children from the Krasnoyarsk region, West Siberia ³⁹ .	2013	PUBMED	Case-control/ 150 children	Russia	rs2243250.	In C>T, the mutant allele: increased serum IL-4 level and association with uncontrolled atopic bronchial asthma.
A preliminary study on the association of single nucleotide polymorphisms of interleukin 4 (IL-4), IL-13, IL-4 receptor alpha (IL-4Rα) & Toll-like receptor 4 (TLR4) genes with asthma in Indian adults ⁴⁰ .	2015	PUBMED	Case-control/ 150 individuals	India	rs2243250; rs2070874.	For SNP rs2243250, in C>T, the mutant allele: asthma susceptibility. For SNP rs2070874, in C>T, the mutant allele: asthma risk.
The association between the IL-4, ADRβ2 and ADAM 33 gene polymorphisms and asthma in the Taiwanese population ⁴¹ .	2012	PUBMED	Case-control/ 591 individuals	Taiwan	rs2243250.	In C>T, the mutant allele: asthma risk.
Unifying candidate gene and GWAS Approaches in Asthma ⁴² .	2010	PUBMED	Cohort study/ 1361 individuals	Germany	rs2243250; rs2070874; rs2243248.	For SNP rs2243250, in C>T, the mutant allele: asthma risk. For SNP rs2070874, in C>T, the mutant allele: asthma susceptibility. For SNP rs2243248, in T>G, the mutant allele: asthma susceptibility. No significant associations were possible
Expression of asthma susceptibility genes in bronchial epithelial cells and bronchial alveolar lavage in the Severe Asthma Research Program (SARP) cohort ⁴³ .	2016	PUBMED	Cohort study/ 201 individuals	United States	rs2243248.	For SNP rs2243250, in C>T, the mutant allele: asthma risk. For SNP rs2070874, in C>T, the mutant allele: asthma susceptibility. For SNP rs2243248, in T>G, the mutant allele: asthma susceptibility. No significant associations were possible.

Continuation

Manuscript	Year of publication	Database	Methodology/ Population Size	Country	SNP	Results
Variation in conserved non-coding sequences on chromosome 5q and susceptibility to asthma and atopy ⁴⁴ .	2005	PUBMED	Case-control/ 30 individuals	United States	rs2243250.	In C>T, the mutant allele: asthma risk.
The -590C/TIL4 single-nucleotide polymorphism as a genetic factor of atopic allergy ⁴⁵ .	2010	PUBMED	Case-control/ 204 individuals	Philippines	rs2243250.	In C>T, the mutant allele: risk of asthma <i>per se</i> and atopic allergy.
Single nucleotide polymorphisms predisposing to asthma in children of Mauritian Indian and Chinese Han ethnicity ⁴⁶ .	2014	PUBMED	Case-control/ 766 individuals	India and China	rs2243250.	No correlations were possible.
Association of TGF-beta1, IL-4 and IL-13 gene polymorphisms with asthma in a Chinese population ⁴⁷ .	2011	PUBMED	Case-control/ 307 individuals	China	rs2070874.	No significant associations were possible.
Single-nucleotide polymorphisms in genes predisposing to asthma in children of Chinese Han nationality ⁴⁸ .	2009	PUBMED	Case-control/ 384 individuals	China	rs2243250.	No correlations were possible.
Ethnicity-specific gene-gene interaction between IL-13 and IL-4Ra among African Americans with asthma ⁴⁹ .	2007	PUBMED	Case-control/ 352 individuals	United States	rs2243250; rs2070874; rs2243251; rs2243290.	No correlations were possible between any of the aforementioned SNPs and asthma.
Gene-gene and gene-environment interactions on cord blood total IgE in Chinese Han children ⁵⁰ .	2021	PUBMED	Cohort study/ 989 individuals	China	rs2243250.	For SNP rs2243250, in C>T, the mutant allele: asthma susceptibility. Gene-environment interaction in elevated umbilical cord IgE levels was found between the cited SNP and maternal atopy.

Continues on the next page

Manuscript	Year of publication	Database	Methodology/ Population Size	Country	SNP	Results
Sequencing the IL-4 locus in African Americans implicates rare noncoding variants in asthma susceptibility ⁵¹ .	2009	PUBMED	Cohort study/ 142 individuals	United States	rs10080170; rs10065221; rs10058157; rs2243242; rs2243247; rs2243248; rs2243249; rs2243250; rs2070874; rs2243251; rs2243252; rs734244; rs2243253; rs11479198; rs2243258; rs2243259; rs2227284; rs2243260; rs2243261; rs2227282; rs2243263; rs2243264; rs2243265; rs2243266; rs2243267; rs2243268; rs9282745; rs9282746; rs2243269; rs2243270; rs2243271; rs2243272; rs2243273; rs2243274; rs2243275; rs2243276; rs2243277; rs2243278; rs2243281; rs2243285; rs2243286; rs2243287; rs2243288; rs2243289; rs2243290.	For SNP rs2243249, in T>C, the mutant allele: asthma susceptibility. For SNP rs2243252, in T>C, the mutant allele: asthma susceptibility. For SNP rs2243258, in C>T, the mutant allele: risk of asthma. For SNP rs2243259, in C>T, the mutant allele: asthma risk. For SNP rs2243260, in A>T, the mutant allele: asthma susceptibility. For SNP rs2243264, in A>G, the mutant allele: risk of asthma. For SNP rs2243265, in C>A, the mutant allele: asthma susceptibility. For SNP rs9282745, in T>A, the variant allele: asthma risk. For SNP rs9282746, in G>A, the variant allele: asthma susceptibility. For SNP rs2243271, in G>A, the variant allele: asthma risk. For SNP rs2243272, in G>T, the mutant allele: asthma susceptibility (the mutation being only found in asthmatic patients). For SNP rs2243273, in C>T, the mutant allele: asthma susceptibility. For SNP rs2243275, in T>C, the mutant allele: asthma risk. For SNP rs2243276, in T>C, the variant allele: asthma susceptibility. For the rs2243277 SNP, in C>T, the mutant allele: asthma susceptibility (the mutation being only found in asthmatic patients). For the rs2243278 SNP, the mutation (deletion) in the wild-type ACTAAAGACACGCAGGCCGAGTC allele generated susceptibility to asthma. For SNP rs2243281, in T>C, the mutant allele: asthma risk. For SNP rs2243286, in C>T, the mutant allele: risk of asthma <i>per se</i> . For SNP rs2243287, in G>C, the variant allele: associated with asthma. For the other SNPs, no significant associations were possible.

Continues on the next page

Continuation

Manuscript	Year of publication	Database	Methodology/ Population Size	Country	SNP	Results
Identification of IL-13 C1923T as a single nucleotide polymorphism for asthma in children from Mauritius ⁵² .	2015	PUBMED	Case-control/ 382 individuals	Mauricio Islands	rs2243250.	No significant associations were possible.
TNF-alpha, IL-4Rα and IL-4 polymorphisms in mild to severe asthma from Italian Caucasians ⁵³ .	2013	PUBMED	Case-control/ 181 individuals	Italy	rs2243250; rs2243248; rs2070874.	For SNP rs2243250, in C>T, the mutant allele: asthma risk (severe and moderate). For the other SNPs, no significant associations were possible.
Differences in candidate gene association between European ancestry and African American asthmatic children ⁵⁴ .	2011	PUBMED	Comparative study/ 1845 children	United States	rs2243250; rs2243282; rs2243274; rs2243268; rs2243263; rs2243248; rs2243283.	For SNP rs2243250, in C>T, the mutant allele: asthma susceptibility. For SNP rs2243274, in G>A, the variant allele: asthma risk. For SNP rs2243263, in G>C, the mutant allele: asthma susceptibility. For SNP rs2243248, in T>G, the mutant allele: asthma risk. For SNP rs2243283, in C>G, the variant allele: asthma risk. For the other SNPs, no significant associations were possible. For SNP rs2243250, in C>T, the wild-type allele: asthma susceptibility. The T (mutant) allele and the TT genotype: atopic bronchial asthma. Carriers of the C allele (wild): reduced risk of asthma. Furthermore, the TT genotype was found to be related to higher serum concentrations of IgE and IL-4 compared to the CT and CC genotypes. No significant associations were possible.
Genotyping of IL-4 -590 (C>T) gene in Iraqi asthma patients ⁵⁵ .	2017	PUBMED	Case-control/ 73 individuals	Iraq	rs2243250.	For SNP rs2243250, in C>T, the mutant allele: asthma susceptibility. For SNP rs2243274, in G>A, the variant allele: risk asthma risk. For SNP rs2243263, in G>C, the mutant allele: asthma susceptibility. For SNP rs2243248, in T>G, the mutant allele: asthma risk. For SNP rs2243283, in C>G, the variant allele: asthma risk. For the other SNPs, no significant associations were possible. For SNP rs2243250, in C>T, the wild-type allele: asthma susceptibility. The T (mutant) allele and the TT genotype: atopic bronchial asthma. Carriers of the C allele (wild): reduced risk of asthma. Furthermore, the TT genotype was found to be related to higher serum concentrations of IgE and IL-4 compared to the CT and CC genotypes. No significant associations were possible.

Continues on the next page

Manuscript	Year of publication	Database	Methodology/ Population Size	Country	SNP	Results
Analysis of polymorphisms in T(H)2-associated genes in Russian patients with atopic bronchial asthma ⁵⁶ .	2012	PUBMED	Case-control/ 396 individuals	Russia	rs2070874.	<p>For SNP rs2243250, in C>T, the mutant allele: asthma susceptibility.</p> <p>For SNP rs2243274, in G>A, the variant allele: asthma risk.</p> <p>For SNP rs2243263, in G>C, the mutant allele: asthma susceptibility.</p> <p>For SNP rs2243248, in T>G, the mutant allele: asthma risk.</p> <p>For SNP rs2243283, in C>G, the variant allele: asthma risk.</p> <p>For the other SNPs, no significant associations were possible.</p> <p>For SNP rs2243250, in C>T, the wild-type allele: asthma susceptibility.</p> <p>The T (mutant) allele and the TT genotype: atopic bronchial asthma. Carriers of the C allele (wild): reduced risk of asthma. Furthermore, the TT genotype was found to be related to higher serum concentrations of IgE and IL-4 compared to the CT and CC genotypes.</p> <p>No significant associations were possible.</p>
IL-4 receptor α polymorphisms may be a susceptible factor for work-related respiratory symptoms in Bakery workers ⁵⁷ .	2013	PUBMED	Cohort study/ 373 individuals	South Korea	rs2243248.	<p>For SNP rs2243250, in C>T, the mutant allele: asthma susceptibility.</p> <p>For SNP rs2243274, in G>A, the variant allele: asthma risk.</p> <p>For SNP rs2243263, in G>C, the mutant allele: asthma susceptibility.</p> <p>For SNP rs2243248, in T>G, the mutant allele: asthma risk.</p> <p>For SNP rs2243283, in C>G, the variant allele: asthma risk.</p> <p>For the other SNPs, no significant associations were possible.</p> <p>For SNP rs2243250, in C>T, the wild-type allele: asthma susceptibility.</p> <p>The T (mutant) allele and the TT genotype: atopic bronchial asthma. Carriers of the C allele (wild): reduced risk of asthma. Furthermore, the TT genotype was found to be related to higher serum concentrations of IgE and IL-4 compared to the CT and CC genotypes.</p> <p>No significant associations were possible.</p>
IL-4 gene polymorphisms and their association with atopic asthma and allergic rhinitis in Pakistani patients ⁵⁸ .	2013	PUBMED	Cohort study/ 334 individuals	Pakistan	rs2243250; rs2227284; rs2070874.	<p>For SNP rs2243250, C>T, the mutant allele: susceptibility to asthma and allergic rhinitis.</p> <p>For SNP rs2227284, in T>G, the variant allele: susceptibility to asthma and allergic rhinitis.</p> <p>For SNP rs2070874, no significant association was possible.</p>

Continues on the next page

Continuation

Manuscript	Year of publication	Database	Methodology/ Population Size	Country	SNP	Results
Polymorphisms in the interleukin-4 and interleukin-4 receptor alpha chain genes confer susceptibility to asthma and atopy in a Caucasian population ⁵⁹ .	2003	PUBMED	Case-control/ 525 individuals	England	rs2243250; rs2070874.	For rs2243250, in C>T, the mutant allele: asthma susceptibility. For rs2070874, in C>T, the variant allele: asthma risk.
An ADAM33 polymorphism associates with progression of preschool wheeze into childhood asthma: a prospective case-control study with replication in a birth cohort study ⁶⁰ .	2015	PUBMED	Case-control/ 198 individuals	Netherlands	rs2070874; rs2243250.	For SNP rs2070874, in C>T, the variant allele: asthma susceptibility. For SNP rs2243250, in C>T, the mutant allele: asthma susceptibility.

DISCUSSION

The immune response to innocuous antigens generated in the presence of Th2-type cytokines, such as IL-4, is associated with the development of asthma. IL-4 reverses the immune response to anti-inflammatory effects, inhibits the pro-inflammatory functions of macrophages and regulates the secretion of pro-inflammatory cytokines. IL-4 initiates critical immediate allergic reactions by triggering IgE-mediated mast cell activation. IL-4 plays a key role in directing *naïve* T cells to Th2 differentiation and in exacerbating allergic inflammation by inducing the expression of VCAM-1, which recruits leukocytes and ensures their survival. Through its role in the proliferation of bronchial fibroblasts, myofibroblasts, and airway smooth muscle, this cytokine induces the airway remodeling found in asthma¹³.

Thus, the manifestation of asthma may be related to the presence/absence of polymorphisms, such as SNPs, in the IL-4 gene, in addition to other genetic, epigenetic and environmental factors, considering it to be a multifactorial disease. Variations in the regulatory sequences of genes can determine risks for the disease, causing different levels of expression, leading to an exacerbated immune and inflammatory response²⁴.

Different studies that looked for an association between single nucleotide polymorphisms (SNPs) of genes (as in the case of this study) and asthma (as well as in other diseases) had divergent results between different populations. According to some researchers, the fact may come from the “*genetic background*” of the individuals studied so far⁶¹. The “*genetic background*” corresponds to the individual’s genetic identity, which can change over the years and with exposure to environmental factors⁶²⁻⁶⁴.

In this case, 29 studies published in the literature investigating the association between IL-4 SNPs and asthma were reported and analyzed, with the majority of studies corresponding to China and the United States, both with equal contributory shares of 5 studies (17.24% each).

The IL-4 SNPs associated with asthma in the surveys found were: rs2243250, rs2070874, rs2227284, rs2243290, RP2, rs2243248, rs2243249, rs2243252, rs2243258, rs2243259, rs2243260, rs2243264, rs2243265, rs9282745, rs9282746, rs2243271, rs2243272, rs2243273, rs2243275, rs2243276, rs2243277, rs2243278, rs2243281, rs2243286, rs2243287, rs2243274, rs2243263, rs2243283.

The SNP that was most analyzed in the number of studies (22 studies, 75.86%) associating IL-4 with asthma in different populations was rs2243250, with the T allele, a mutant highlighted by susceptibility in 15 studies (51.72%): Finnish and Russian^{33,39}; Chinese^{37,50}; Portuguese³⁸; Indian⁴⁰; Taiwanese⁴¹; German⁴²; North-american^{44,54}; Filipinos⁴⁵; Italian⁵³; Pakistani⁵⁸; British⁵⁹; and Dutch population⁶⁰. In an Iraqi population, the C, wild allele conferred greater susceptibility to asthma⁵⁵. In 6 studies (20.69%) no significant associations were possible between the cited SNP and the disease in: Spanish³⁴; Japanese³⁵; Indian and Chinese⁴⁶; Chinese⁴⁸; North-american population⁵¹; Mauritius population⁵².

The rs2243250 SNP is an upstream variant (5’) of the promoter region of the gene found at residue position 589. With regard to the change that occurred in the gene in relation to the function of IL-4, there is an effect of transcriptional addition, with an increase in the binding affinity of transcription factors, leading to overexpression of IL-4 mRNA, generating a phenotype susceptible to asthma and reducing the levels of pro-inflammatory cytokines, increasing the production of IgE and the induction of overexpression of IgE receptors in airway mast cells, resulting in increased recruitment of eosinophils^{50,65,66}.

The only SNP reported in one study (3.45%) as protective for the disease was the C (wild) allele at rs2070874 from a Russian population⁵⁶. The rs2070874 SNP is an upstream variant (5’) of the promoter

region of the gene found at residue position 33. Its role in IL-4 function corresponds to the influence on mRNA stability, as well as the transcriptional efficiency of IL-4, considering that the 5' UTR (5 *prime untranslated region*) can involve many cis-acting elements^{56,65,67}.

No associations between SNP and disease were found for any population: rs22432484 in a Spanish population³⁴; rs10080170, rs10065221, rs10058157, rs2243242, rs2243247, rs2243248, rs2243250, rs2070874, rs2243251, rs734244, rs2243253, rs11479198, rs2227284, rs2243261, rs2227282, rs2243263, rs2243266, rs2243267, rs2243268, rs2243269, rs2243270, rs2243274, rs2243277, rs2243278, rs2243281, rs2243285, rs2243286, rs2243287, rs2243288, rs2243289, rs2243290 in a North-american population⁵¹.

The development of new therapeutic, interventional and preventive strategies through SNPs can be a differential for patients with a disease due to genetic mutation, since they act as genetic biomarkers for susceptible individuals and, thus, enable the implementation of precision medicine principles. In clinical practice, that is, better targeting of pharmaceutical resources based on individual characteristics. In this sense, the focus on SNPs, such as rs2243250, in the IL-4 promoter region, which affects its level of expression, may be of great interest in interventional methodologies for patients, for example, in gene therapy guided to this gene or even through anti-IL-4 drugs for asthmatics. In addition to the fact that the identification of polymorphisms in genes involved in the response pathway of inflammatory mediators, such as IL-4, can still lead to a great impasse, since multiple genes can be involved in the pathogenesis of the same disease⁶⁸.

IL-4 is one of the most studied genes for asthma, because, among other things, it causes a change in the isotype of B cells for the synthesis of IgE in the presence of an allergen⁶⁹. Current studies indicate an inconsistent benefit in asthmatic subjects when targeting IL-4 or the IL-4 α receptor (which blocks both IL-4 and IL-13 pathways) in murine and human studies^{70,71}. In contrast, Tachdjian et al, demonstrated an important role for the immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) in the cytoplasmic tail of the IL-4 α receptor in contributing to airway inflammation and airway responsiveness⁷². Thus, there are mixed results regarding the feasibility of targeting therapy for the IL-4 gene.

The limitations of the present study come up against: a) the definition of asthma adopted to frame the data and studies analyzed; b) association of gene-gene interaction of IL-4 SNPs with other genes with asthma; c) association of gene-environment interaction between IL-4 SNPs and environmental factors; d) the SNPs used for assessment in this review meet the requirement to be referenced in the National Center for Biotechnology Information (NCBI); e) for the inclusion of studies, research with the IL-4 α receptor gene, which has a great impact on the IL-4 gene, was not considered because they are different genes and SNPs; f) heterogeneity of SNPs acting as a possible bias in characteristics such as ethnicities and different ages of populations due to the phenomenon of genetic background.

CONCLUSION

To date, there are many divergent results and data on the association of SNPs and asthma. The rs2243250 SNP, which was the most studied in populations from different countries, was also the most correlated with the disease. It is considered that the pathophysiology and phenotypes of the disease need to be better related to SNPs through broader epidemiological studies of the case-control type, cohort studies, ecological studies, comparative studies, cross-sectional studies, case studies, case series and clinical trials

with subjects from different continents. It is expected that the data generated in this can be the basis for further research and it is believed that the combination of bioinformatics modeling, functional validation and integrative omics technologies (corresponding to metabolomics, genomics and proteomics) through polymorphism studies will make the clinical study of the disease more focused on a panoramic map of different individual outcomes.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest.

FUNDING

The authors did not declare.

AUTHORS' CONTRIBUTION

Design, analysis, investigation, data interpretation, methodology, validation, visualization, writing, review and editing: Marcos Jessé Abrahão Silva; Analysis, investigation, validation, data interpretation, visualization, writing, review and editing: Ellerson Oliveira Loureiro Monteiro; Data interpretation, visualization and writing: Bianca Benicio e Silva; Data interpretation, visualization, writing and editing: Debora Zoila da Conceição Martins; Supervision, design, project management, visualization, writing, review and editing: Andrei Santos Siqueira; Supervision, validation, review, writing and editing: Bárbara Brasil Santana. All authors read and approved the final version of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENT

The authors did not declare.

REFERENCES

1. Bousquet J. Global initiative for asthma (GINA) and its objectives. *Clin Exp Allergy*. 2000;30(Suppl):2-5. <https://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2222.2000.00088.x>
2. Busse WW, Lemanske RF Jr. Asthma. *New Engl J Med*. 2001;344(5):350-62. <https://dx.doi.org/10.1056/NEJM200102013440507>
3. Moore WC, Meyers DA, Wenzel SE, Teague WG, Li H, Li X et al. Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the Severe Asthma Research Program. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;181(4):315-23. <https://dx.doi.org/10.1164/rccm.200906-0896OC>
4. Hofmann AM, Abraham SN. New roles for mast cells in modulating allergic reactions and immunity against pathogens. *Curr Opin Immunol*. 2009;21(6):679-86. <https://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2009.09.007>

5. Samitas K, Delimpoura V, Zervas E, Gaga M. Anti-IgE treatment, airway inflammation and remodelling in severe allergic asthma: current knowledge and future perspectives. *Eur Respir Rev*. 2015;24(138):594-601.
<https://dx.doi.org/10.1183/16000617.00001715>
6. Nabe T, Wakamori H, Takiguchi A, Kida H, Ohya S, Mizutani N et al. Analyses of IL-33-producing cells during multiple antigen challenges in murine asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(2):AB61.
<https://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2013.12.243>
7. Broide DH, Finkelman F, Bochner BS, Rothenberg ME. Advances in mechanisms of asthma, allergy, and immunology in 2010. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(3):689-95.
<https://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2011.01.027>
8. Wang TN, Tseng HI, Kao CC, Chu YT, Chen WY, Wu PF et al. The effects of NOS1 gene on asthma and total IgE levels in Taiwanese children, and the interactions with environmental factors. *Pediatr Allergy Immunol*. 2010;21(7):1064-1071.
<https://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3038.2009.00981.x>
9. Todo-Bom A, Pinto AM. Fisiopatologia da asma grave. *Rev Port Imunoalergol*. 2006;14(Supl 2):43-8.
10. Nadler MJ, Matthews SA, Turner H, Kinet JP. Signal transduction by the high-affinity immunoglobulin E receptor Fc epsilon RI: coupling form to function. *Adv Immunol*. 2000;76:325-55.
[https://dx.doi.org/10.1016/s0065-2776\(01\)76022-1](https://dx.doi.org/10.1016/s0065-2776(01)76022-1)
11. Quirt J, Hildebrand KJ, Mazza J, Noya F, Kim H. Asthma. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2018;14(Suppl 2):50.
<https://dx.doi.org/10.1186/s13223-018-0279-0>
12. Stark JM, Tibbitt CA, Coquet JM. The metabolic requirements of Th2 cell differentiation. *Front Immunol*. 2019;10:2318.
<https://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2019.02318>
13. Gilmour J, Lavender P. Control of IL-4 expression in T helper 1 and 2 cells. *Immunology*. 2008;124(4):437-44.
<https://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.02845.x>
14. Pandey R, Parkash V, Kant S, Verma AK, Sankhwar SN, Agrawal A et al. An update on the diagnostic biomarkers for asthma. *J Family Med Prim Care*. 2021;10(3):1139-48.
https://dx.doi.org/10.4103/jfmprc.jfmprc_2037_20

15. Harms RZ, Borengasser K, Kumar V, Sarvetnick N. Anti-human interleukin(IL)-4 clone 8D4-8 cross-reacts with myosin-9 associated with apoptotic cells and should not be used for flow cytometry applications querying IL-4 expression. *Front Cell Dev Biol*. 2019;7:46.
<https://dx.doi.org/10.3389/fcell.2019.00046>
16. Renauld JC. New insights into the role of cytokines in asthma. *J Clin Pathol*. 2001;54(8):577-89.
<https://dx.doi.org/10.1136/jcp.54.8.577>
17. Yu K, Lieber MR. Current insights into the mechanism of mammalian immunoglobulin class switch recombination. *Crit Rev Biochem Mol Biology*. 2019;54(4):333-51.
<https://dx.doi.org/10.1080/10409238.2019.1659227>
18. Fleming L. Asthma exacerbation prediction: recent insights. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2018;18(2):117-23.
<https://dx.doi.org/10.1097/ACI.0000000000000428>
19. Chai R, Liu B, Qi F. The significance of the levels of IL-4, IL-31 and TLSP in patients with asthma and/or rhinitis. *Immunotherapy*. 2017;9(4):331-7.
<https://dx.doi.org/10.2217/imt-2016-0131>
20. Li P, Yang QZ, Wang W, Zhang GQ, Yang J. Increased IL-4- and IL-17-producing CD8⁺ cells are related to decreased CD39⁺ CD4⁺ Foxp3⁺ cells in allergic asthma. *J Asthma*. 2018;55(1):8-14.
<https://dx.doi.org/10.1080/02770903.2017.1310225>
21. Liu Y, Gao X, Miao Y, Wang Y, Wang H, Cheng Z et al. NLRP3 regulates macrophage M2 polarization through up-regulation of IL-4 in asthma. *Biochem J*. 2018;475(12):1995-2008.
<https://dx.doi.org/10.1042/BCJ20180086>
22. Ladjemi MZ, Gras D, Dupasquier S, Detry B, Lecocq M, Garulli C et al. Bronchial epithelial IgA secretion is impaired in asthma. Role of IL-4/IL-13. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018;197(11):1396-1409.
<https://dx.doi.org/10.1164/rccm.201703-0561OC>
23. Xia F, Deng C, Jiang Y, Qu Y, Deng J, Cai Z et al. IL4 (interleukin 4) induces autophagy in B cells leading to exacerbated asthma. *Autophagy*. 2018;14(3):450-64.
<https://dx.doi.org/10.1080/15548627.2017.1421884>
24. Basehore MJ, Howard TD, Lange LA, Moore WC, Hawkins GA, Marshik PL et al. A comprehensive evaluation of IL4 variants in ethnically diverse populations: association of total serum IgE levels and asthma in white subjects. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114(1):80-7.
<https://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2004.05.035>

25. Thomsen SF. Genetics of asthma: an introduction for the clinician. *Eur Clin Respir J*. 2015;2:24643.
<https://dx.doi.org/10.3402/ecrj.v2.24643>
26. O’Rielly DD, Rahman P. Genetic epidemiology of complex phenotypes. *Methods Mol Biol*. 2021;2249:335-67.
https://dx.doi.org/10.1007/978-1-0716-1138-8_19
27. Reis LM, Rodrigues FW, Silva RE da, Taleb AC, Ávila MP de. Relation analysis of the occurrence of single nucleotide polymorphism of the DOCK9 gene in keratoconus. *Rev Bras Oftalmol*. 2016;75:223-27.
<https://dx.doi.org/10.5935/0034-7280.20160046>
28. Rother ET. Revisão sistemática X revisão narrativa. *Acta Paul Enferm*. 2007;20(2):v-vi.
<https://dx.doi.org/10.1590/S0103-21002007000200001>
29. Santos CMC, Pimenta CAM, Nobre MRC. The PICO strategy for the research question construction and evidence search. *Rev Lat Am Enferm*. 2007;15(3):508-11.
<https://dx.doi.org/10.1590/S0104-11692007000300023>
30. Aguayo-Albasini JL, Flores-Pastor B, Soria-Aledo V. Sistema GRADE: clasificación de la calidad de la evidencia y graduación de la fuerza de la recomendación. *Cir Esp*. 2014;92(2):82-8.
<https://dx.doi.org/10.1016/j.ciresp.2013.08.002>
31. Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J, Mulrow C, Gøtzsche PC, Ioannidis JPA et al. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate healthcare interventions: explanation and elaboration. *BMJ*. 2009;339:b2700.
<https://dx.doi.org/10.1136/bmj.b2700>
32. Ambrocio-Ortiz E, Galicia-Negrete G, Pérez-Rubio G, Escobar-Morales AJ, Abarca-Rojano E, Del Angel-Pablo AD et al. Single nucleotide and copy-number variants in IL4 and IL13 are not associated with asthma susceptibility or inflammatory markers: a case-control study in a Mexican-Mestizo population. *Diagnostics (Basel)*. 2020;10(5):273.
<https://dx.doi.org/10.3390/diagnostics10050273>
33. Zhang G, Khoo SK, Mäkelä MJ, Candelaria P, Hayden CM, von Hertzen L et al. Maternal genetic variants of IL4/IL13 pathway genes on IgE with “Western or Eastern Environments/Lifestyles”. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2014;6(4):350-6.
<https://dx.doi.org/10.4168/aaair.2014.6.4.350>
34. Padrón-Morales J, Sanz C, Dávila I, Muñoz-Bellido F, Lorente F, Isidoro-García M. Polymorphisms of the IL12B, IL1B, and TNFA genes and susceptibility to asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2013;23(7):487-94.

35. Miyake Y, Tanaka K, Arakawa M. Relationship between polymorphisms in IL4 and asthma in Japanese women: the Kyushu Okinawa Maternal and Child Health Study. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2013;23(4):242-7.
36. Isidoro-García M, Dávila I, Laffond E, Moreno E, Lorente F, González-Sarmiento R. Interleukin-4 (IL4) and Interleukin-4 receptor (IL4RA) polymorphisms in asthma: a case control study. *Clin Mol Allergy*. 2005;3:15.
<https://dx.doi.org/10.1186/1476-7961-3-15>
37. Bai S, Hua L, Wang X, Liu Q, Bao Y. Association of a 4-locus gene model including IL13, IL4, FCER1B, and ADRB2 with the asthma predictive index and atopy in Chinese Han Children. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2018;28(6):407-13.
<https://dx.doi.org/10.18176/jiaci.0272>
38. Berenguer AG, Fernandes AT, Oliveira S, Rodrigues M, Ornelas P, Romeira D et al. Genetic polymorphisms and asthma: findings from a case-control study in the Madeira island population. *Bio Res*. 2014;47(1):40.
<https://dx.doi.org/10.1186/0717-6287-47-40>
39. Smolnikova MV, Smirnova SV, Freidin MB, Tyutina OS. Immunological parameters and gene polymorphisms (C-590T IL4, C-597A IL10) in severe bronchial asthma in children from the Krasnoyarsk region, West Siberia. *Int J Circumpolar Health*. 2013;72.
<https://dx.doi.org/10.3402/ijch.v72i0.21159>
40. Davoodi P, Mahesh PA, Holla AD, Ramachandra NB. A preliminary study on the association of single nucleotide polymorphisms of interleukin 4 (IL4), IL13, IL4 receptor alpha (IL4Ra) & Toll-like receptor 4 (TLR4) genes with asthma in Indian adults. *Indian J Med Res*. 2015;142(6):675-80.
<https://dx.doi.org/10.4103/0971-5916.174551>
41. Chiang CH, Lin MW, Chung MY, Yang UC. The association between the IL-4, ADR β 2 and ADAM 33 gene polymorphisms and asthma in the Taiwanese population. *J Chin Med Assoc*. 2012;75(12):635-43.
<https://dx.doi.org/10.1016/j.jcma.2012.08.012>
42. Michel S, Liang L, Depner M, Klopp N, Ruether A, Kumar A et al. Unifying candidate gene and GWAS Approaches in Asthma. *PloS One*. 2010;5(11):e13894.
<https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0013894>
43. Li X, Hawkins GA, Moore WC, Hastie AT, Ampleford EJ, Milosevic J et al. Expression of asthma susceptibility genes in bronchial epithelial cells and bronchial alveolar lavage in the Severe Asthma Research Program (SARP) cohort. *J Asthma*. 2016;53(8):775-82.
<https://dx.doi.org/10.3109/02770903.2016.1158268>

44. Donfack J, Schneider DH, Tan Z, Kurz T, Dubchak I, Frazer KA et al. Variation in conserved non-coding sequences on chromosome 5q and susceptibility to asthma and atopy. *Respir Res*. 2005;6(1):145. <https://dx.doi.org/10.1186/1465-9921-6-145>
45. de Guia RM, Ramos JDA. The -590C/TIL4 single-nucleotide polymorphism as a genetic factor of atopic allergy. *Int J Mol Epidemiol Genet*. 2010;1(1):67-73.
46. Ramphul K, Lv J, Hua L, Liu QH, Fang DZ, Ji RX et al. Single nucleotide polymorphisms predisposing to asthma in children of Mauritian Indian and Chinese Han ethnicity. *Braz J Med Biol Res*. 2014;47(5):394-7. <https://dx.doi.org/10.1590/1414-431X20143751>
47. Yang XX, Li FX, Wu YS, Wu D, Tan JY, Li M. Association of TGF-beta1, IL-4 and IL-13 gene polymorphisms with asthma in a Chinese population. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2011;29(3):273-7.
48. Li H, Xiaoyan D, Quanhua L, Jie L, Yixiao B. Single-nucleotide polymorphisms in genes predisposing to asthma in children of Chinese Han nationality. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2009;19(5):391-5.
49. Battle NC, Choudhry S, Tsai HJ, Eng C, Kumar G, Beckman KB et al. Ethnicity-specific gene-gene interaction between IL-13 and IL-4Ralpha among African Americans with asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175(9):881-7. <https://dx.doi.org/10.1164/rccm.200607-992OC>
50. Hua L, Liu Q, Li J, Zuo X, Chen Q, Li J et al. Gene-gene and gene-environment interactions on cord blood total IgE in Chinese Han children. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2021;17(1):69. <https://dx.doi.org/10.1186/s13223-021-00571-0>
51. Haller G, Torgerson DG, Ober C, Thompson EE. Sequencing the IL4 locus in African Americans implicates rare noncoding variants in asthma susceptibility. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(6):1204-9.e9. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.013>
52. Ramphul K, Hua L, Bao YX, Li JY, Liu QH, Ji RX et al. Identification of IL13 C1923T as a single nucleotide polymorphism for asthma in children from Mauritius. *Pediatr Allergy Immunol Pulmonol*. 2015;28(2):92-5. <https://dx.doi.org/10.1089/ped.2014.0464>
53. Ricciardolo FL, Sorbello V, Silvestri M, Giacomelli M, Debenedetti VM, Malerba M et al. TNF-alpha, IL-4R-alpha and IL-4 polymorphisms in mild to severe asthma from Italian Caucasians. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2013;26(1):75-84. <https://dx.doi.org/10.1177/039463201302600107>

54. Baye TM, Butsch Kovacic M, Biagini Myers JM, Martin LJ, Lindsey M, Patterson TL et al. Differences in candidate gene association between European ancestry and African American asthmatic children. *PLoS One*. 2011;6(2):e16522.
<https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0016522>
55. Hussein IA, Jaber SH. Genotyping of IL-4 -590 (C>T) gene in Iraqi asthma patients. *Dis Markers*. 2017;2017:5806236.
<https://dx.doi.org/10.1155/2017/5806236>
56. Dmitrieva-Zdorova EV, Voronko OE, Latysheva EA, Storozhakov GI, Archakov AI. Analysis of polymorphisms in T(H)2-associated genes in Russian patients with atopic bronchial asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2012;22(2):126-32.
57. Hur GY, Ye YM, Koh DH, Kim SH, Park HS. IL-4 receptor α polymorphisms may be a susceptible factor for work-related respiratory symptoms in Bakery workers. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2013;5(6):371-6.
<https://dx.doi.org/10.4168/aaair.2013.5.6.371>
58. Micheal S, Minhas K, Ishaque M, Ahmed F, Ahmed A. IL-4 gene polymorphisms and their association with atopic asthma and allergic rhinitis in Pakistani patients. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2013;23(2):107-11.
59. Beghé B, Barton S, Rorke S, Peng Q, Sayers I, Gaunt T et al. Polymorphisms in the interleukin-4 and interleukin-4 receptor alpha chain genes confer susceptibility to asthma and atopy in a Caucasian population. *Clin Exp Allergy*. 2003;33(8):1111-7.
<https://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2222.2003.01731.x>
60. Klaassen EM, Penders J, Jöbsis Q, van de Kant KD, Thijs C, Mommers M et al. An ADAM33 polymorphism associates with progression of preschool wheeze into childhood asthma: a prospective case-control study with replication in a birth cohort study. *PLoS One*. 2015;10(3):e0119349.
<https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0119349>
61. Ferwerda B, McCall MB, Verheijen K, Kullberg BJ, van der Ven AJ, Van der Meer JW et al. Functional consequences of toll-like receptor 4 polymorphisms. *Mol Med*. 2008;14(5-6):346-52.
<https://dx.doi.org/10.2119/2007-00135.Ferwerda>
62. Doetschman T. Influence of genetic background on genetically engineered mouse phenotypes. *Methods Mol Biol*. 2009;530:423-33.
https://dx.doi.org/10.1007/978-1-59745-471-1_23
63. Johnson KR, Zheng QY, Noben-Trauth K. Strain background effects and genetic modifiers of hearing in mice. *Brain Res*. 2006;1091(1):79-88.
<https://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2006.02.021>

64. Sigmund CD. Viewpoint: are studies in genetically altered mice out of control? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(6):1425-9.
<https://dx.doi.org/10.1161/01.ATV.20.6.1425>
65. Padrón-Morales J, García-Solaesa V, Isidoro-García M, Hernández-Hernández L, García-Sánchez A, Hincapié-López G et al. Implications of cytokine genes in allergic asthma. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2014;42(6):603-8.
<https://dx.doi.org/10.1016/j.aller.2013.11.006>
66. Imani D, Eslami MM, Anani-Sarab G, Aliyu M, Razi B, Rezaei R. Interleukin-4 gene polymorphism (C33T) and the risk of the asthma: a meta-analysis based on 24 publications. *BMC Med Genet*. 2020;21(1):232.
<https://dx.doi.org/10.1186/s12881-020-01169-w>
67. Kousha A, Mahdavi Gorabi A, Forouzesh M, Hosseini M, Alexander M, Imani D et al. Interleukin 4 gene polymorphism (-589C/T) and the risk of asthma: a meta-analysis and met-regression based on 55 studies. *BMC Immunol*. 2020;21(1):55.
<https://dx.doi.org/10.1186/s12865-020-00384-7>
68. Mukherjee S, Huda S, Sinha Babu SP. Toll-like receptor polymorphism in host immune response to infectious diseases: a review. *Scand J Immunol*. 2019;90(1):e12771.
<https://dx.doi.org/10.1111/sji.12771>
69. Vercelli D. Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(3):169-82.
<https://dx.doi.org/10.1038/nri2257>
70. Hassan M, Jo T, Risse PA, Tolloczko B, Lemièrre C, Olivenstein R et al. Airway smooth muscle remodeling is a dynamic process in severe long-standing asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(5):1037-1045.e3.
<https://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2010.02.031>
71. Kirstein F, Horsnell WG, Kuperman DA, Huang X, Erle DJ, Lopata AL et al. Expression of IL-4 receptor alpha on smooth muscle cells is not necessary for development of experimental allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126(2):347-54.
<https://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2010.04.028>
72. Tachdjian R, Al Khatib S, Schwinglshackl A, Kim HS, Chen A, Blasioli J et al. In vivo regulation of the allergic response by the IL-4 receptor alpha chain immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(5):1128-1136.e8.
<https://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2010.01.054>



Avaliação das rotulagens de alimentos frente à legislação vigente e do uso de alegações não regulamentadas

Evaluation of food labeling before legislation and the use of non-regimented claims

Valdeir de Oliveira Guimarães¹ , Hatanne Carla Fialho Moraes e Lima² , Allan Robledo Fialho e Moraes^{1*} 

¹ Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Viçosa – Campus Rio Paranaíba, Rio Paranaíba, MG, Brasil.

² Divisão de Saúde, Pró-Reitoria de Assuntos Comunitários, Universidade Federal de Viçosa – Campus Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

*Autor de correspondência/Corresponding author: allan.moraes@ufv.br

Recebido/Received: 11.06.2021 – Aceito/Accepted: 06.07.2022

RESUMO

Este estudo objetivou analisar a conformidade de 56 rótulos de produtos alimentícios divididos em 14 categorias em relação às legislações gerais e específicas de rotulagem de alimentos vigentes até o momento de sua publicação, bem como apresentar abordagens com relação à necessidade da constante melhoria e aperfeiçoamento da legislação. Constatou-se um total de 158 não conformidades e que 55,3% dos produtos avaliados apresentavam pelo menos uma não conformidade em sua rotulagem. Biscoitos e produtos artesanais foram as categorias que mais apresentaram rótulos com pelo menos uma não conformidade. Entre as informações obrigatórias, as referentes ao lote, à data de fabricação, ao prazo de validade e à conservação foram as mais recorrentes entre as não conformidades. Verificou-se também que algumas expressões como “produto caseiro”, “vegano”, “vegetariano”, “base vegetal”, entre outras, requerem melhor regulamentação ou legislação específica, portanto, não puderam ser avaliadas em relação à conformidade. Os motivos para tal cenário podem ser a aplicação incorreta da legislação e o uso de estratégias de *marketing* com o objetivo de atender a desejos e expectativas dos consumidores. Portanto, faz-se necessária uma intensificação da fiscalização, assim como maior celeridade na regulamentação de alegações específicas por parte dos órgãos responsáveis.

Palavras-chave. Rotulagem de Alimentos, Qualidade de Produtos para o Consumidor, Legislação de Alimentos.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the suitability of the labeling of 56 industrialized and packaged food products in the absence of the consumer, divided into 14 categories, before general and specific legislations on food labeling was in force at the time of its publication, as well as to present an approach regarding the need for constant improvement of legislation. It was found that 55.3% of the products presented at least one non-compliance in their labeling, and that there were a total of 159 non-compliances. Cookies and products with artisanal claims were the categories that most often presented products with at least one non-conformity. Among the mandatory information, batch, production date, expiration date, and conservation conditions were the ones that most presented non-conformities. It was also found that some claims, such as vegan, vegetarian, homemade, and plant-based, among others, lack of specific legislation, and therefore could not be assessed whether it was in compliance. This scenario shows misapplication of current legislation by food industry, as well as marketing strategies aiming to meet consumer's seek. Thus, it is necessary to intensify inspection and also speed up the requirement for specific claims for the responsible agencies, mainly those related to health issues.

Keywords. Food Labeling, Consumer Product Safety, Legislation, Food.

INTRODUÇÃO

De acordo com a Associação Brasileira da Indústria de Alimentos¹ (ABIA), 58% de toda a produção agropecuária brasileira é processada, sendo a indústria de processamento de alimentos a maior do Brasil em valor de produção, com um faturamento que corresponde a 10,6% do total do Produto Interno Bruto (PIB) do nosso país. Há, atualmente, aproximadamente 37,7 mil empresas no setor, que geram 1,68 milhão de postos de trabalho diretos e formais, números que mostram o tamanho e a importância dessa indústria para o Brasil.

Toda essa produção objetiva atender a um mercado consumidor cada vez mais exigente, que busca por produtos alimentícios convenientes e/ou de fácil preparo, saudáveis, com menores quantidades de aditivos, seguros e ambientalmente amigáveis, ou até mesmo que atendam a uma demanda nutricional específica, como isentos de glúten, açúcar, lactose ou outro nutriente e/ou ingrediente específico. Para tanto, o rótulo se torna ferramenta fundamental de comunicação entre indústria e consumidor.

Nesse contexto, de acordo com a segunda edição do Guia Alimentar para a População Brasileira², a promoção da alimentação adequada e saudável compreende um conjunto de estratégias que objetivam proporcionar aos indivíduos e coletividades a realização de práticas alimentares apropriadas e deve ser implementada pelos gestores e profissionais do Sistema Único de Saúde (SUS) em parceria com atores de outros setores, incluindo os produtores e a indústria de alimentos. O documento reporta que a informação adequada é um instrumento importante para a escolha dos alimentos, orientando os consumidores a consultarem informações sobre nutrientes e a lista de ingredientes, que deve constar dos rótulos de alimentos embalados que possuem mais de um ingrediente. De modo que informações incorretamente colocadas ou ausentes nos rótulos são consideradas um obstáculo para adoção de uma alimentação saudável.

Ainda de acordo com o Guia, diversas estratégias são utilizadas pelas indústrias de alimentos na divulgação dos seus produtos. Entre elas, as embalagens atraentes são alguns dos exemplos mais frequentes dos mecanismos adotados para a sedução e convencimento dos consumidores².

Segundo a Resolução RDC nº 259/2002³ da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), rótulo é definido como “toda inscrição, legenda, imagem ou toda matéria descritiva ou gráfica, escrita, impressa, estampada, gravada, gravada em relevo ou litografada ou colada sobre a embalagem do alimento” e deve ser aplicado a “todo alimento que seja comercializado, qualquer que seja sua origem, embalado na ausência do cliente, e pronto para oferta ao consumidor”. Ainda de acordo com essa resolução, a rotulagem objetiva o constante aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de alimentos, visando à proteção à saúde da população, bem como compatibilizar a legislação nacional com base nos instrumentos harmonizados no Mercosul relacionados à rotulagem de alimentos embalados.

A legislação relacionada à rotulagem de alimentos no Brasil, assim como toda a legislação de alimentos, pode ser considerada uma das mais avançadas do mundo. Contudo, é notória a dificuldade em cumprir com todos os seus requisitos e obrigações. Além da ANVISA e do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que são os dois principais órgãos regulamentadores e, portanto, fiscalizadores, há também o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro), o Ministério da Justiça (MJ), Portarias Interministeriais e leis específicas ou gerais estabelecidas pelo Congresso Nacional, com as quais as empresas e seus produtos devem estar de acordo.

Apesar de todo esse amparo legal, ainda há muito o que evoluir com relação à rotulagem de alimentos no Brasil. De um lado, pesquisas e estudos demonstram que boa parte dos consumidores não lê, não

compreende satisfatoriamente, e até mesmo não confia nas informações declaradas nos rótulos dos produtos alimentícios. Por outro lado, devido à complexidade da legislação, falta de conhecimento e má-fé, as empresas não apresentam as informações de rotulagem de forma clara ou correta, dificultando sua interpretação⁴⁻⁶.

Embora haja trabalhos na literatura científica a respeito do tema, estes apresentam-se desatualizados, uma vez que tem havido a publicação de grande número de normas nos últimos anos. Dessa forma, este estudo teve como objetivo analisar a conformidade dos rótulos de produtos alimentícios industrializados frente à legislação de rotulagem de alimentos vigente até o momento da publicação deste artigo. Além disso, foram feitas abordagens com relação à necessidade da constante melhoria e aperfeiçoamento da legislação, que não tem acompanhado a demanda da indústria alimentícia e dos consumidores, deixando lacunas que podem ser aproveitadas de forma duvidosa ou até mesmo de má-fé por parte das indústrias de alimentos.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho consiste em um estudo observacional descritivo. Para a realização deste estudo, foram predefinidas 14 categorias de produtos alimentícios industrializados e embalados na ausência do consumidor: picolé, chocolate, requeijão, biscoito, hambúrguer, alimentos para fins especiais, produtos veganos, produtos artesanais, néctar de frutas, barra de cereais, pasta de amendoim, pão de forma, polvilho e salgadinho tipo “chips”. Para cada categoria de produto foram escolhidas, de forma aleatória, 4 marcas comercializadas em supermercados da região do Alto Paranaíba e de Viçosa, MG, no período de agosto de 2020 a março de 2021, totalizando 56 rótulos avaliados.

Para a verificação da conformidade ou não dos rótulos dos produtos, foram utilizadas as legislações gerais de rotulagem e as específicas para cada categoria de produto avaliada, quando existente, a saber: RDC nº 259/2002 (ANVISA); Portaria nº 13/1998 (ANVISA); Informe Técnico nº 26/2007 (ANVISA); Instrução Normativa nº 20/2000 (MAPA); Portaria nº 146/1996 (MAPA); RDC nº 54/2012 (ANVISA); Portaria nº 157/2002 (Inmetro); Portaria nº 1969/2020 (IMA); Instrução Normativa nº 22/2005 (MAPA); Informe Técnico nº 70/2016 (ANVISA); RDC nº 360/2003 (ANVISA); Lei nº 10674/2003; RDC nº 26/2015 (ANVISA); RDC nº 136/2017 (ANVISA); Decreto nº 4690/2003; RDC nº 21/2003 (ANVISA); Decreto nº 10831/2003; Decreto nº 6323/2007; e Decreto nº 9918/2019.

Para a padronização das análises, foi preparado um *check list* com todas as informações obrigatórias e opcionais de cada produto, de forma a avaliar a presença ou não das informações. Para as informações presentes, verificou-se a concordância ou discordância em relação à legislação. Se a informação declarada estivesse em desacordo, adicionalmente, eram identificadas as não conformidades.

Os resultados são apresentados por meio de estatística descritiva, comparados e discutidos com relação à legislação e também com outros estudos e pesquisas, quando pertinente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nota-se, pela **Tabela 1**, que houve um total de 158 não conformidades e que 31 (55,3%) dos 56 produtos avaliados apresentaram pelo menos uma não conformidade em sua rotulagem. Essa porcentagem é inferior à observada por Smith e Almeida-Muradian⁷, Mello et al⁸ e Mallet et al⁹, que relataram em

seus trabalhos que 80,8% (42/52), 90% (54/60) e 95% (76/80) dos rótulos avaliados, respectivamente, apresentaram no mínimo um tipo de não conformidade frente à legislação vigente.

Tabela 1. Número de produtos com pelo menos uma não conformidade e número total de não conformidades por categoria de produto

Categoria de produtos	Número de produtos com pelo menos uma não conformidade	Número total de não conformidades
Picolé	3 (9,6%)	24 (15,2%)
Chocolate	2 (6,5%)	8 (5,0%)
Requeijão	2 (6,5%)	2 (1,3%)
Biscoito	4 (12,9%)	17 (10,7%)
Hambúrguer	2 (6,5%)	11 (7,0%)
Alimentos para fins especiais	1 (3,2%)	3 (1,9%)
Vegano	3 (9,6%)	20 (12,6%)
Artesanal	4 (12,9%)	38 (24,0%)
Néctar de frutas	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Barra de cereais	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Pasta de amendoim	3 (9,6%)	8 (5,0%)
Pão de forma	3 (9,6%)	13 (8,2%)
Polvilho	3 (9,6%)	6 (3,8%)
Salgadinho tipo “chips”	1 (3,2%)	8 (5,0%)
TOTAL	31	158 (100%)

Biscoitos e produtos artesanais foram as categorias que mais apresentaram rótulos com pelo menos uma não conformidade, de forma que todos os 4 produtos avaliados dessas duas categorias continham pelo menos uma não conformidade. Resultados semelhantes para a categoria de biscoitos também foram relatados por Smith e Almeida-Muradian⁷.

A categoria de produtos artesanais foi a que mais apresentou irregularidades, totalizando 38 (24,0%) não conformidades. A outra categoria que mais apresentou irregularidades foi a do picolé, com 24 (15,2%). Resultados similares foram relatados por Mello et al⁸, que observaram que essa categoria pertencia às que mais apresentaram irregularidades em seu estudo.

Apenas duas categorias de produtos (néctar de frutas e barra de cereais) não apresentaram nenhum tipo de não conformidade na rotulagem para os quatro produtos avaliados.

A **Tabela 2** apresenta o número de não conformidades por tipo de informação presente no rótulo para cada categoria. As declarações de lote, data de fabricação, prazo de validade e conservação dos produtos foram as mais recorrentes entre as não conformidades, enquanto a declaração de transgênicos foi a que menos apresentou não conformidades (apenas um produto). Esses resultados divergem de Smith e Almeida-Muradian⁷, que observaram que o tipo de irregularidade mais comum foi em relação à tabela nutricional. Por outro lado, em estudo realizado por Mello et al⁸, o item que apresentou maior número de

inadequações foi o que diz respeito à expressão “traços de leite”, enquanto o prazo de validade foi o item que obteve menor índice de inadequações.

Tabela 2. Número de não conformidades por tipo de informação presente no rótulo em cada categoria de produto alimentício

Declaração	Categorias com não conformidades (número de produtos/porcentagem)
Denominação de venda	Picolé (1); biscoito (1); hambúrguer (2); vegano (2); artesanal (2); pão de forma (1); salgadinho tipo “chips” (1) (Total = 10 / 17,8%)
Conteúdo líquido	Biscoito (1) (Total = 1 / 1,8%)
Identificação de origem	Picolé (1); biscoito (1); artesanal (2); pão de forma (1), salgadinho tipo “chips” (1) (Total = 6 / 10,7%)
Lote / data de fabricação / prazo de validade / conservação	Picolé (2); chocolate (1); requeijão (1); biscoito (4); hambúrguer (2); vegano (2); artesanal (4); pasta de amendoim (3) pão de forma (2); polvilho (2); salgadinho tipo “chips” (1) (Total = 24 / 42,8%)
Lista de ingredientes / aditivos	Picolé (2); chocolate (1); biscoito (2); hambúrguer (1); vegano (3); artesanal (3); pasta de amendoim (1); pão de forma (2); salgadinho tipo “chips” (1) (Total = 16 / 28,6%)
Facultativa	Picolé (1); vegano (2); artesanal (1); pão de forma (1) (Total = 6 / 10,7%)
Informação nutricional	Picolé (2); requeijão (1); biscoito (3); vegano (2); artesanal (3); pasta de amendoim (1); pão de forma (2); polvilho (1); salgadinho tipo “chips” (1) (Total = 16 / 28,5%)
Glúten / alergênicos / lactose	Picolé (2); biscoito (1); artesanal (2); pasta de amendoim (1); polvilho (1) (Total = 7 / 12,5%)
Alergênicos	Picolé (2); vegano (1); artesanal (3); pasta de amendoim (1); pão de forma (2) (Total = 9 / 16,1%)
Lactose	Picolé (2); chocolate (1); artesanal (2); pasta de amendoim (1) (Total = 6 / 10,7%)
Transgênicos	Vegano (1) (Total = 1 / 1,8%)
Casos particulares	Artesanal (4) (Total = 4 / 7,2%)

Denominação de venda

De acordo com a RDC nº 259/2002³, denominação de venda é definida como “nome específico e não genérico que indica a verdadeira natureza e as características do alimento”. Ainda de acordo com essa RDC, a denominação de venda é fixada no Regulamento Técnico (RT) específico que estabelece os padrões de identidade e qualidade inerentes ao produto (PIQ). Em se tratando de alimentos para fins especiais¹⁰, estes devem acrescentar, após a denominação de venda, a finalidade à qual o alimento se destina. Além disso, os produtos que tiverem, em sua composição, aromatizante natural, artificial ou idêntico ao natural, com a finalidade de definir/conferir sabor ao alimento, devem ter adicionadas ao seu painel principal as expressões “sabor...”, “sabor artificial de...” e “sabor...”, respectivamente¹¹.

Como não são todas as categorias de produtos que possuem, atualmente, PIQ, a análise de conformidade para essa informação foi feita apenas quando aplicável, isto é, para os produtos que possuíam denominação de venda regulamentada. Dos 56 produtos avaliados, 10 (17,8%) apresentaram não conformidades com relação à denominação de venda. As categorias de produtos que mais apresentaram esse tipo de não conformidade foram hambúrguer, produtos veganos e artesanais (2 de cada categoria). Em uma marca de hambúrguer, não havia a identificação do recheio do produto na denominação de venda, enquanto em outra marca a declaração sobre o tipo de carne que compunha o produto estava em desacordo com a legislação específica¹².

No caso dos produtos veganos, duas marcas de produtos utilizaram a denominação de venda de alimentos que possuem PIQ e que são de origem animal (hambúrguer)¹². Logo, não poderiam ser considerados como produtos veganos.

Para os produtos artesanais, não havia a declaração da denominação de venda, embora, de acordo com RTIQ específico, essa informação seja obrigatória¹³.

Uma marca de picolé não informava a presença de aroma artificial. Para pão de forma, uma marca utilizou o termo “leve” em sua denominação de venda, mesmo não cumprindo com a redução exigida do nutriente específico, de acordo com o estabelecido pela legislação para utilização desse termo¹⁴.

Consideram-se essas inadequações importantes potenciais fontes de erros de interpretação e de escolhas alimentares por parte dos consumidores.

Conteúdo líquido

De acordo com a RDC nº 259/2002³, o conteúdo líquido dos produtos alimentícios deve ser apresentado conforme estabelecido em regulamentos técnicos específicos. Dessa forma, segundo a Portaria nº 157/2002¹⁵ do Inmetro, “Conteúdo Nominal ou Conteúdo Líquido (Qn) é a quantidade do produto declarada na rotulagem da embalagem, excluindo a mesma e qualquer outro objeto acondicionado com esse produto” e deve ser declarado na vista principal, ou seja, na “área visível em condições usuais de exposição onde estão escritas em sua forma mais relevante a denominação de venda, a marca e/ou o logotipo se houver”, sendo obrigatório para os alimentos embalados e medidos sem a presença do consumidor e em condições de comercialização.

Apenas um produto da categoria de biscoitos continha uma irregularidade em relação a esse tipo de informação, pois apresentou o conteúdo líquido em formato numérico e a unidade de medida de massa seguida pela expressão “peso”, não prevista. Destaca-se que está previsto apenas o uso do número e da unidade de medida de massa, sem ser necessário utilizar qualquer expressão. Contudo, caso seja feita a opção pela utilização de alguma expressão adicional, esta deve ser escolhida entre as expressões previstas. Todas as outras categorias apresentaram de forma correta o conteúdo líquido em seus rótulos.

Identificação de origem

A identificação de origem deve indicar “o nome (razão social) do fabricante ou produtor ou fracionador ou titular (proprietário) da marca; endereço completo; país de origem e município; número de registro ou código de identificação do estabelecimento fabricante junto ao órgão competente”. Além disso, “para identificar a origem deve ser utilizada uma das seguintes expressões: ‘fabricado em..’, ‘produto..’ ou ‘indústria..’”³.

Dos 56 produtos avaliados, 6 (10,7%) apresentaram não conformidades com relação à identificação de origem. Porcentagens superiores são descritos por Mallet et al⁹, que observaram em seu estudo que 84% dos produtos avaliados continham informações inadequadas com relação à sua identificação, o que, de acordo com esses autores, caracteriza fraude ou desconhecimento por parte dos produtores frente ao Código de Defesa do Consumidor (CDC). Contrariamente, Yamashita e Carrijo¹⁶ observaram que 100% dos produtos avaliados (26 rótulos de patês) estavam de acordo com as exigências legais de declaração da identificação de origem.

As categorias que apresentaram pelo menos um produto com a identificação de origem em não conformidade, isto é, de forma ausente ou incompleta, foram: picolé, biscoito, produtos artesanais, pão de forma e salgadinho tipo “chips”. A ausência da declaração do país de origem foi a não conformidade mais comum. Destaca-se a categoria dos produtos artesanais; de acordo com PIQ específico para queijos artesanais¹⁷, é necessário também indicar a microrregião produtora, informação ausente em um dos produtos.

A relativa padronização dos padrões alimentares provocada pela globalização, bem como as incertezas relacionadas à procedência dos alimentos, estimulou a demanda por produtos diferenciados e cuja autenticidade e qualidade possam ser garantidas pela origem. Essa demanda gera valorização de produtos artesanais, referenciados pelos aspectos geográficos ou pelo modo de produção tradicional, agregando valor aos produtos e alocando-os em nichos específicos de mercado¹⁸, além de promover o desenvolvimento regional e a valorização dos patrimônios culturais alimentares. Ao mesmo tempo, o sistema de proteção por indicação geográfica é um importante instrumento de fortalecimento do segmento de queijos artesanais¹⁹. Entretanto, a falta de informações ou declarações incorretas nos rótulos pode comprometer os objetivos do segmento dos produtos artesanais, bem como facilitar fraudes.

Identificação do lote, data de fabricação, prazo de validade e modo de conservação

Lote “é o conjunto de produtos de um mesmo tipo, processados pelo mesmo fabricante ou fracionador, em um espaço de tempo determinado, sob condições essencialmente iguais”. Para a indicação do lote, pode ser utilizado um código-chave precedido da letra “L”, que deve estar à disposição da autoridade competente e constar da documentação comercial quando ocorrer o intercâmbio entre os países, ou a data de fabricação, embalagem ou de prazo de validade, sempre que a(s) mesma(s) indique(m), pelo menos, o dia e o mês ou o mês e o ano (nessa ordem)³.

Logo, a princípio, de acordo com a RDC nº 259/2002³, a apresentação da data de fabricação não é obrigatória. Porém, caso o fabricante queira apresentá-la, essa informação deve ser feita seguindo-se os critérios de formatação especificados.

O prazo de validade deve constar de pelo menos: o dia e o mês para produtos que tenham prazo de validade não superior a três meses; e o mês e o ano para produtos que tenham prazo de validade superior a três meses. Se o mês de vencimento for dezembro, basta indicar o ano, com a expressão “fim de...” (ano); o prazo de validade deve ser declarado por meio de uma das seguintes expressões: “consumir antes de...”, “válido até...”, “validade...”, “val:...”, “vence...”, “vencimento...”, “vto:...”, “venc:...”, “consumir preferencialmente antes de...”³.

Foi observado que as informações sobre lote, data de fabricação, prazo de validade e conservação antes e após ser aberto (quando necessário) foram as que mais se apresentaram de forma irregular, totalizando 24 (42,8%) produtos em não conformidade.

As principais não conformidades foram a ausência dessas informações ou a forma inadequada de apresentação, como em áreas de difícil leitura (área de selagem) ou tintas apagadas. Para a categoria de produtos artesanais, nenhum dos produtos apresentava lote (0%) e apenas um dos quatro (25%) apresentava data de fabricação.

Apenas os produtos pertencentes às categorias de alimentos para fins especiais, néctar de frutas, barra de cereais, pasta de amendoim e pão de forma não apresentaram irregularidades com relação à apresentação do lote, ou data de fabricação. Essas categorias e a categoria de polvilho não apresentaram irregularidades em relação à apresentação do prazo de validade.

A irregularidade principal para essas declarações foi novamente a falta de legibilidade. Além disso, houve um produto que apresentou duas datas de validade diferentes. Considerando que se trata de informações que estão diretamente relacionadas à segurança no consumo dos produtos, entende-se que essa é uma realidade preocupante.

Alguns produtos devem identificar também a forma ou o modo de conservação após abertos. Foi verificado que em algumas categorias, como chocolates, biscoitos, produtos veganos, produtos artesanais, pasta de amendoim, polvilho e salgadinho tipo “chips”, os rótulos dos produtos não apresentavam essa informação ou isso foi feito de forma inadequada. Resultados similares foram relatados por Yamashita e Corrijo¹⁶ e Mello et al⁸, segundo os quais 30,8% e 8,3%, respectivamente, dos produtos avaliados não traziam de modo adequado a forma ou o modo de conservação após abertos.

Muitos produtos, após abertos e não consumidos imediatamente, têm sua data de validade reduzida e devem ser armazenados de forma correta, para evitar desperdícios e possíveis prejuízos à saúde do consumidor. Dessa forma, considera-se que essa informação não deve ser negligenciada nos rótulos desses produtos.

Ressalta-se que muitas empresas optam por fazer a identificação do lote, da data de fabricação e data de validade por meio da aplicação de processos de impressão diferentes dos utilizados no restante da rotulagem, por exemplo, por meio de carimbos. Esses processos, embora permitidos, muitas vezes podem trazer riscos para o consumidor, principalmente no caso da utilização de tintas de fácil remoção. Fato esse que se agrava com a atual situação de pandemia mundial, pois, conforme recomendação dos órgãos de saúde e vigilância sanitária, as embalagens devem ser higienizadas previamente ao consumo do produto. Verifica-se que muitas vezes a tinta utilizada para apresentar tais informações é removida durante o processo de higienização, de modo a não permitir mais a sua identificação. Dessa forma, seria interessante o uso de tintas não removíveis, bem como o alerta dos órgãos fiscalizadores junto às empresas desse setor.

Lista de ingredientes

É considerado como ingrediente toda substância, incluídos os aditivos alimentares, que se emprega na fabricação ou no preparo de alimentos, e que está presente no produto final em sua forma original ou modificada. A lista de ingredientes deve constar no rótulo precedida da expressão “ingredientes:” ou “ingr.:", e todos os ingredientes devem constar em ordem decrescente, da respectiva proporção³.

Os produtos pertencentes às categorias chocolate, requeijão, hambúrguer, alimentos para fins especiais, néctar de frutas, barra de cereais e salgadinho tipo “chips” não apresentaram irregularidades em relação à declaração da lista de ingredientes.

Por outro lado, 16 (28,6%) dos 56 produtos avaliados apresentaram não conformidades para a declaração da lista de ingredientes. Apesar de uma porcentagem relativamente elevada, está abaixo dos 78% de não conformidades relatadas por Mallet et al⁹.

A categoria de picolé apresentou 2 produtos não conformes, sendo que, em um deles, os ingredientes e os aditivos foram declarados misturados, enquanto outra marca não apresentou a lista de ingredientes.

Na categoria dos biscoitos, havia um produto que indicava possuir entre os ingredientes “ovos selecionados”, não sendo essa a forma adequada de apresentação desse ingrediente.

Dos quatro produtos da categoria de produto vegano, dois apresentaram na lista de ingredientes a expressão “não contém carne”, o que não deve ocorrer, uma vez que na lista deve conter apenas os ingredientes presentes no produto, não sendo permitido fazer qualquer tipo de alegação sobre os ausentes.

Outra não conformidade foi encontrada em uma pasta de amendoim, que apresentava na sua lista de ingredientes a palavra “amor”.

No caso dos produtos artesanais, foram encontrados 3 produtos com não conformidades, sendo que um deles não apresentava a lista de ingredientes. O segundo produto apresentava como principal ingrediente “leite pasteurizado”, ou seja, em desacordo com a legislação¹⁷, que preconiza que queijo artesanal deve ser produzido com leite cru. O terceiro produto continha ingredientes que não correspondiam a um produto artesanal, também conforme definido em regulamento técnico específico.

Aditivos

É considerado aditivo alimentar qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem propósito de nutrir, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento. Isso implica direta ou indiretamente fazer com que o próprio aditivo ou seus produtos se tornem componentes do alimento. Essa definição não inclui os contaminantes ou substâncias nutritivas que sejam incorporadas ao alimento para manter ou melhorar suas propriedades nutricionais³.

Os aditivos alimentares devem ser declarados na lista de ingredientes. Essa declaração deve constar de: a) a função principal ou fundamental do aditivo no alimento; e b) seu nome completo ou seu número INS (Sistema Internacional de Numeração, Codex Alimentarius FAO/OMS); ou ambos. Quando houver mais de um aditivo alimentar com a mesma função, pode ser mencionado um em continuação ao outro, agrupando-os por função. Os aditivos alimentares devem ser declarados depois dos ingredientes³.

Para os casos dos aromas/aromatizantes declara-se somente a função e, opcionalmente, sua classificação, conforme estabelecido em Regulamentos Técnicos sobre Aromas/Aromatizantes. Alguns alimentos devem mencionar em sua lista de ingredientes o nome completo do aditivo utilizado. Essa situação deve ser indicada em Regulamentos Técnicos específicos³.

Não foram identificadas não conformidades na declaração dos aditivos das seguintes categorias de produtos: chocolates, requeijão, hambúrguer, alimentos para fins especiais, artesanais, néctar de frutas, polvilho e salgadinho tipo “chips”.

A categoria de picolé apresentou um produto com não conformidades: ausência da identificação do estabilizante. Outro produto dessa mesma categoria não apresentava a lista de aditivos, o que, a princípio,

não é obrigatório, uma vez que o produto pode ser feito sem aditivos. Porém, por se tratar do mesmo produto que não continha a lista de ingredientes, fica a dúvida se realmente era esse o caso ou se havia aditivos não identificados.

Dois produtos da categoria de biscoitos e um da categoria de produto vegano apresentaram em seus rótulos as expressões “não contém conservantes” e “livre de conservantes”. Mesmo que verdadeiras, essas expressões não são permitidas desde 2016²⁰. Por fim, um dos produtos da categoria de pão de forma não identificou a função dos aditivos apresentados na lista.

Dois produtos da categoria de picolé apresentaram irregularidade na forma de apresentação de aditivos aromatizantes, sendo que um não declarou de maneira correta na denominação de venda, enquanto o outro não declarou de forma visível, no painel principal, a presença de aromatizante artificial.

Um dos produtos da categoria hambúrguer apresentou a expressão “idêntico ao natural” de difícil identificação e leitura, enquanto um produto da categoria de produto vegano não identificou de forma correta a adição de aroma sintético idêntico ao natural. Todas as outras categorias estavam de acordo com a legislação para declaração de aromatizantes.

Nenhum dos produtos apresentou não conformidades com relação à forma de declaração de aditivos corantes na rotulagem.

Instruções de uso ou modo de preparo

Quando necessário, o rótulo deve conter as instruções sobre o modo apropriado de uso, incluindo a reconstituição, o descongelamento ou o tratamento que deve ser dado pelo consumidor para o uso correto do produto. Essas instruções não devem ser ambíguas, nem dar margem a falsas interpretações, a fim de garantir a utilização correta do alimento³. Nenhum dos produtos avaliados apresentou irregularidade ou não conformidade com o disposto na legislação em relação às instruções de uso ou ao modo de preparo.

Rotulagem facultativa e casos particulares

Rotulagem facultativa é definida como “qualquer informação ou representação gráfica, assim como matéria escrita, impressa ou gravada, sempre que não estejam em contradição com os requisitos obrigatórios do presente regulamento (RDC nº 259/2002), incluídos os referentes a declaração de propriedades e as informações enganosas³⁷”.

Foram observados os seguintes pontos: em um dos produtos da categoria picolé, havia a expressão “sorvete alimentá”; e em um dos produtos da categoria produto artesanal, foi observada a expressão “leite de vacas felizes, puro leite de pastagens”. Na categoria de veganos, foram encontradas imagens que poderiam levar o consumidor a tirar conclusões falsas ou enganosas sobre a origem ou composição do produto.

Estudo realizado por Mello et al⁸ destacou também a presença de declarações como “alimentação saudável e divertida”, “com muito mais vitamina” e “saúde para toda família”. De acordo com esses autores, tais expressões não devem ser utilizadas, a menos que expressamente permitidas em regulamentos técnicos específicos, pois podem levar os consumidores a pensar que determinados alimentos sejam capazes de prevenir, aliviar ou tratar doenças, melhorar o desempenho físico, dar mais energia, entre outros.

Rotulagem nutricional

A RDC nº 360/2003²¹ é considerada a legislação básica para a rotulagem nutricional e tem como objetivos: constante aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de alimentos visando à proteção à saúde da população; compatibilizar a legislação nacional com base nos instrumentos harmonizados no Mercosul; facilitar ao consumidor conhecer as propriedades nutricionais dos alimentos, contribuindo para seu consumo adequado; complementar as estratégias e políticas de saúde dos países em benefício da saúde do consumidor; e definir claramente a rotulagem nutricional que devem ter os alimentos embalados que sejam comercializados no Mercosul, com o objetivo de facilitar sua livre circulação, atuar em benefício do consumidor e evitar obstáculos técnicos ao comércio.

A rotulagem nutricional é formada pela tabela nutricional como informação obrigatória para a grande maioria dos alimentos, salvo as seguintes exceções: bebidas alcoólicas; aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia; especiarias; águas minerais naturais e as demais águas de consumo humano; vinagres; sal (cloreto de sódio); café, erva mate, chá e outras ervas sem adição de outros ingredientes; alimentos preparados e embalados em restaurantes e estabelecimentos comerciais, prontos para o consumo; produtos fracionados nos pontos de venda a varejo, comercializados como pré-medidos; e frutas, vegetais e carnes *in natura*, refrigerados e congelados²².

Tabela nutricional

A tabela nutricional foi uma das declarações que mais apresentaram erros, principalmente em relação à ausência das informações obrigatórias e à forma como foram apresentadas (**Tabela 3**). Dos 56 produtos avaliados, 16 (28,5%) continham pelo menos uma não conformidade para a declaração das informações nutricionais. Resultados semelhantes também foram relatados por Smith e Almeida-Muradian⁷, que observaram ser este o tipo de irregularidade mais comum em estudo feito com 52 rótulos, enquanto Yamashita e Corrijo¹⁶ observaram não conformidades desse tipo em 15,4% dos produtos avaliados.

Tabela 3. Tipo e quantidade de não conformidades sobre a informação nutricional por categoria de produtos

Não conformidades	Categoria (número de produtos)
Arredondamento dos números	Picolé (1); requeijão (1); biscoito (2); Pão de forma (2) (Total = 6 / 10,7%)
Ausência de tabela nutricional	Picolé (1); Artesanal (2) (Total = 3 / 5,3)
Nutrientes de declaração obrigatória fora de ordem e/ou não declarados	Chocolate (1); Pão de forma (1); Polvilho (1) (Total = 3 / 5,3%)
Declaração não conforme de nutrientes não obrigatórios	Biscoitos (1: gorduras); Pão de forma (1: minerais) (Total = 2 / 3,5%)
Declaração indevida de ausência de lactose (para produtos sem lactose)	Vegano (1) (Total 1 = 1,8%)
Valor incorreto ou apresentação inadequada da porção	Vegano (1); Pasta de amendoim (1); Pão de forma (1) (Total = 3 / 5,3%)
Não conformidades na escrita	Artesanal (1) (Total 1 = 1,8%)

Para a categoria de picolés, um produto apresentava não conformidades no arredondamento dos números, enquanto outro não apresentava tabela nutricional. Na categoria de chocolate, um dos produtos apresentava os nutrientes fora de ordem na tabela. Na categoria de requeijão, um dos produtos apresentava erros no arredondamento dos números, mesmo erro observado na rotulagem de dois produtos da categoria de biscoitos. Ainda na categoria de biscoitos, outro produto trazia a declaração de gorduras fora do padrão recomendado pela legislação, pois declarava o total de gorduras poli-insaturadas, mas não especificava quais pertenciam a cada subgrupo das poli-insaturadas, e a soma de todos os tipos de gorduras não era igual às gorduras totais¹⁴. Um dos produtos da categoria de alimentos para fins especiais trazia a declaração de minerais, porém abaixo do valor mínimo exigido pela legislação para que se pudesse fazer esse tipo de declaração na tabela nutricional. Além disso, os números não seguiam os critérios de arredondamento.

Declaração da presença de glúten

De acordo com o artigo 1º da Lei nº 10674/2003²²: “Todos os alimentos industrializados deverão conter em seu rótulo e bula, obrigatoriamente, as inscrições “Contém Glúten” ou “Não Contém Glúten”, conforme o caso, devendo esta advertência ser impressa nos rótulos ou em caracteres com destaque, nítidos e de fácil leitura.”

De acordo com a análise dos rótulos, notou-se que, embora não haja um local específico para sua declaração, a grande maioria o fez próximo ou logo após a lista de ingredientes e aditivos, ou logo após a declaração de lactose e alergênicos (quando presente), pois desse modo facilita para o consumidor obter todas essas informações de forma reunida, para assim tomar a decisão de compra ou não do produto. Contudo, notou-se que tal declaração nem sempre seguia exatamente as expressões permitidas, o que se entende estar em desacordo com a lei²³. Portanto, foram classificadas como inconformidades.

As duas principais irregularidades encontradas foram: a ausência de declaração, que ocorreu em quatro produtos, sendo eles das categorias picolé (1), produtos artesanais (2) e salgadinho tipo “chips” (1); e declaração de forma incorreta, como as expressões “pode conter glúten”, “pode conter traços de glúten” ou “zero glúten”, encontradas nas categorias picolé (1), pasta de amendoim (1) e polvilho (1). Conforme comentado, tais declarações não correspondem às expressões definidas na lei²³, sendo classificadas como não conformidades, totalizando 7 produtos, ou seja, 11,6% do total avaliado. Resultado similar foi relatado por Mello *et al*⁸, segundo os quais 8,3% dos produtos avaliados apresentaram não conformidades com relação a essa declaração obrigatória.

Declaração de alergênicos

É obrigatória a declaração de alergênicos para produtos que contenham em sua formulação pelo menos um dos ingredientes listadas na RDC nº 26/2015²³ ou, ainda, os que apresentem a possibilidade de contaminação cruzada por esses mesmos ingredientes.

Novamente, observaram-se dois tipos principais de erros. O primeiro foi a ausência da declaração, o que ocorreu em dois produtos da categoria picolé e em três produtos artesanais. Ressalta-se que por meio da lista de ingredientes é que se chegou a essas conclusões, e que há a possibilidade de que outros produtos possam apresentar contaminação cruzada, estando essa informação ausente da rotulagem, subestimando esse número de produtos não conformes.

O segundo tipo de erro mais comum observado foi a utilização de expressões em local inapropriado ou de forma inadequada ou imprecisas, ou seja, em desacordo com a legislação, por exemplo: “produzido por equipamentos que processam” e “pode conter derivados de”. As categorias que apresentaram esse tipo de não conformidade e o número de produtos foram: picolé (1), biscoitos (1), produto vegano (1), pasta de amendoim (1) e pão de forma (2).

Declaração da presença ou ausência de lactose

As não conformidades foram divididas em relação à declaração da ausência/presença de lactose de duas formas: a primeira, a não declaração desse ingrediente, quando obrigatório, o que ocorreu para as seguintes categorias de produtos: picolé (1), chocolate (1) e produtos artesanais (2). Ressalta-se que foi por meio da lista de ingredientes que se chegou a essas conclusões²⁴. E a segunda, a declaração de forma inadequada, o que ocorreu para um produto da categoria de pasta de amendoim, que apresentou apenas a palavra “lactose” após a lista de ingredientes.

Observou-se também que dois produtos da categoria de produto vegano traziam em sua rotulagem a expressão “zero lactose”, sendo essa declaração não permitida para essa categoria de produtos.

Diante da importância das informações da presença ou não de glúten, alergênicos e lactose nos rótulos dos produtos, sob o ponto de vista da saúde dos consumidores, considera-se esse um número elevado de produtos não conformes.

Transgênicos, irradiados, orgânicos, artesanais e serviço de atendimento ao consumidor (SAC)

Apenas um produto, pertencente à categoria de produto vegano, apresentou a declaração de transgênicos em não conformidade com a legislação, pois trazia a expressão “sem transgênicos”. Embora sendo verdadeira, essa expressão só deve ser utilizada quando produtos comerciais similares tiverem ingredientes que provêm de organismos geneticamente modificados (OGM)²⁵.

Para a declaração de produtos irradiados²⁶ e orgânicos^{27,28} não foi observada nenhuma não conformidade, de acordo com as respectivas legislações vigentes.

Nenhum dos quatro produtos declarados como artesanais continha em sua rotulagem o “selo arte”, estando em desacordo com as legislações pertinentes²⁹.

Embora o SAC (serviço de atendimento ao consumidor) seja obrigatório apenas para serviços, entende-se que seria interessante que as empresas o fornecessem em seus produtos também. Dos produtos avaliados, as seguintes categorias não traziam o SAC em sua rotulagem: picolé (1), chocolate (1), artesanal (1) e pasta de amendoim (1). Por outro lado, destaca-se que alguns dos produtos avaliados traziam o SAC para pessoas com deficiência auditiva. Entende-se que essa é uma interessante ferramenta de inclusão.

Declarações não regulamentadas

Ao analisar os produtos, foram encontradas diversas declarações na rotulagem que não constavam de regulamentação ou legislação específica, seja de permissão ou de proibição e, por isso, não puderam ser

avaliadas se estavam ou não em conformidade, a saber: “produto caseiro”, “vegano”, “vegetariano”, “base vegetal”, “sem antibióticos”, “mais carnudo”, “feito de plantas”, e “contém açúcar mascavo”. Essas características têm sido cada vez mais demandadas pelos consumidores, em função das atuais recomendações sobre alimentação e saúde e, sobretudo, do estilo de vida da população. Por outro lado, muitas delas podem ser mal utilizadas pelas empresas e/ou mal interpretadas pelos consumidores.

Embora algumas dessas declarações sejam de difícil regulamentação e fiscalização, pois podem envolver toda a cadeia produtiva, e não somente a formulação final dos produtos alimentícios, entende-se que os órgãos responsáveis devem fazer um esforço para que haja padronização. É o que está acontecendo, por exemplo, com a declaração para produtos integrais, inicialmente por meio de consulta pública e posteriormente por meio de regulamentação. Dessa forma, tanto as empresas idôneas, como os consumidores, ficam protegidos de declarações falsas e/ou imprecisas.

CONCLUSÃO

Apesar dos recentes avanços com relação à legislação da rotulagem de produtos alimentícios, verificou-se que ainda há muito o que adequar, principalmente com relação ao cumprimento dessas normas por parte das empresas produtoras e industrializadoras.

Dos 56 produtos avaliados, mais da metade (55,3%) apresentaram pelo menos um item não conforme. Todos os quatro produtos avaliados das categorias de biscoito e produto artesanal apresentaram não conformidades, sendo que para esta última houve uma alarmante média de mais de oito não conformidades por produto.

Entre as informações obrigatórias, as referentes a lote, data de fabricação, prazo de validade e conservação foram as mais recorrentes entre as não conformidades, sendo que muitos produtos não apresentaram essas informações ou a apresentaram de forma ilegível.

Verificou-se também que algumas alegações necessitam de melhor regulamentação ou legislação específica e, por isso, não puderam ser avaliadas se estavam ou não em conformidade, como: “produto caseiro”, “vegano”, “vegetariano”, “base vegetal”, “sem antibióticos”, “mais carnudo”, “feito de plantas”, “integral”, e “contém açúcar mascavo”.

Esse cenário mostra o uso de estratégias de *marketing* por parte das empresas alimentícias com o objetivo de atender a desejos e expectativas dos consumidores e também a falta de conhecimento e de aplicação da legislação vigente, indicando necessidade de formação e capacitação de profissionais nessa área. Além disso, faz-se necessária uma intensificação da fiscalização, assim como uma maior celeridade na regulamentação de alegações específicas por parte dos órgãos responsáveis, para que possam alcançar de forma eficaz seus objetivos primários, que são: proteção das empresas idôneas, proteção dos consumidores e liberdade de escolha adequada.

Finalmente, a evolução da legislação de alimentos e sua rotulagem, bem como sua aplicação e entendimento por parte de todos os atores envolvidos na sua produção, distribuição, comercialização e consumo, representa uma importante estratégia na melhoria da informação, na educação do consumidor para fazer escolhas adequadas sobre a alimentação e na qualidade de vida da sociedade.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não existir conflitos de interesse.

FINANCIAMENTO

Não declarado.

AGRADECIMENTO

Não declarado.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Os autores declaram que todos contribuíram de forma substancial em todas as etapas deste manuscrito, desde sua concepção e planejamento, análise e interpretação de dados, redação e revisão crítica. Todos aprovam a sua versão final.

REFERÊNCIAS

1. Associação Brasileira das Indústrias de Alimentos – ABIA, 2021. Disponível em: <https://www.abia.org.br/downloads/Infograficoanual2020v5.pdf>
2. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia alimentar para a população brasileira. 2. ed., 1. reimpr. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_alimentar_populacao_brasileira_2ed.pdf
3. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 259, de 20 de setembro de 2002. Regulamento técnico para rotulagem de alimentos embalados. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 23 set. 2002. Seção 1 (184):33-4.
4. Gonçalves NA, Cecchi PP, Vieira RM, Santos MDA, Almeida TC. Rotulagem de alimentos e consumidor. *Nutrição Brasil*. 2015;14(4):197-204. <https://doi.org/10.33233/nb.v14i4.49>
5. Soares DJ, Neto LGM, Silva LMR. Análise do comportamento dos consumidores com relação à compreensão e entendimento das informações dos rótulos de alimentos. *Agrotec [Internet]*. 2016;37(1):105-11. <https://doi.org/10.25066/agrotec.v37i1.29961>
6. Liberti P, Ayres G, Coelho D, Lima T, Fingola Y, Luquez L et al. Avaliação da compreensão de rótulos de alimentos embalados por consumidores no município de Niterói, Rio de Janeiro, Brasil. *Braz J Food Res*. 2018;9(4):61-73. <https://doi.org/10.3895/rebrapa.v9n4.7477>

7. Smith ACL, Almeida-Muradian LB. Rotulagem de alimentos: avaliação da conformidade frente à legislação e propostas para a sua melhoria. Rev Inst Adolfo Lutz. 2011;70(4):463-72. Disponível em: <https://periodicos.saude.sp.gov.br/RIAL/article/view/32501>
8. Mello AV, Abreu ES, Spinelli MGN. Avaliação de rótulos de alimentos destinados ao público infantil de acordo com as regulamentações da legislação brasileira. J Health Sci Inst. 2015;33(4):351-9.
9. Mallet ACT, Oliveira RVA, Oliveira CF, Saron MLG, Costa LMAS. Adequação das rotulagens alimentícias frente à legislação vigente. Cadernos UniFOA. 2017;35: 101-10. <https://doi.org/10.47385/cadunifoa.v12.n35.432>
10. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 29, de 13 de janeiro de 1998. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de alimentos para fins especiais. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 30 mar. 1998. Seção 1 (60):2-3.
11. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Informe Técnico nº 26, de 14 de junho de 2007. Procedimentos para a indicação do uso de aroma na rotulagem de alimentos. Disponível em: https://www.saude.go.gov.br/images/imagens_migradas/upload/arquivos/2012-06/informe-tecnico-aromatizantes.pdf
12. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (BR). Instrução Normativa nº 20, de 31 de julho de 2000. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de almôndega, de apresuntado, de fiambre, de hambúrguer, de kibe, de presunto cozido e de presunto. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 03 ago. 2000. Seção 1 (149):7-12.
13. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (BR). Portaria 146, de 7 de março de 1996. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de produtos lácteos. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 11 mar. 1996. Seção 1 (48):3977-86.
14. Ministério da Saúde (BR). Resolução RDC nº 54, de 12 de novembro de 2012, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Regulamento técnico sobre informação nutricional complementar. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 13 nov. 2012. Seção 1 (219):122-26.
15. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO. Regulamentos Técnicos. Portaria nº 157, de 19 de agosto de 2002. Estabelecer a forma de expressar a indicação quantitativa do conteúdo líquido dos produtos pré-medidos. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/rtac/pdf/rtac000786.pdf>
16. Yamashita AS, Carrijo KF. Avaliação da rotulagem de patês de diferentes marcas produzidos em indústrias com serviço de inspeção sanitária oficial e comercializados no município de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. Enciclic Biosf. 2014;10(19):271-83. Disponível em: <https://www.conhecer.org.br/enciclop/2014b/AGRARIAS/avaliacao%20da%20rotulagem.pdf>

17. Instituto Mineiro de Agropecuária – IMA. Portaria IMA nº 1.969, de 26 de março de 2020. Dispõe sobre a produção de Queijo Minas Artesanal em queijarias e entrepostos localizados dentro de microrregiões definidas e para as demais regiões do Estado, caracterizadas ou não como produtora de Queijo Minas Artesanal – QMA. Disponível em:
<http://www.ima.mg.gov.br/institucional/portarias>
18. Valente MER, Perez R, Ramos AM, Chaves JBP. Indicação geográfica de alimentos e bebidas no Brasil e na União Europeia. Cienc. Rural. 2012;42(3):551-8.
<https://doi.org/10.1590/S0103-84782012000300027>
19. Quaranta CDH. A indicação geográfica no segmento de queijo artesanal no Brasil e na França: estudo comparativo das IP Canastra e AOP Camembert de Normandie. Rio de Janeiro [tese de doutorado]. Rio de Janeiro (RJ): Instituto Nacional da Propriedade Industrial; 2018. Disponível em:
<https://www.gov.br/inpi/pt-br/servicos/academia/arquivo/teses/cabral-daniele-herve-quaranta.pdf>
20. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Informe Técnico n. 70, de 19 de janeiro de 2016. Esclarecimentos sobre a declaração de alegações de conteúdo para aditivos alimentares na rotulagem de alimentos e bebidas. Disponível em:
http://antigo.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=3400997&_101_type=content&_101_groupId=33916&_101_urlTitle=informe-tecnico-n-70-de-19-de-janeiro-de-2016&inheritRedirect=true
21. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Aprova o Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 26 dez. 2003. Seção 1 (251):33-5.
22. Presidência da República (BR). Atos do Poder Legislativo. Lei no. 10.674, de 16 de maio de 2003. Obriga a que os produtos alimentícios comercializados informem sobre a presença de glúten, como medida preventiva e de controle da doença celíaca. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 19 mai. 2003. Seção 1(94):1.
23. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC nº 26, de 02 de junho de 2015. Dispõe sobre os requisitos para rotulagem obrigatória dos principais alimentos que causam alergias alimentares. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 03 jul. 2015. Seção 1(125):52-3.
24. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC nº 136, de 08 de fevereiro de 2017. Estabelece os requisitos para declaração obrigatória da presença de lactose nos rótulos dos alimentos. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 09 fev. 2017. Seção 1 (29):44.

25. Presidência da República (BR). Atos do Poder Executivo. Decreto nº 4.680, de 24 de abril de 2003. Regulamenta o direito à informação, assegurado pela Lei no 8.078, de 11 de setembro de 1990, quanto aos alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal que contenham ou sejam produzidos a partir de organismos geneticamente modificados, sem prejuízo do cumprimento das demais normas aplicáveis. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 25 abr. 2003. Seção 1 (79):2.
26. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC nº 21, de 26 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico para Irradiação de Alimentos. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 29 jan. 2001. Seção 1 (20):35.
27. Presidência da República (BR). Atos do Poder Legislativo. Decreto nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003. Dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 24 dez. 2003. Seção 1 (250):8-9.
28. Presidência da República (BR). Atos do Poder Executivo. Decreto nº 6.323, de 27 de dezembro de 2007. Regulamenta a Lei no 10.831, de 23 de dezembro de 2003, que dispõe sobre a agricultura orgânica, e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 28 dez. 2007. Seção 1 (249):2-8.
29. Presidência da República (BR). Atos do Poder Executivo. Decreto nº 9.918, de 18 de julho de 2019. Regulamenta o art. 10-A da Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, que dispõe sobre o processo de fiscalização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 19 jul 2019. Seção 1 (138):4-5.





Avaliação de resíduos de agrotóxicos em amostras de farinha de trigo por espectrometria de massas

Evaluation of pesticide residues in wheat flour by mass spectrometry

Alan Roberto Costa¹ , Lucas Monteiro Santa Cruz¹ , Vitor Agrelli Fernandes², Viviane Emi Nakano¹ ,
Iracema de Albuquerque Kimura¹ , Janete Alaburda¹ 

¹ Núcleo de Contaminantes Orgânicos, Centro de Contaminantes, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil.

² Curso de Especialização Vigilância Laboratorial em Saúde Pública, Instituto Adolfo Lutz/CEFORSUS/SP.

*Autor de correspondência/Corresponding author: alan.costa@ial.sp.gov.br

Recebido/Received: 14.10.2021 - Aceito/Accepted: 18.08.2022

RESUMO

Os cereais são uma importante fonte alimentícia e econômica, dentre eles se destaca o trigo e sua farinha. Durante o cultivo, visando o controle de pragas, frequentemente são utilizados os agrotóxicos, porém seu uso abusivo pode acarretar danos à saúde humana e ao meio ambiente. O trabalho teve como objetivo avaliar a presença de resíduos de agrotóxicos em amostras de farinha de trigo comercializadas no estado de São Paulo, utilizando o método QuEChERS (Rápido, Fácil, Barato, Efetivo, Robusto e Seguro) modificado, seguido de análise por CG-EM/EM e CLUE-EMAR para identificação e quantificação. No total, 124 ingredientes ativos (i.a.) estavam dentro dos critérios de aceitação para linearidade, limites de detecção e quantificação, exatidão e precisão (intervalo de confiança de 95%; $k = 2$). Os resultados de 25 amostras indicaram a presença de bifentrina, fenitrotiona, clorpirifós, deltametrina, lambda-cialotrina e pirimifós-metilico em farinha de trigo comum e os quatro últimos i.a. também foram detectados em farinha de trigo orgânica. O pirimifós-metilico foi detectado em 92% das amostras. Os i.a. encontrados nas amostras estavam abaixo do Limite Máximo de Resíduos (LMR) estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) para farinha de trigo e as amostras foram consideradas próprias para o consumo.

Palavras-chave. Farinha, Espectrometria de Massas, QuEChERS, Agrotóxicos.

ABSTRACT

Cereals are an important economic factor and food source, which wheat and its flour stand out. Pesticides are often employed to control harmful organisms, but their abusive use can cause damage to human health and the environment. This study aimed to evaluate the presence of pesticide residues in wheat flour samples commercialized in the state of São Paulo – Brazil, using the modified QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) method, followed by GC-MS/MS and UHPLC-HRMS analysis for identification and quantification. Thus, 124 active ingredients (a.i.) were within acceptable criteria for linearity, limits of detection and quantification, accuracy (trueness), and precision (95% confidence level; $k = 2$). The results for 25 wheat flour samples showed the presence of bifenthrin, fenitrothion, chlorpyrifos, deltamethrin, lambda-cyhalothrin, and pirimiphos-methyl, and the last four a.i. were also detected in organic wheat flour. Pirimiphos-methyl was detected in 92% of all samples. All compounds were found below the Maximum Residue Levels (MRL) established by Brazilian Health Regulatory Agency (Anvisa) for wheat flour and the samples were considered suitable for consumption.

Keywords. Flour, Mass Spectrometry, QuEChERS, Pesticides.

INTRODUÇÃO

Os cereais constituem uma importante parte da dieta humana, são fonte de energia, têm capacidade antioxidante e possuem ácidos graxos essenciais, proteínas, carboidratos, fibras, minerais, vitaminas e outros micronutrientes que são essenciais para a manutenção da saúde¹. Em continentes como Ásia, América e Europa, as áreas cultivadas de cereais têm aumentado a cada ano². O trigo está entre os alimentos mais produzidos, assim como o arroz e o milho e, de acordo com a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO), é o segundo mais consumido no mundo^{3,4}. No Brasil, está entre os três cereais mais consumidos pela população, com uma produção de 5 milhões de toneladas em 2019, sendo o estado de São Paulo o terceiro maior produtor nacional^{4,5}.

Com o crescimento populacional e o conseqüente aumento da demanda por alimentos, há a necessidade de maior controle das pragas nas lavouras, sobretudo em um país tropical, como o Brasil. Entre os tipos de controle, um dos mais empregados é o químico, como a utilização de agrotóxicos⁶. De acordo com a Associação Brasileira da Indústria do Trigo (ABITRIGO)⁷, existem até seis etapas do cultivo desse cereal nas quais são aplicados agrotóxicos e, portanto, contribuem para a concentração final de resíduos desses compostos nos alimentos consumidos pela população, preparados a partir dele.

No Brasil, segundo a RDC nº 4/2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, os limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos para os alimentos *in natura* também se aplicam para os alimentos processados (excetuando-se a situação em que ocorre a concentração ou desidratação do alimento); dessa forma, no período compreendido neste estudo, 107 ingredientes ativos (i.a.) eram autorizados para o trigo e, conseqüentemente, para a farinha de trigo, porém com limites menores para: fosfina (LMR = 0,01 mg kg⁻¹) e malationa (LMR = 2,0 mg kg⁻¹)^{8,9}. Entre os grupos químicos de agrotóxicos, destacam-se: organoclorados, organofosforados e carbamatos. Os organoclorados são moléculas orgânicas que contêm cloro em sua estrutura, são lipossolúveis e de elevada estabilidade química, fazendo com que sejam persistentes no ambiente e nos organismos. Os organofosforados, que contêm fósforo, no entanto, são degradados mais rapidamente e possuem maior toxicidade aguda. Os carbamatos são ésteres derivados do ácido carbâmico e, do mesmo modo que os organofosforados, não se acumulam em tecidos gordurosos e atuam pela inibição da enzima acetilcolinesterase¹⁰⁻¹². Em vista disso, o monitoramento de resíduos de agrotóxicos faz-se necessário e essencial.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a presença de resíduos de agrotóxicos em amostras de farinha de trigo adquiridas em estabelecimentos comerciais no estado de São Paulo, utilizando o método QuEChERS modificado, seguido de análise por GC-MS/MS (CG-EM/EM) e UHPLC-HRMS (CLUE-EMAR) para identificação e quantificação dos agrotóxicos nas amostras.

MATERIAL E MÉTODOS

Materiais e Reagentes

Padrões de i.a. de agrotóxicos (marcas: Dr. Ehrenstorfer e Sigma-Aldrich); Tubos cônicos de 50 mL; Sachês de sais de extração QuEChERS método AOAC, contendo: 1,5 g de acetato de sódio e 6,0 g de sulfato de magnésio (Agilent); Tubos de limpeza dSPE (do inglês, *dispersive Solid*

Phase Extraction) (*clean-up*), contendo: 400 mg de fase reversa C18, 400 mg de amina primária e secundária (PSA) e 1200 mg de Sulfato de magnésio (Agilent); Acetonitrila grau HPLC (JT Baker); Ácido acético glacial 100% P.A. (Merck); Água ultrapura (Milli-Q Merck); Metanol grau HPLC (Merck); Acetato de etila grau GC resíduo (Scharlau); Ácido fórmico grau HPLC (Merck); Formiato de amônio grau HPLC (Fluka).

Equipamentos

Centrífuga refrigerada Excelsa 4 modelo 280 R (Fanem); concentrador rotativo a vácuo modelo RVC 2-25 CO plus (Christ); agitadores de tubos Q220-Vortex (Quimis) e Klive Q225K (Quimis); balança analítica de precisão modelo AB204 (Mettler Toledo); sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore); sistema de cromatografia a gás *Trace GC Ultra* acoplado ao espectrômetro de massas triplo quadrupolo *TSQ Quantum XLS* (CG-EM/EM); sistema de cromatografia a líquido *Ultimate 3000 Dionex* acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução *Exactive Plus Orbitrap™* (CLUE-EMAR) (*Thermo Scientific*).

Amostras

As amostras de farinha de trigo foram adquiridas entre novembro de 2019 e maio de 2020, em estabelecimentos comerciais do estado de São Paulo. Foram analisadas 25 amostras, das quais sete são classificadas como orgânicas e as demais como Tipo I – comum. As amostras foram homogeneizadas e posteriormente submetidas ao método QuEChERS modificado¹³⁻¹⁵.

Preparo de amostras

Em tubo cônico de 50 mL com $5,00 \pm 0,05$ g de amostra, adicionou-se 10 mL de água ultrapura a 4°C e agitou-se para formar uma pasta homogênea. Na etapa de extração, foi adicionado 15 mL de solução de acetonitrila acidificada com 1% de ácido acético e agitou-se por um minuto manualmente. Adicionou-se o soro de extração, agitou-se novamente por um minuto e centrifugou-se por 10 minutos a 2500 RPM. Para a etapa de limpeza “*clean up*”, transferiu-se 8 mL do sobrenadante para o tubo contendo dSPE, agitou-se por um minuto manualmente, centrifugou-se nas mesmas condições anteriores. Em seguida, filtrou-se o sobrenadante em membrana de PTFE (0,22 µm), retirou-se duas alíquotas de 500 µL para *vial* de 2 ml e procedeu-se à secagem de ambas, separadamente, em concentrador a vácuo. Após a secagem, uma das alíquotas foi reconstituída em 500 µL de acetato de etila para análise por CG-EM/EM e a outra, em 100 µL de metanol e 400 µL de solução aquosa de formiato de amônio 5 mM e ácido fórmico 0,1% para análise por CLUE-EMAR. As etapas de preparo de amostra estão representadas na [Figura](#).

Identificação e quantificação

1. CLUE-EMAR (UHPLC-HRMS *Orbitrap™*):

Foi utilizado o cromatógrafo CLUE *Ultimate 3000 Dionex* com coluna C18 *Hypersil Gold aQ* (50 mm × 2,1 mm e diâmetro de partícula de 1,9 µm) *Thermo Scientific*, fases móveis e condições

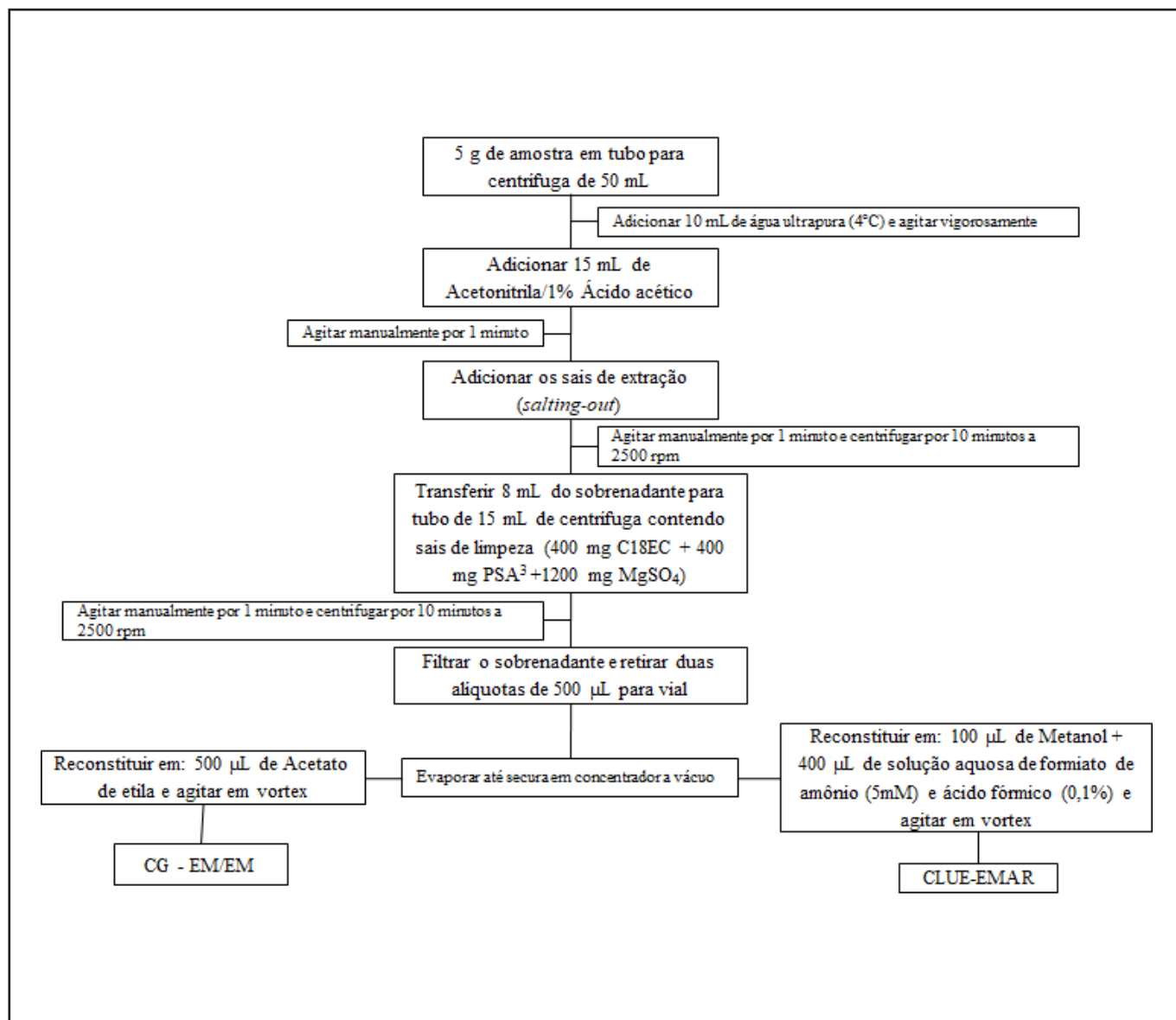


Figura. Fluxograma da metodologia empregada para preparo de amostra e quantificação de resíduos de agrotóxicos em farinha de trigo

analíticas estão representadas na **Tabela 1**. Para a detecção dos compostos, utilizou-se o EMAR com fonte de ionização por eletronebulização com aquecimento (HESI). Os espectros de massas foram adquiridos nos modos positivo e negativo, simultaneamente. Os experimentos foram realizados em *Full MS* e *All Ion Fragmentation* (AIF), com resoluções: 35.000 e 17.500, respectivamente, na faixa de 60-900 m/z. Para aquisição e tratamento dos dados, foram utilizados os *softwares Xcalibur* e *ExactFinder*. Os critérios para detecção e identificação dos compostos foram: a massa exata do íon molecular e de pelo menos um fragmento, tempo de retenção e padrão isotópico. Para a quantificação, foram utilizados o íon molecular e o tempo de retenção. O desvio de exatidão de massas aceitável foi de no máximo 5 ppm, conforme o guia para validação de resíduos de agrotóxicos em alimentos da Comunidade Europeia¹⁶.

Tabela 1. Gradiente de fase móvel e condições analíticas

Tempo de Corrida (min), fluxo de 0,3 mL min ⁻¹ , injeção de 2 µL e coluna a 40 °C	Fase móvel	
	A: solução aquosa de formiato de amônio 5 mM e 0,1% ácido fórmico (%)	B: solução de formiato de amônio 5 mM e 0,1% ácido fórmico em metanol (%)
0,0	98	2
0,5	98	2
2,5	40	60
5,0	40	60
6,0	0	100
9,0	0	100
9,1	98	2
12,0*	98	2

*tempo total de análise

2. CG-EM/EM (GC-MS/MS):

Foi utilizado o cromatógrafo *Trace GC Ultra* acoplado ao espectrômetro de massas *TSQ Quantum XLS* com coluna *TR-Pesticide-II* (30 m × 0,25 mm, espessura de filme de 0,25 µm) *Thermo Scientific*, volume de injeção de 2 µL (*splitless/PTV*), fluxo constante de gás Hélio a 1,2 mL min⁻¹ e com no mínimo duas transições *Single Reaction Monitoring* (SRM) para cada composto¹⁶. A programação de temperatura do forno está representada na **Tabela 2**.

Tabela 2. Rampa de aquecimento do forno

Rampa de aquecimento (°C min ⁻¹)	Temperatura (°C)	Tempo de espera (min)
Inicial	90	5,0
25	180	0,0
5	280	0,0
10	300	4,0
Tempo total de análise: 36,6 minutos		

Validação

O método foi avaliado para 158 i.a., 70 i.a. por cromatografia a gás e 88 i.a. por cromatografia a líquido, conforme protocolo da Comunidade Europeia para análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos para os seguintes parâmetros: linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), efeito matriz, precisão e exatidão¹⁶.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A determinação de resíduos de agrotóxicos em farinha de trigo é complexa. Além do grande número de i.a. que usualmente estão presentes em baixos níveis de concentração e propriedades físico-químicas diferentes, é preciso considerar que se trata de amostra seca e sua composição é rica, entre outros, em amido, gordura e proteína, que exigem uma etapa prévia de extração e limpeza^{2,17}.

O método QuEChERS¹³ é largamente utilizado em análises de resíduos de agrotóxicos, especialmente em frutas e vegetais frescos, mas, para cereais e seus derivados, ainda é considerado limitado¹⁷⁻¹⁹. Originalmente, o método QuEChERS foi desenvolvido para determinar resíduos de agrotóxicos em amostras com mais de 75% de umidade e matrizes não gordurosas. Neste trabalho, o método foi modificado conforme a técnica utilizada por HE et al¹⁷, pela adição de água ultrapurificada a 4 °C ($\delta = 1,00 \text{ g cm}^{-3}$) para assegurar a efetiva extração dos componentes.

Em combinação com o método de extração QuEChERS, as técnicas de cromatografia a gás e a líquido aliadas à espectrometria de massas mostraram ser efetivas, sensíveis, seletivas e robustas. Além da capacidade de separar, identificar e quantificar, os analisadores de massas triplo quadrupolo e EMAR *Orbitrap*TM permitem detectar baixos níveis dos componentes de interesse ao minimizar as interferências químicas^{2,20,21}.

Não há, na literatura, muitos estudos que empregam a análise de resíduos de agrotóxicos em farinha de trigo pelo sistema de CLUE acoplado ao espectrômetro de alta resolução *Orbitrap*TM. Além de evitar falsos positivos e da possibilidade de permitir a análise em matrizes complexas e demonstrar a alta sensibilidade para os compostos de interesse, um dos mais importantes aspectos dos equipamentos de alta resolução é a habilidade de adquirir dados sem a necessidade da otimização prévia dos parâmetros de cada substância e, assim, realizar análises de i.a. alvo e não alvo. Consequentemente, o número de compostos com possibilidade de análise é ilimitado no modo de triagem (*screening*), além da capacidade de realizar a varredura de outros compostos por análises retrospectivas mesmo após a aquisição dos dados^{20,21}. Contudo, para a quantificação, foi realizada a validação do método seguindo o protocolo da Comunidade Europeia¹⁶.

Para a avaliação do método, utilizou-se uma amostra de farinha de trigo orgânica isenta dos i.a. analisados pelo laboratório. Dos 158 i.a. estudados, um total de 124 compostos, desses: 66 no CG-EM/EM (94,3% de 70) e 58 no CLUE-EMAR (65,9% de 88) apresentaram resultados satisfatórios para os parâmetros avaliados. Para a análise em CG-EM/EM, os valores dos limites de detecção (LD) foram de 0,003 mg kg⁻¹ a 0,008 mg kg⁻¹ e quantificação (LQ) de 0,017 mg kg⁻¹ a 0,052 mg kg⁻¹; os valores de recuperação (três níveis de concentração: 0,010 mg kg⁻¹; 0,020 mg kg⁻¹ e 0,030 mg kg⁻¹, 8 réplicas e intervalo de confiança de 95%; k = 2) foram de 62% a 106% e Desvio Padrão Relativo (DPR) abaixo de 13,2%. Para os compostos analisados por CLUE-EMAR, os valores de LD foram de 0,001 mg kg⁻¹ a 0,005 mg kg⁻¹, LQ de 0,0004 mg kg⁻¹ a 0,013 mg kg⁻¹, os valores de recuperação (três níveis de concentração: 0,010 mg kg⁻¹; 0,020 mg kg⁻¹ e 0,030 mg kg⁻¹, 8 réplicas e intervalo de confiança de 95%; k = 2) foram de 53% a 135% e DPR abaixo de 17,6%. O método proposto também foi avaliado a partir da participação em um programa de ensaio de proficiência para análise de farinha de trigo – PRIMAR/036-2019 do Laboratório Federal de Defesa Agropecuária – LFDA/MG, com resultados satisfatórios.

Os resultados das análises das amostras de farinha de trigo Tipo I – comum coletadas para este estudo indicaram a presença dos ingredientes ativos de agrotóxicos: bifentrina; clorpirifós; deltametrina; fenitrotiona e pirimifós-metílico, enquanto os das amostras de farinha de trigo orgânica foram: clorpirifós; deltametrina; lambda-cialotrina e pirimifós-metílico, conforme resultados na **Tabela 3**.

Verificou-se que os valores de concentração de clorpirifós e deltametrina, nas amostras de farinha de trigo orgânica, são inferiores aos limites de quantificação do método para essas substâncias, porém, para a substância lambda-cialotrina, foram detectadas concentrações entre LD 0,005 mg kg⁻¹ e 0,031 mg kg⁻¹. Para as amostras de farinha de trigo Tipo I – comum, detectou-se um número maior de i.a. permitidos e em concentrações mais elevadas em comparação com as amostras do tipo orgânica. No entanto, para ambos os tipos de farinha avaliados, não foram observadas concentrações superiores aos LMR estabelecidos.

A presença de resíduos de agrotóxicos em farinha de trigo orgânica em concentrações não necessariamente é indicativa do uso de agrotóxicos no cultivo. Esses resíduos podem ser oriundos de contaminação cruzada durante o processo de moagem do trigo, quando utilizado concomitantemente para a produção de farinha tradicional. Nesse caso, a rastreabilidade da matéria-prima utilizada para sua produção é essencial, dando um indício de que as Boas Práticas de Fabricação (BPF) não estão sendo seguidas corretamente.

O Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), coordenado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), analisou 506 amostras de farinha de trigo de diferentes estados do Brasil no período de 2013 a 2015. Os i.a. com maior taxa de detecção foram: pirimifós-metílico (135 amostras; 26,7%), bifentrina (87 amostras; 17,2%), fenitrotiona (31 amostras; 6,1%) e clorpirifós (31 amostras; 6,1%). Entre as amostras consideradas insatisfatórias (37; 7,31%), destacam-se quatro que apresentaram clorpirifós-metílico (i.a. sem registro no Brasil) com níveis inferiores a 0,01 mg kg⁻¹. Os resultados do presente trabalho, **Tabela 3**, foram semelhantes aos apresentados no Relatório de Atividades de 2013 a 2015 desse programa.

Ressalta-se que o Brasil está na lista de signatários do *Codex Alimentarius* e, caso determinado agrotóxico não possua limite máximo permitido no país, deve-se seguir os padrões, orientações e recomendações desse compêndio. Com isso, essas amostras de farinha de trigo poderiam estar em conformidade, desde que comprovado que em sua fabricação foi utilizada matéria-prima importada de país que tem limites estabelecidos para o ingrediente ativo mencionado²².

Os resultados também estão condizentes com o trabalho de Bordin et al¹⁸, que analisaram 37 i.a. por QuEChERS, GC-MS/MS e LC-MS/MS e encontraram clorpirifós, deltametrina e pirimifós-metílico em amostras de farinha de trigo do Rio Grande do Sul e traços de pirimifós-metílico no branco de amostra. Chiarello et al²³ também avaliaram amostras procedentes do Rio Grande do Sul por QuEChERS e LC-QTOF-MS, que também indicaram a presença de pirimifós-metílico na faixa de 0,039 mg kg⁻¹ a 0,408 mg kg⁻¹ e carbendazim de 0,011 mg kg⁻¹ a 0,043 mg kg⁻¹. Utilizando as técnicas de QuEChERS e LC-QTOF-MS, Song et al²⁴ reportaram, em um estudo com 22 amostras de farinha de trigo coletadas no comércio da Coreia do Sul, a ocorrência de 13 i.a. que estavam abaixo dos limites de detecção, incluindo a deltametrina, encontrada em nosso estudo. Grande-Martinez et al² detectaram também pirimifós-metílico e clorpirifós utilizando o método QuEChERS adaptado e GC-MS/MS em amostras coletadas em Almería (Espanha). Pirsahab et al²⁵, em seu estudo de avaliação de risco para permetrina, deltametrina e malationa em amostras de farinha de trigo no Irã, verificaram

Tabela 3. Resultados de resíduos de agrotóxicos encontrados em amostras de farinha de trigo Tipo I – comum e orgânica comercializadas no estado de São Paulo

Produto	Nº de amostras analisadas	Ingrediente Ativo (i.a.)	Qtd. Amostras com i.a.	LD (mg kg ⁻¹)	LQ (mg kg ⁻¹)	Trigo LMR (mg kg ⁻¹)	Farinha LMR (mg kg ⁻¹)	Faixa concentração (mg kg ⁻¹)
Farinha de trigo Tipo I – comum	18	bifentrina	02	0,005	0,010	0,7	*	0,017 – 0,043
		clorpirifós	02	0,005	0,010	0,2	*	0,022 – 0,065
		deltametrina	06	0,005	0,010	1,0	*	0,015 – 0,053
		fenitrotiona	03	0,005	0,010	1,0	*	0,016 – 0,026
		lambda-cialotrina	04	0,005	0,010	0,5	*	0,035 – 0,066
		pirimifós-metílico	18	0,005	0,010	5,0	5,0	0,060 – 0,630
Farinha de trigo Orgânica	7	clorpirifós	03	0,005	0,010	0,2	*	<LQ (0,008)**
		deltametrina	02	0,005	0,010	1,0	*	<LQ (0,011)**
		lambda-cialotrina	02	0,005	0,010	0,5	*	ND – 0,031
		pirimifós-metílico	03	0,005	0,010	5,0	5,0	0,023 – 0,173

* Utilizado o LMR para trigo conforme RDC n.º 4/2012 e Anvisa^{8,9}; ** Valor estimado; ND = Não detectado

que deltametrina foi o composto mais detectado em 27 amostras, na faixa de concentração 0,016 mg kg⁻¹ a 0,047 mg kg⁻¹. Rezaei et al¹ pesquisaram 58 ingredientes ativos de agrotóxicos por GC-MS em 40 amostras de farinha de trigo coletadas em Teerã (Irã) e encontraram malationa e 2,4-DDE. Em 2018, a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) apresentou um relatório indicando que os resíduos mais frequentemente encontrados em trigo foram deltametrina e pirimifós-metílico²⁶. Em 2021, o Instituto Brasileiro de Defesa do Consumidor (IDEC) realizou uma pesquisa em 27 produtos alimentícios ultraprocessados, alguns contendo trigo, adquiridos em supermercados da cidade de Campinas-SP. Nesse estudo, foram encontrados agrotóxicos, porém nenhum acima dos limites máximos estabelecidos pela legislação²⁷. Wang et al²⁸ detectaram a presença de cloromequate, piperonil butóxido e cipermetrina utilizando GC-ECD, GC-MS e LC-MSMS em amostras de farinha orgânica coletadas na Alemanha e no Reino Unido.

Desse modo, o estudo corrobora a necessidade de monitoramento contínuo de resíduos de agrotóxicos, ressaltando-se o alto consumo de trigo e seus produtos derivados.

CONCLUSÃO

O método QuEChERS modificado associado às técnicas cromatográficas CG-EM/EM e CLUE-EMAR (*Orbitrap*TM) foi: satisfatório, seletivo, sensível e eficaz nas determinações multirresíduos de agrotóxicos em farinha de trigo para os 124 i.a.

Conforme exposto neste trabalho, detectou-se i.a. abaixo dos LMR nas amostras de farinha Tipo I – comum, salientando-se que, para farinha de trigo orgânica, não é permitida a presença de resíduos de agrotóxicos^{29,30}. Com isso, o trabalho mostrou a necessidade de uma melhor avaliação da matéria-prima que será utilizada para a produção de farinha orgânica, ou seja, além de seguidas as Boas Práticas Agrícolas, deve-se seguir as Boas Práticas de Fabricação (BPF), como a segregação das moendas.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não existir conflitos de interesse.

FINANCIAMENTO

Não declarado.

AGRADECIMENTO

Não declarado.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Os autores declaram que todos contribuíram de forma substancial em todas as etapas deste manuscrito, desde sua concepção e planejamento, análise e interpretação de dados, redação e revisão crítica. Todos aprovaram a sua versão final.

REFERÊNCIAS

1. Rezaei M, Shariatifar N, Shoeibi S, Ahmadi MA, Khaniki GJ. Simultaneous determination of residue from 58 pesticides in the wheat flour consumed in Tehran, Iran by GC/MS. Iran J Pharm Res. 2017;16(3):1048-58.
2. Grande-Martínez Á, Arrebola-Liébanas FJ, Martínez-Vidal JL, Hernández-Torres ME, Garrido-Frenich A. Optimization and validation of a multiresidue pesticide method in rice and wheat flour by modified QuEChERS and GS-MS/MS. Food Anal Methods. 2016;9(2):548-63.
<https://doi.org/10.1007/s12161-015-0214-7>
3. Takeiti, CY. Trigo. Brasília: Agência Embrapa de Informação Tecnológica, 2015. [acesso 2019 Nov 21]. Disponível em:
http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia_de_alimentos/arvore/CONT000girlwnqt02wx5ok05vadr1qrnof0m.html

4. Food and Agriculture Organization of The United Nations – FAO. [acesso 2019 Nov 21]. Disponível em: http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/commodities_by_country
5. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Levantamento sistemático da produção agrícola. [acesso 2019 Nov 21]. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618>
6. Caldas ED, Souza LCK. Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. Rev Saúde Pública. 2000; 34(5):529-37. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102000000500014>
7. Associação Brasileira da Indústria do Trigo – ABITRIGO. Cartilha do Agricultor: O uso correto de agrotóxicos na cultura do trigo. São Paulo: [s.n.], 2017. [acesso 2019 Nov 25]. Disponível em: <http://www.abitrigo.com.br/wp-content/uploads/2019/08/cartilha-do-agricultor.pdf>
8. Ministério da Saúde (BR). Resolução RDC nº 4, de 18 de janeiro de 2012. Dispõe sobre os critérios para a realização de estudos de resíduos de agrotóxicos para fins de registro de agrotóxicos no Brasil. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 23 jan 2012. Seção 1(16):40-6.
9. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. Painel de monografias de Agrotóxicos [acesso 2019 Nov 25]. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/acessoainformacao/dadosabertos/informacoes-analiticas/monografias-de-agrotoxicos>
10. Moragas WM, Schneider MO. Biocidas: suas propriedades e seu histórico no Brasil. Caminhos de Geogr. 2003;3(10):26-40.
11. Sanches SM, Silva CHTP, Campos SX, Vieira EM. Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. Pesticidas. 2003;13:53-8. <http://dx.doi.org/10.5380/pes.v13i0.3165>
12. Fukuto TR. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. Environ Health Perspect. 1990;87:245-54. <https://doi.org/10.1289/ehp.9087245>
13. Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D, Schenck FJ. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. J AOAC Int. 2003;86(2):412-31.
14. Prestes OD, Friggi CA, Adaime MB, Zanella R. QuEChERS – Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. Quim Nova. 2009;32(6):1620-34. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000600046>

15. Prestes OD, Adaime MB, Zanella R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. *Scientia Chromatographica*. 2011;3(1):51-64.
<https://doi.org/10.4322/sc.2011.004>
16. European Commission. Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed. Sante/12682/2019. 2019. [acesso 2019 Nov 21]. Disponível em:
https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/AqcGuidance_SANTE_2019_12682.pdf
17. He Z, Wang L, Peng Y, Luo M, Wang W, Liu X. Multiresidue analysis of over 200 pesticides in cereals using a QuEChERS and gas chromatography-tandem mass spectrometry-based method. *Food Chem*. 2015;169:372-80.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.102>
18. Bordin AB, Minetto L, do Nascimento Filho I, Beal LL, Moura S. Determination of pesticide residues in whole wheat flour using modified QuEChERS and LC-MS/MS. *Food Anal Methods* [Internet]. 2017;10(1):1-9.
<http://dx.doi.org/10.1007/s12161-016-0542-2>
19. Musarurwa H, Chimuka L, Pakade VE, Tavengwa NT. Recent developments and applications of QuEChERS based techniques on food samples during pesticide analysis. *J Food Compos Anal*. 2019;84:103314.
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103314>
20. De Dominicis E, Commissati I, Suman M. Targeted screening of pesticides, veterinary drugs and mycotoxins in bakery ingredients and food commodities by liquid chromatography-high-resolution single-stage Orbitrap mass spectrometry. *J Mass Spectrom*. 2012;47(9):1232-41.
<https://doi.org/10.1002/jms.3074>
21. Rajski Ł, Petromelidou S, Díaz-Galiano FJ, Ferrer C, Fernández-Alba AR. Improving the simultaneous target and non-target analysis LC-amenable pesticide residues using high speed Orbitrap mass spectrometry with combined multiple acquisition modes. *Talanta*. 2021;228:122241.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122241>
22. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA. Relatório das Análises de Amostras Monitoradas no período de 2013 a 2015; 2016. Gerência-Geral de Toxicologia. Brasília, 25 de novembro de 2016. [acesso 2019 Nov 25]. Disponível em:
<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos/arquivos/3778json-file-1>

23. Chiarello M, Moura S. Multi-pesticide residue analysis by high resolution mass spectrometry in complementary matrices: wheat flour, lettuce and apple samples. Anal Methods. 2018;10(32):3958-67. <https://doi.org/10.1039/C8AY01083H>
24. Song NE, Kim DB, Lim TG, Lee YY, Yoo M, Nam TG. Determining pesticide residues in wheat flour by ultrahigh-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry with QuEChERS extraction. Food Addit Contam – Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 2019;36(9):1337-47. <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1628356>
25. Pirsahab M, Fakhri Y, Karami M, Akbarzadeh R, Safaei Z, Fatahi N et al. Measurement of permethrin, deltamethrin and malathion pesticide residues in the wheat flour and breads and probabilistic health risk assessment: a case study in Kermanshah, Iran. Int J Environ Anal Chem. 2019;99(13):1353-64. <https://doi.org/10.1080/03067319.2019.1622009>
26. Medina-Pastor P, Triacchini G. The 2018 European Union report on pesticide residues in food. EFSA J. 2020;18(4):1-103. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6057>
27. Instituto Brasileiro de Defesa do Consumidor – IDEC. Cartilha Tem veneno nesse pacote – O perigo duplo dos ultraprocessados: além dos malefícios já conhecidos para a saúde, eles também estão contaminados por agrotóxicos – volume I. São Paulo: [s.n.]; 2021. [acesso 2022 Jul 27], Disponível em: https://idec.org.br/system/files/ferramentas/idec_cartilha_tem-veneno-nesse-pacote.pdf
28. Wang J, Hasanalieva G, Wood L, Anagnostopoulos C, Ampadogiannis G, Bempelou E, et al. Effect of wheat species (*Triticum aestivum* vs *T. spelta*), farming system (organic vs conventional) and flour type (wholegrain vs white) on composition of wheat flour – Results of a retail survey in the UK and Germany – 3. Pesticide residue content. Food Chem X. 2020;7:100089. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2020.100089>
29. Presidência da República (BR). Atos do Poder Legislativo. Decreto nº 10.831 de 23 de dezembro de 2003. Dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 24 dez 2003. Seção 1 (250):8-9.
30. Presidência da República. Atos do Poder Executivo. Decreto nº 6.323 de 27 de dezembro de 2007. Regulamenta a Lei no 10.831, de 23 de dezembro de 2003, que dispõe sobre a agricultura orgânica, e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 28 dez 2007. Seção 1 (249):2-8.





Suplemento alimentar de vitamina C: fiscalização durante o período de adequação à nova legislação

Vitamin C dietary supplement: inspection during adequacy period of new legislation

Lucile Tiemi Abe-Matsumoto* , Nelson Aranha Dias , Viviane de Paula Acosta Iglesia ,
Mahyara Markievicz Mancio Kus-Yamashita 

Núcleo de Química, Física e Sensorial, Centro de Alimentos, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil.

*Autor de correspondência/Corresponding author: lucile.matsumoto@ial.sp.gov.br

Recebido/Received: 27.08.2021 - Aceito/Accepted: 31.01.2022

RESUMO

Os suplementos à base de vitamina C são amplamente consumidos pela população, evidenciando a importância da fiscalização desses produtos. Em julho de 2018, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) publicou as novas regulamentações sobre suplementos alimentares, estabelecendo-se o prazo de 60 meses para as empresas se adequarem a essas normas. O presente trabalho teve como objetivo determinar os teores de vitamina C, comparar os valores analisados com os declarados na informação nutricional e avaliar os dizeres de rotulagem em produtos à base dessa vitamina. Os teores de vitamina C foram determinados por titulação potenciométrica e as análises de rotulagem foram realizadas com base nas legislações da ANVISA em doze amostras de suplementos colhidos pelas Vigilâncias Sanitárias do Estado de São Paulo. Os teores de vitamina C avaliados estavam de acordo com os declarados na informação nutricional do rótulo, com exceção de uma amostra que apresentou teor abaixo do valor declarado. Em relação aos dizeres de rotulagem, sete amostras (58%) apresentaram um ou mais itens em desacordo com a legislação, mostrando a necessidade de monitoramento constante desse tipo de produto. O trabalho representa um estudo preliminar de avaliação dos suplementos no período de adequação às novas regulamentações.

Palavras-chave. Ácido Ascórbico, Suplemento Alimentar, Titulação, Vitamina, Rotulagem de Produtos.

ABSTRACT

Vitamin C-based supplements are widely consumed by the population, highlighting the importance of monitoring these products. In July 2018, the ANVISA (National Health Surveillance Agency) published new regulations for dietary supplements, setting a 60 months deadline for companies to comply with these standards. The objective of the present work was to evaluate the contents of vitamin C, and compare the analyzed/real values with those reported on the nutrition facts label, and to evaluate the labeling of vitamin supplements. Vitamin C contents were determined by potentiometric titration, and labeling analysis were performed based on ANVISA legislation in twelve samples of supplements collected by the Sanitary Surveillance of the State of São Paulo. The contents of vitamin C were in accordance with those declared in the nutritional information on the label, with the exception of one sample that presented content below the declared value. Regarding the labeling analysis, seven samples (58%) presented one or more items in disagreement with the legislation, showing the need for constant monitoring of this type of product. The work represents a preliminary study to evaluate the supplements in the adequacy period of new regulations.

Keywords. Ascorbic Acid, Dietary Supplement, Titration, Vitamin, Product Labeling.

INTRODUÇÃO

A vitamina C ou ácido ascórbico (AA) é uma vitamina hidrossolúvel que desempenha importantes funções no metabolismo humano. É necessária para a síntese de colágeno e de células sanguíneas e contribui para o sistema imune, além de auxiliar no metabolismo do ferro, promovendo sua absorção. Tem a função de antioxidante, ou seja, possui a capacidade de neutralizar os radicais livres, porém, é muito instável em solução, sendo facilmente degradada por oxidação em contato com o ar ou com a exposição à luz ultravioleta, e o aquecimento acelera ainda mais o processo de degradação¹.

Devido à sua importância à saúde, os suplementos alimentares contendo vitamina C representam uma das categorias mais tradicionais e mais consumidas pela população, que busca como objetivos, prevenção do envelhecimento, melhora da imunidade ou simplesmente a melhora da saúde².

O Programa Paulista de Análise Fiscal de Alimentos (PP) é desenvolvido pelo Centro de Vigilância Sanitária (CVS) e o Instituto Adolfo Lutz (IAL), em conjunto com os grupos regionais de Vigilância Sanitária (GVS), Laboratórios Regionais do IAL e a Coordenação de Vigilância em Saúde da Secretaria Municipal de Saúde de São Paulo (COVISA), desde 1995. O programa tem como principais objetivos, monitorar a qualidade sanitária dos produtos alimentícios expostos no comércio e também, a qualidade sanitária dos estabelecimentos que os comercializam, aplicar a legislação sanitária sobre infrações encontradas nos produtos e/ou nos estabelecimentos comerciais e identificar setores do comércio e/ou indústria de alimentos que necessitam de intervenção preventiva. A escolha dos produtos alimentícios a serem monitorados no PP é determinada avaliando-se os potenciais riscos à saúde, amplitude do consumo, participação nos hábitos alimentares nacionais e regionais do estado, além de sugestões resultantes de denúncias do consumidor e das experiências da fiscalização. Os produtos incluídos nos programas de monitoramento da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), tais como o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) e o Pró-Iodo (avaliação do iodo no sal) também costumam fazer parte do PP³.

Os suplementos contendo vitamina C foram selecionados para compor a lista de alimentos a serem monitorados no PP 2019 devido ao elevado consumo desses produtos pela população. Além disso, a legislação referente aos suplementos vitamínicos e/ou minerais – Portaria da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS/MS) nº 32/1998 – foi revogada com a publicação do novo marco regulatório sobre suplementos alimentares da ANVISA em julho de 2018^{4,5}. A nova regulamentação determinou diversas mudanças, tanto na composição quanto nos dizeres de rotulagem dos suplementos, estabelecendo um prazo de 60 meses para as empresas se adequarem às novas normas⁵. Portanto, no período do estudo, foram coletadas, além dos suplementos alimentares já adequados às novas legislações, amostras designadas como suplemento vitamínico e como medicamento, os quais seguiam as legislações anteriores, Portarias SVS/MS nº 32/1998 e nº 40/1998, respectivamente^{4,6}.

Tendo em vista o alto consumo de produtos à base de vitamina C pela população, torna-se importante verificar se as concentrações de vitamina C em suplementos comercializados à população estão de acordo com os valores declarados no rótulo. Em razão das diversas mudanças estabelecidas pelas novas regulamentações para suplementos alimentares, houve a necessidade de um estudo preliminar de avaliação dos suplementos no período de adequação às novas regulamentações. Assim, o trabalho teve como objetivos determinar os teores de vitamina C em produtos à base dessa vitamina, comparar os valores analisados com os declarados na informação nutricional e avaliar os dizeres de rotulagem.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

No período entre maio e novembro de 2019, foram coletadas 12 amostras de produtos à base de vitamina C (suplemento vitamínico, medicamento e suplemento alimentar) em diferentes pontos do comércio da cidade de São Paulo, pelas Vigilâncias Sanitárias, em atendimento ao PP 2019. As amostras eram compostas por comprimidos, comprimidos efervescentes e cápsulas gelatinosas duras, visto que os suplementos alimentares devem ser apresentados em formas farmacêuticas. Estabeleceu-se uma quantidade limitada de amostras para uma análise preliminar dos suplementos nesta fase de adequação às novas legislações e os produtos foram coletados aleatoriamente, de acordo com a disponibilidade no comércio.

Padrões e reagentes

O padrão de ácido L-ascórbico ($\geq 99,9\%$) foi adquirido da Tokyo Chemical (Tóquio, Japão). Os reagentes de grau analítico, ácido sulfúrico (H_2SO_4), iodeto de potássio (KI) e iodato de potássio (KIO_3), foram adquiridos da Synth (São Paulo, Brasil).

Determinação de peso médio

O peso médio das amostras foi determinado por método gravimétrico, em balança analítica modelo S-200 (Bosh, Gerlingen, Alemanha). Nas amostras em forma de comprimidos, foram realizadas pesagens diretas do comprimido íntegro. Em amostras na forma de cápsulas gelatinosas duras, foram realizadas pesagens antes e após o esvaziamento do conteúdo em pó, para se obter o peso médio do conteúdo. Em ambos os casos, calculou-se a média e o desvio padrão das massas de 10 e de 20 unidades para verificar se haviam diferenças significativas entre as duas médias.

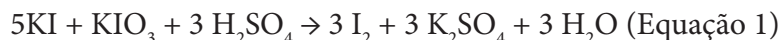
Preparo das amostras

Dez unidades das amostras em forma de comprimidos foram pesadas para cálculo de peso médio. As amostras foram pulverizadas em almofariz até a obtenção de um pó fino e homogêneo. Para as amostras em cápsulas gelatinosas duras, o conteúdo em pó de dez unidades foram homogeneizadas manualmente em tubo tipo Falcon de 50 mL.

Determinação de vitamina C

As análises de vitamina C foram realizadas por titulação iodométrica, utilizando titulador potenciométrico automático com eletrodo de anel de platina controlado pelo Software Tiamo® (Metrohm Pensalab, Herisau, Suíça), de acordo com Abe-Matsumoto et al⁷. Uma quantidade entre 200 e 600 mg da amostra pulverizada foi pesada em béquer de 150 mL. Amostras que declaravam 1000

mg de vitamina C foram preparadas de forma diferente devido à sua alta concentração em relação às demais. Um comprimido foi dissolvido em balão volumétrico de 500 mL e uma alíquota de 5 mL foi pipetada em béquer para proceder a titulação. Foram adicionados ao béquer, 10 mL de H₂SO₄ 20% (v/v) e 1 mL de KI 10% (v/v) e a amostra foi titulada com solução de KIO₃ 0,002 M. Cada mL de solução de KIO₃ gasto na titulação equivale a 0,8806 mg de vitamina C, conforme estequiometria das reações apresentadas abaixo:



Os resultados foram expressos em mg de vitamina C por porção. A porção corresponde à quantidade de suplemento para consumo diário indicada pelo fabricante no rótulo dos produtos.

Análise de rotulagem

A avaliação da rotulagem foi realizada utilizando a ficha de análise de rotulagem de suplemento alimentar contendo itens referentes às informações constantes no painel principal e demais painéis do rótulo. Seguem abaixo as descrições dos principais itens constantes na ficha de análise.

Painel principal: denominação de venda (suplemento alimentar + forma farmacêutica)^{5,8}; declaração do uso de aromas^{9,10}; declaração do uso de corantes⁹; marca⁸; e conteúdo líquido⁸.

Demais painéis: lista de ingredientes⁸; constituintes autorizados^{11,12}; aditivos¹³; dados do fabricante/produtor/fracionador (razão social, endereço e CNPJ)⁸; dados do importador⁸; lote⁸; validade⁸; expressão “Contém glúten” ou “Não contém glúten”¹⁴; expressão “Alérgicos: contém...” ou “Alérgicos: contém derivados de...” ou “Alérgicos: contém... e derivados de...” ou “Alérgicos: pode conter...”¹⁵; expressão “Contém lactose”¹⁶; expressões que podem induzir o consumidor a erro, engano ou equívoco^{8,9,17}; expressão: “Indústria Brasileira”⁸; recomendação de uso/quantidade/frequência⁵; frases obrigatórias de advertência⁵; dados de conservação/instrução de conservação após aberto⁵; alegações somente autorizadas¹¹; limites mínimo e máximo de uso¹¹; e rotulagem complementar¹¹.

Informação Nutricional¹⁸: porção; informação nutricional; e % valor diário (% VD).

Análise de dados

As concentrações de vitamina C foram expressas como média ± desvio padrão (n = 3). Para verificar as diferenças entre os pesos médios de 10 e 20 comprimidos/cápsulas, foram realizados o teste F para comparação das variâncias e o teste t para comparação das médias dos resultados (p < 0,05). As análises estatísticas foram realizadas usando o Microsoft Office Excel® (2010). O nível de significância estatística foi estabelecido em 5% para todas as análises.

RESULTADOS

Peso médio das amostras

O resultado da análise comparativa entre o peso médio de 10 e de 20 unidades em suplementos de diferentes marcas e concentrações de vitamina C, não mostrou diferenças significativas entre as duas médias (**Tabela 1**).

Tabela 1. Comparação entre o peso médio (g) dos comprimidos, comprimidos efervescentes e cápsulas gelatinosas duras obtidos pela pesagem de 10 e de 20 unidades

Amostra	Média ± DP (10 unidades)	CV (%)	Média ± DP (20 unidades)	CV (%)
1	0,439 ± 0,018 ^a	4,1	0,439 ± 0,019 ^a	4,5
2	0,505 ± 0,006 ^a	1,2	0,515 ± 0,020 ^a	3,8
3	1,253 ± 0,039 ^a	3,1	1,250 ± 0,039 ^a	3,1
4	0,445 ± 0,017 ^a	3,8	0,436 ± 0,013 ^a	3,0
5	2,953 ± 0,090 ^a	1,2	2,948 ± 0,051 ^a	1,1
6	0,471 ± 0,010 ^a	2,0	0,473 ± 0,007 ^a	1,5
7	0,506 ± 0,018 ^a	3,6	0,510 ± 0,019 ^a	3,7
8	0,697 ± 0,006 ^a	0,9	0,699 ± 0,007 ^a	1,0
9	0,894 ± 0,024 ^a	2,7	0,883 ± 0,023 ^a	3,5
10	0,695 ± 0,010 ^a	1,5	0,698 ± 0,007 ^a	1,0
11	0,915 ± 0,023 ^a	2,5	0,901 ± 0,028 ^a	3,1
12	1,153 ± 0,040 ^a	3,5	1,151 ± 0,029 ^a	2,6

Valores com letras iguais sobrescritas na mesma linha não diferem entre si estatisticamente, com nível de significância 5% pelo teste *t*; DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação

Conteúdo de vitamina C

A legislação brasileira, Resolução RDC ANVISA nº 360/2003, permite a tolerância de ± 20% em relação aos valores declarados no rótulo¹⁸. Com exceção de um suplemento que apresentou teor 71% abaixo do valor declarado, todas as amostras apresentaram teores de vitamina C de acordo com o valor declarado no rótulo, considerando a tolerância permitida pela legislação (**Tabela 2**).

Tabela 2. Designação das amostras analisadas de acordo com as respectivas legislações, resultados das análises de vitamina C em comparação com os valores declarados no rótulo e resultado das análises de rotulagem

Amostra	Designação	Legislações*	Vitamina C (mg/porção)		% variação	Análise de rotulagem
			Declarado	Analisado**		
1	Suplemento de vitamina C	Antiga	45	50 ± 1,1	11,8	Satisfatória com adequação
2	Ácido ascórbico	Antiga	45	42 ± 0,9	-6,1	Insatisfatória
3	Suplemento vitamínico Vitamina C	Antiga	45	42 ± 0,3	-6,5	Satisfatória com adequação
4	Suplemento de vitamina C	Antiga	45	53 ± 1,6	16,7	Satisfatória com adequação
5	Ácido ascórbico	Antiga	1000	982 ± 0,1	-1,8	Satisfatória com adequação
6	Suplemento alimentar de vitamina C em cápsulas	Nova	350	307 ± 2,6	-12,2	Insatisfatória
7	Suplemento alimentar de vitamina C em cápsulas	Nova	45	45 ± 1,3	0,3	Insatisfatória
8	Suplemento alimentar de vitamina C em cápsulas	Nova	500	587 ± 7,0	17,4	Satisfatória
9	Suplemento alimentar de vitamina C em cápsulas	Nova	1000	908 ± 2,8	-9,2	Insatisfatória
10	Suplemento alimentar de vitamina C em comprimido de liberação prolongada	Nova	500	497 ± 7,4	-0,6	Insatisfatória
11	Dietary supplement vitamin C	Nova	500	506 ± 2,7	1,2	Insatisfatória
12	Ácido ascórbico vit-C	Nova	1000	298 ± 3,4	-70,2	Insatisfatória

* Portaria SVS/MS nº 32/1998 (antiga); Portaria SVS/MS nº 40/1998 (antiga), Resolução ANVISA nº 243/2018 (nova)

** Média ± desvio padrão (n = 3)

Análise de rotulagem

Na avaliação dos dizeres de rotulagem, 58% das amostras apresentaram um ou mais itens em desacordo com a legislação (**Tabela 2**). As principais inconformidades foram observadas para o item referente à informação nutricional, seguido da denominação de venda e ausência da indicação de grupo populacional para o qual o produto é indicado. A porcentagem de amostras que apresentou resultado insatisfatório para cada informação da rotulagem está representada na **Figura**.

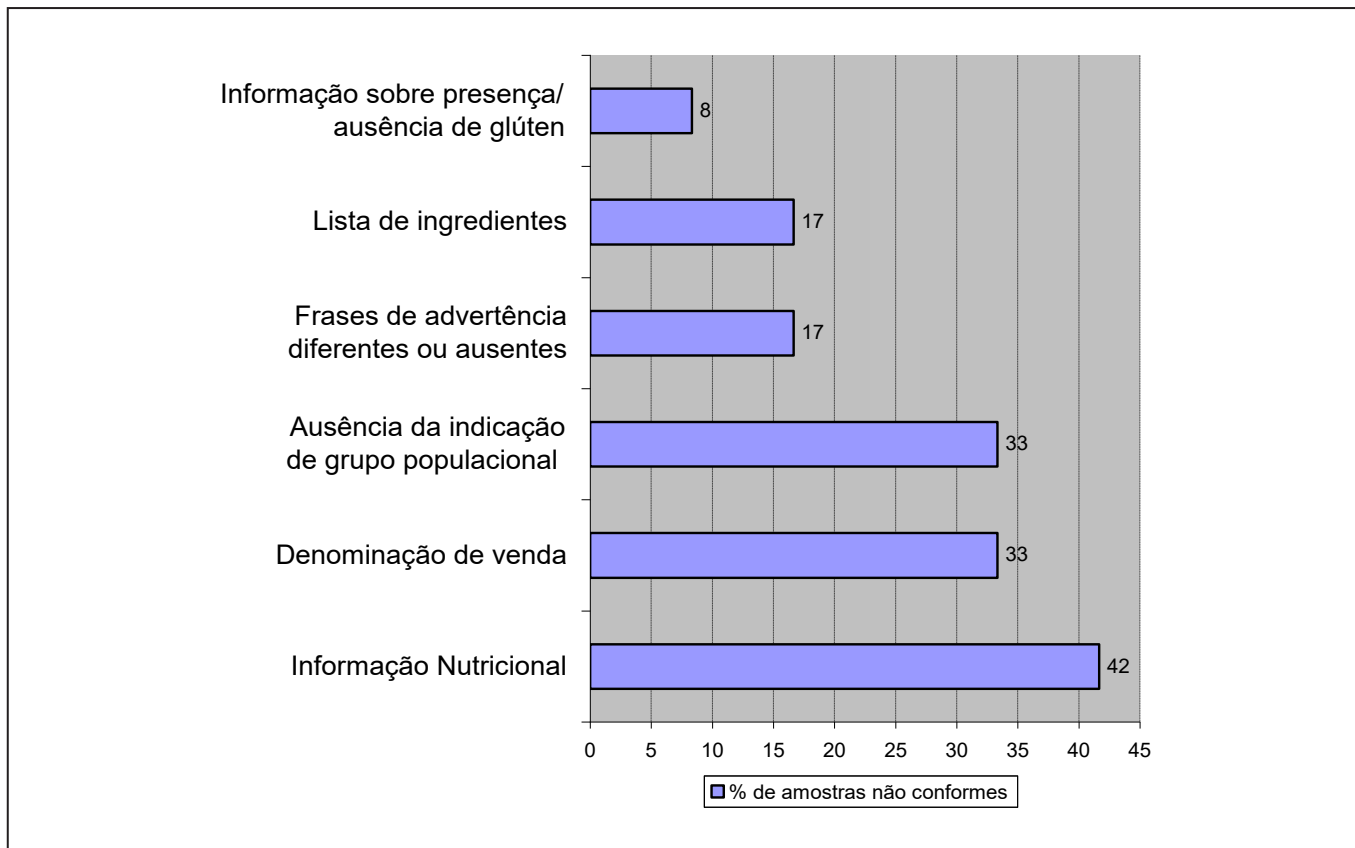


Figura. Porcentagem de amostras com resultado insatisfatório para cada informação da rotulagem

DISCUSSÃO

Tanto a farmacopéia brasileira como a americana estabelecem a quantidade de 20 unidades para o cálculo de peso médio para análise de medicamentos^{19,20}. Os suplementos alimentares, apesar de sua apresentação em formas farmacêuticas, são classificados como alimentos e não como medicamentos. Tendo em vista que o peso médio de 10 e de 20 comprimidos/cápsulas não apresentou diferenças significativas em nenhuma das amostras avaliadas, padronizou-se no Procedimento Operacional Padrão (POP) da metodologia de análise de vitamina C em suplementos, a quantidade de 10 unidades para o cálculo de peso médio. Este procedimento contribuiu para a otimização do tempo de preparo da amostra para análise.

A maioria das amostras apresentou concentrações de vitamina C compatível com o valor declarado no rótulo, levando-se em consideração a tolerância de 20% permitida pela legislação. A única amostra que apresentou teor abaixo do declarado, informava no rótulo a quantidade de 1000 mg de vitamina C na porção de um tablete, porém, o resultado analítico revelou a concentração de apenas 298 mg dessa vitamina, ou seja, 70% inferior ao valor declarado. Isso representa um exemplo de prejuízo econômico e à saúde por quem compra e consome um produto com informações falsas no rótulo. Para os produtos que apresentam micronutrientes em quantidade superior a esta tolerância, a empresa responsável deve manter à disposição os estudos que justifiquem tal variação¹⁸. No caso da vitamina C, é consenso que ela é facilmente degradada, portanto, encontrar teor deste micronutriente acima do valor declarado seria esperado. Porém, nenhuma das amostras apresentou sobredosagem de vitamina C em concentrações acima de 20% do valor declarado. Estudos de estabilidade mostraram degradação de até 19% no teor de vitamina C em 90% das amostras de suplementos vitamínicos, após 12 meses de armazenamento em temperatura ambiente²¹. Portanto, a sobredosagem acima de 20% poderia ser muito bem justificada, já que o prazo de validade da maioria dos produtos avaliados era de aproximadamente 24 meses. A degradação química da vitamina C caracteriza-se por sua degradação a ácido dehidroascórbico, seguida por sua hidrólise a ácido 2,3-dicetogulônico e sua subsequente oxidação, desidratação e polimerização a um composto não nutricional. Os principais fatores que influenciam a velocidade e o mecanismo de degradação são o pH, concentração de oxigênio e presença de íons metálicos como o cobre e o ferro, porém, a composição dos suplementos, o tipo de microencapsulação e as diferentes formas de apresentação também podem influenciar na estabilidade da vitamina C²².

A Resolução ANVISA RDC nº 243/2018 estabelece o prazo de 60 meses para as empresas se adequarem às novas normas, possibilitando a comercialização de produtos fabricados e importados até o final de seus prazos de validade. Porém, a adequação deve ser feita de maneira integral, em ato único, ou seja, caso a empresa deseje utilizar algum dos requisitos dispostos na norma, como uma alegação, deverá atender todos os demais itens do regulamento⁵. Do total de amostras avaliadas, sete se apresentavam como suplemento alimentar, designação estabelecida pela nova regulamentação. Os demais produtos apresentavam-se como suplemento vitamínico, suplemento de vitamina C e ácido ascórbico, indicando que ainda seguiam a norma anterior, não representando, porém, uma inconformidade, já que o prazo de adequação ainda não se finalizou⁵. Nesses casos, não foi possível uma avaliação completa da rotulagem, pois as legislações anteriores, Portarias SVS/MS nº 32/1998 e nº 40/1998, foram revogadas, havendo somente a necessidade de adequação destes rótulos às novas regulamentações até o prazo estabelecido de 60 meses⁴⁻⁶.

A Resolução ANVISA RDC nº 360/2003 define três modelos de rotulagem nutricional, dependendo do espaço disponível no rótulo, portanto, a disposição, o realce e a ordem da informação nutricional devem seguir os modelos apresentados no Anexo B dessa resolução¹⁸. A maioria das inconformidades referentes à informação nutricional estavam relacionadas com o modelo da tabela que se apresentava diferente do previsto, especificamente na disposição do rodapé. Ainda em relação à informação nutricional, uma amostra apresentou a indicação da medida caseira e da porção em ordem inversa, enquanto outra amostra não apresentou a porcentagem do valor diário (% VD) do grupo populacional para o qual o suplemento era indicado^{5,18}.

Em relação à denominação de venda, uma amostra não a apresentou de forma correta, pois constava no painel principal apenas termos como “ácido ascórbico”, “vit-C” e “vitamin C”. Em outras duas amostras, a denominação de venda estava correta, porém, localizada no painel lateral e não no painel principal, como estabelece a legislação⁸.

Além da necessidade de cumprir os requisitos estabelecidos no Regulamento Técnico para rotulagem de alimentos embalados, o rótulo dos suplementos alimentares deve ainda apresentar informações sobre a quantidade e frequência de consumo para cada um dos grupos populacionais para qual o produto é recomendado. A indicação do grupo populacional é necessária, pois, as recomendações de ingestão de nutrientes variam de acordo com a idade e condições fisiológicas do indivíduo⁵. No entanto, do total de amostras avaliadas, quatro (33%) não apresentaram essa indicação, podendo levar o consumidor a ingerir concentrações inadequadas de vitamina C por falta de informação no rótulo. Há ainda a obrigatoriedade de constar no rótulo as seguintes frases de advertência em destaque e negrito: “Este produto não é um medicamento”, “Não exceder a recomendação diária de consumo indicada na embalagem” e “Mantenha fora do alcance de crianças”, porém, estas estavam ausentes em duas (17%) amostras avaliadas⁵. Tais frases têm como objetivo explicitar que suplementos alimentares não possuem finalidades medicamentosas ou terapêuticas e assegurar seu uso correto e seguro pelos consumidores.

A lista de ingredientes é uma informação obrigatória na rotulagem dos alimentos. Os constituintes autorizados e os aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia para uso em suplementos alimentares, estão listados respectivamente na IN ANVISA nº 28/2018, atualizada pela IN nº 76/2020 e na Resolução ANVISA RDC nº 239/2018¹¹⁻¹³. Em relação à lista de ingredientes das amostras avaliadas, um suplemento declarou somente o termo “Vitamina C” ao invés de especificar qual a fonte de vitamina C. Segundo a IN nº 28/2018, os constituintes autorizados como fonte de vitamina C são o ácido ascórbico, ascorbato de sódio, ascorbato de cálcio e palmitato de ascorbila, portanto, um desses compostos deveria ser identificado como fonte de vitamina C na lista de ingredientes¹¹. Essa mesma amostra apresentou um aditivo com nome incompleto (celulose), além de não citar as funções deste e de outros dois aditivos (goma guar e fosfato tricálcico), conforme exigência da legislação^{8,13}.

A Lei nº 10.674/2003 obriga que os produtos alimentícios comercializados informem sobre a presença de glúten, como medida preventiva e de controle da doença celíaca, devendo conter em seu rótulo as inscrições “Contém glúten” ou “Não contém glúten”, conforme o caso¹⁴. Embora a maioria dos suplementos não apresente ingredientes que possam conter glúten, essa indicação é obrigatória, portanto, uma das amostras estava em desacordo com a legislação por não apresentar o devido esclarecimento. A informação sobre a presença ou não de glúten nos rótulos dos alimentos é imprescindível, constituindo uma das formas de atendimento ao Código de Defesa do Consumidor, uma vez que este garante ao consumidor o acesso à informação adequada, contribuindo para uma melhor qualidade de vida, especialmente do celíaco¹⁷.

CONCLUSÃO

A maioria das amostras avaliadas apresentou concentração de vitamina C de acordo com o valor declarado na informação nutricional do rótulo, com exceção de uma amostra que apresentou teor abaixo do valor declarado.

As análises de rotulagem estavam em desacordo com a legislação em mais de 50% das amostras avaliadas, especialmente naquelas que seguem as novas regulamentações.

O presente trabalho, portanto, mostrou-se essencial, representando um estudo preliminar de avaliação dos suplementos no período de adequação às novas regulamentações. Diante das não conformidades observadas, conclui-se que há uma necessidade urgente de maior controle de qualidade,

monitoramento contínuo e ações de vigilância. Tais medidas contribuirão para garantir o direito do consumidor em adquirir suplementos alimentares seguros com informações confiáveis sobre seu conteúdo e seus benefícios.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não existir conflitos de interesse.

FINANCIAMENTO

Não declarado.

AGRADECIMENTO

Não declarado.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Concepção e participação em todas as etapas de produção do artigo, responsável pela realização das análises e redação: Lucile T. Abe-Matsumoto; Análises de vitamina C e elaboração do rascunho: Nelson A. Dias; Análises de rotulagem e revisão crítica do conteúdo: Viviane de Paula A. Iglesia; Planejamento e revisão crítica do conteúdo: Mahyara M.M. Kus-Yamashita.

REFERÊNCIAS

1. FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nation/World Health Organization. Vitamin and mineral requirements in human nutrition: Report of a joint FAO/WHO expert consultation. Bangkok, Thailand, Second Edition, 2004.
2. Brauchla M, Dekker MJ, Rehm CD. Trends in vitamin C consumption in the United States: 1999–2018. *Nutrients*. 2021;13(2):420.
<https://doi.org/10.3390/nu13020420>
3. Centro de Vigilância Sanitária (CVS) da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Programas e Projetos. Programa Paulista de Alimentos. [acesso 2021 Ago 09]. Disponível em:
http://www.cvs.saude.sp.gov.br/prog_det.asp?te_codigo=1&pr_codigo=6
4. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 32, de 13 de janeiro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Suplementos Vitamínicos e ou de Minerais. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]. Brasília, DF, 15 jan 1998. Seção 1(10-E):9-10.
5. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 243, de 26 de julho de 2018. Dispõe sobre os requisitos sanitários dos suplementos alimentares. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 27 jul 2018. Seção 1(144):100-1.

6. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 40, de 13 de janeiro de 1998. Regulamento que estabelece normas para níveis de dosagens diárias de vitaminas e minerais em medicamentos. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]. Brasília, DF, 16 jan 1998. Seção 1(11-E):11-2.
7. Abe-Matsumoto LT, Sampaio GR, Bastos DHM. Do the labels of vitamin A, C, and E supplements reflect actual vitamin content in commercial supplements? J Food Comp Anal. 2018;72:141-9.
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.07.001>
8. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 259, de 20 de setembro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico sobre Rotulagem de Alimentos Embalados. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 23 set 2002. Seção 1(184):33-4.
9. Brasil. Decreto-Lei nº 986, de 21 de outubro de 1969. Institui normas básicas de alimentos. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]. Brasília, DF, 21 out 1969. Disponível em:
<https://legislacao.presidencia.gov.br/atos/?tipo=DEL&numero=986&ano=1969&ato=cdeETUU1UMjRVT87f>
10. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Informe Técnico nº 26, de 14 de junho de 2007. Procedimentos para a indicação do uso de aroma na rotulagem de alimentos. Brasília, DF. Disponível em:
https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/informe-tecnico-no-26-de-14-de-junho-de-2007_anvisa.pdf/view
11. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 28, de 26 de julho de 2018. Estabelece as listas de constituintes, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar dos suplementos alimentares. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 27 jul 2018. Seção 1(144):141-54.
12. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 76, de 05 de novembro de 2020. Dispõe sobre a atualização das listas de constituintes, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar dos suplementos alimentares. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 11 nov 2020. Seção 1(215):75-7.
13. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 239, de 26 de julho de 2018. Estabelece os aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia autorizados para uso em suplementos alimentares. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 27 jul 2018. Seção 1(144):90-7.
14. Brasil. Lei nº 10.674, de 16 de maio de 2003. Obriga a que os produtos alimentícios comercializados informem sobre a presença de glúten, como medida preventiva e de controle da doença celíaca. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 19 mai 2003. Seção 1(94):1.



15. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 26, de 2 de julho de 2015. Dispõe sobre os requisitos para rotulagem obrigatória dos principais alimentos que causam alergias alimentares. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 03 jul 2015. Seção 1(125):52-3.
16. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 136, de 08 de fevereiro de 2017. Estabelece os requisitos para declaração obrigatória da presença de lactose nos rótulos dos alimentos. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 09 fev 2017. Seção 1(29):44.
17. Brasil. Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1990. Dispõe sobre a proteção do consumidor e dá outras providências. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]. Brasília, DF, 12 set 1990. Seção 1(176 Supl):1-8.
18. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Aprova o Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional. Diário Oficial União. Brasília, DF, 26 dez 2003. Seção 1(251):33-4.
19. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasília – DF – Brasil). Farmacopeia Brasileira. 6. ed. Brasília (DF): ANVISA; 2019. Disponível em:
<http://portal.anvisa.gov.br>
20. USP. The United States Pharmacopeia (Rockville – MD - United States of America). The United States Pharmacopeial Convention. 42nd. Rockville (USA); 2019.
21. Abe-Matsumoto LT, Sampaio GR, Bastos DHM. Stability of antioxidant vitamins in commercial vitamin supplements. Braz J Pharm Sci. 2018;54(4):1-11,e17700.
<https://doi.org/10.1590/s2175-97902018000417700>
22. Gregory JF. Vitamins. In: Damodaran S, Parkin KL, Fennema OR, editor. Fennema's Food Chemistry. 4. ed. Boca Raton: CRC Press; 2007. p. 439-522.





Determination of lipids and fatty acids in infant formula: comparison of the conventional x direct method

Lipídios e ácidos graxos em fórmula infantil: comparação de metodologias de extração convencional x direta

Mahyara Markievicz Mancio Kus-Yamashita* , Sabria Aued-Pimentel¹ , Jorge Mancini-Filho² 

¹ Núcleo de Química, Física e Sensorial, Centro de Alimentos, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brazil.

² Laboratório de Lípidos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

*Corresponding author/Autor de correspondência: mahyara.kus@ial.sp.gov.br

Received/Recebido: 06.08.2021 - Accepted/Aceito: 18.02.2022

ABSTRACT

Lipids in food are conventionally analyzed in two stages: extraction with organic solvent and fat esterification reaction, in this case, the type of fat of each food influences the choice of extraction and esterification reagents. In the direct method, such procedures are performed in one step. This work compared the conventional extraction method and quantification of lipids and fatty acids, with a direct method in infant formula. A reference sample of infant formula containing certified lipids and fatty acids values from the National Institute of Standards and Technology was used. The conventional method for lipid analysis used the acid hydrolysis method; for the determination of fatty acids, the fats were extracted with a mixture of ethyl ether and petroleum ether. The direct method consisted of direct trans esterification with sodium methoxide. In the analysis of fatty acids, the majority of the results showed statistically equal values ($\alpha < 0.05$) for both methods. The direct method proved suitable, mainly because of reduction in analytical time and quantity of solvents.

Keywords. Direct Transesterification, Fat, Fatty Acid Methyl Ester, Gas Chromatography.

RESUMO

Os lipídios em alimentos são analisados, de forma convencional, em duas etapas: extração com solvente orgânico e reação de esterificação da gordura, neste caso o tipo de gordura de cada alimento influencia na escolha dos reagentes da extração e esterificação. No método direto, estes procedimentos são realizados em uma etapa única. Este trabalho comparou a metodologia convencional de extração e quantificação de lipídios e ácidos graxos, com um método direto em fórmula infantil. Foi utilizada uma amostra de referência de fórmula infantil com valores certificados para lipídios e ácidos graxos da *Nacional Institute of Standards and Technology*. A metodologia convencional para a análise de lipídios empregou método com hidrólise ácida; para a determinação dos ácidos graxos, a gordura foi extraída com uma mistura de éter etílico e éter de petróleo. O método direto fundamentou-se na transesterificação direta com metóxido de sódio. Na análise dos ácidos graxos, a maioria dos resultados demonstrou valores estatisticamente iguais ($\alpha < 0,05$) para os dois métodos. O método direto demonstrou ser apropriado, principalmente pela diminuição do tempo de análise e quantidade de solventes.

Palavras-chave. Transesterificação Direta, Gordura, Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos, Cromatografia Gasosa.

INTRODUCTION

Since the 1950s, the idea of feeding children using infant formulas since birth has been emerged. In recent years, there has been a noticeable improvement in infant formulas, and currently, there are several options that are increasingly being supplemented to become similar to the composition of human breast milk¹.

During the commercial preparation of infant formulas, a part of the milk fat is replaced by a mixture of vegetable oils, among them: corn oil, canola oil, coconut oil, sunflower oil, palm oil and palm kernel oil. The addition of these oils provides a change in the composition of fatty acids from milk, with the addition of essential fatty acids (FAs), mainly linoleic acid and α -linolenic, thus making the composition closer to that of human milk^{1,2}. The constituents of infant formula raw materials are blended, pasteurized, homogenized, concentrated, and dried or sterilized by manufacturers to ensure that these products have good quality and long shelf life³.

Lipid extraction from foodstuffs is traditionally carried out with organic solvents (ethyl ether, petroleum ether, chloroform or methanol) and gravimetric determination. Specific factors may influence the extraction, such as the polarity of the extraction solvent and pretreatment of the sample (e.g., hydrolysis, washes etc.). The choice of the most appropriate solvent for lipid extraction in food matrices is one of the most critical steps in this determination, due to the diversity of dietary matrices and their lipid composition. The extraction process can take time, requiring multiple steps and different solvents or a combination of these for adequate and complete solubilization of lipid components in food matrices⁴.

Food matrices can be treated before extraction, since lipids can be linked to other food compounds, such as proteins and carbohydrates, and thus only the action of the solvent is not sufficient for the release of lipid components. In the case of dairy products, including infant formulas, an alkaline pretreatment is used, usually with ammonium hydroxide, which breaks down the lipid emulsion, neutralizes some acid, and solubilizes the protein for later extraction with ether. The Roesse-Gottlieb (AOAC 905.02) and Monjonier (AOAC 989.05) methods use a blend of ethyl ether and petroleum to extract fat from residues treated with ammonia hydroxide in ethanol⁵. In this case, mono-, di- and triacylglycerols and traces amounts of other lipids are effectively extracted from dairy products, including milk, cheese, and milk-based infant formula. These lipid extraction methods, with a prior alkaline hydrolysis, are recommended for the determination of FAs^{5,6}.

Analysis of FAs by gas chromatography involves the preliminary conversion of triacylglycerols into more volatile derivatives and typically fatty acid methyl esters (FAME) are prepared. Several procedures are described and each with its advantages and limitations, according to characteristics of the lipid matrices to be analysed^{4,7}.

The conventional procedure to obtain FAME is esterification reactions, usually catalysed by acids or bases and they involve two processes: hydrolysis and esterification or transesterification⁸.

Direct transesterification (“in situ”) method without prior extraction of fats are currently being used. They consist of mixing the sample with esterification reagents such as methanol hydrogen chloride; methanol acetyl chloride; methanol sodium methoxide; methanol sodium hydroxide (NaOH), hydrochloric acid and methanol solution; sulfuric methanol acid and boron trifluoride solution (BF₃). There is an obvious saving of analytical time and solvents as the lipid extraction and derivatization steps of the later occur the same time. However, the water content of

the food, the sampling, the choice of reagents (catalyst), and the conditions of the analysis are key factors in the effectiveness of direct reactions⁹⁻¹².

Several studies are carried out to compare the traditional method, namely the extraction of lipid and the subsequent derivation of FA in FAME with the direct method (DM) or “in situ”. O’Fallon et al¹³ obtained similar results between traditional and “in situ” methods for samples of fish oil, meat product, and conjugated linoleic acid (CLA) capsules. Cruz-Hernandez et al¹⁴ observed that the direct method can be used for the fatty acids quantification in human milk. Other authors also demonstrated similarity in terms of the results of the methods: Abdulkadir and Tsuchiya¹⁵ for samples of marine animals; Wang et al¹⁶ when analyzing egg yolks; Golay et al¹⁰ for dairy products; and Castro-Gómez et al¹¹ for milk powder and conjugated linoleic acid supplementation. However, Mazalli and Bragagnolo¹⁷ verified that the direct method was not adequate to determine polyunsaturated fatty acids (PUFA) in powdered eggs. The direct method is also currently used to produce biodiesel from algae and vegetable oils in order to save^{18,19}. In 2007, the American Oil Chemists’ Society (AOCS)²⁰ published the Ce 2b-11 method of direct methylation of lipids using alkaline hydrolysis with methanolic NaOH, organic solvent extraction (n-hexane), and methylation with BF₃. Total fat is also determined directly by calculation, based on fatty acids obtained by gas chromatography with flame ionization detection (GC/FID) in accordance with the AOCS Ce 1h-05 method. This method, however, is not applicable for milk fats and marine oils or oils with long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFAs) or micro-encapsulated oils, in these cases AOCS recommends the use of the Ce 2c-11 method²⁰.

The comparison of analytical methods is due two separate reasons. The first is when you wish to check a new method with an existing one, to evaluate whether the results of the two methods are indistinguishable or whether they differ in a major way. The second reason is to calibrate one method to another so that the measurements made by one method can be converted to those others²¹.

ABNT ISO/IEC 17025²² norm defines reference material (RM) as a sufficiently homogeneous and stable material concerning one or more specified properties, which has been established as being suitable for its intended use in a measurement process, and certified reference material (CRM) as a reference material (RM) characterized by a metrologically valid procedure for one or more specified properties, added by a certificate providing the specified property value, its associated uncertainty and a metrological traceability declaration. The CRM has multiple utilities within a laboratory, and among the various possibilities, the ones that most stand out are the calibration and metrological control of equipment, the verification of the accuracy and precision of analytical methods, through the validation of methods, and the training of analysts.

One of the techniques that can be used for the validation of a methodology is the comparison with results obtained by other validated methods, and in this sense, the CRM has outstanding relevance because it is a tool that guarantees the comparability between the method already standardized and the method in the study. The guarantee of comparability is of important because it is through it that the reliability of measurements is attested, possible commercial technical barriers are eliminated and, consequently, a guarantee of fair exchange relationships, besides allowing substantial increases in terms of quality, innovation, and competitiveness^{22,23}.

The objective of this study was to compare the conventional method for analysis of lipids and fatty acids in infant formula with the direct method in a sample of certified reference material.

MATERIAL AND METHODS

Material

A National Institute of Standards and Technology (NIST) 1849/2006 infant formula reference sample was used, with both certified and reference values for lipids and FAs.

Reagents, solvents and standards

The solvents and reagents of analytical grade used were: petroleum ether, ethyl ether, 95% ethanol, hydrochloric acid, ammonium hydroxide, potassium hydroxide, sodium sulfate, NaOH, sodium methoxide, ammonium chloride, and sodium citrate; and chromatographic grade solvent: n-hexane

The following chromatographic standards were used: C11:0 and C13:0 in triacylglyceride (TAG) form, with an approximate purity of 98% and 99%, respectively; C11:0, C13:0, C21:0, and C23:0, in the form of PUFAs, with an approximate purity of 99%; a mixture with certified quantities of 37 PUFAs (Supelco); a FAME mixture of the *cis-trans* isomers of linoleic acid (C18:2) (Sigma) and a FAME mixture of the *cis-trans* isomers of α -linolenic acid (C18:3) (Sigma), and individual methyl ester standards (Sigma), being: eladic (C18:1 9t); vacenic (C18:1 11c); *trans* vacenic C18:1 7c; C18:1 12c; CLA (C18:2 9c,11t and C18:2 10t,12c); palmitoelaid (C16:1 9t), palmitic (C16:0); linolenic (C18:2 9t,12t); eicosapentaenoic (C20:5 5c,8c,11c,14c,17c); araquidonic (C20:4 5c,8c,11c,14c); and docosahexaenoic (C20:6 4c,7c,10c,13c,16c,19c).

Methods

Figure 1 shows the flow chart for the methodologies used in the study, the conventional (CM) and direct methods. In the CM, two methods of fat extraction were used, the AOAC 963.155 method for the gravimetric determination of total fat, and the Roesse-Gottlieb method AOAC⁵ for fat extraction and subsequent analysis of FAs.

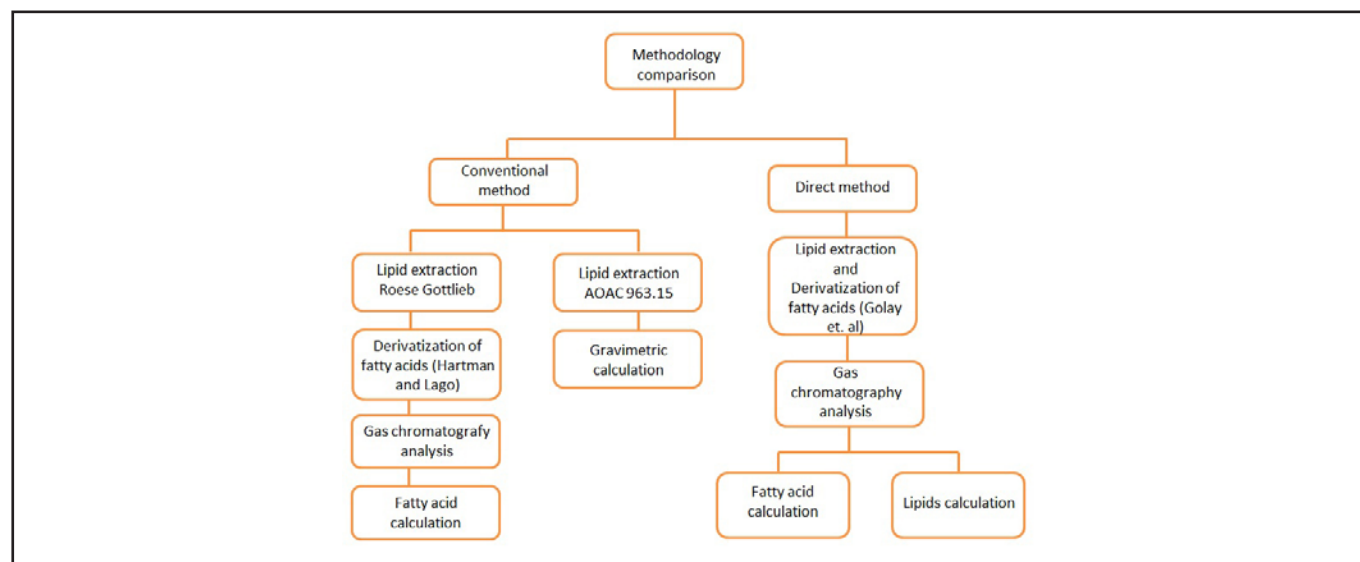


Figure 1. Flow chart for the conventional method (CM) and the direct method (DM) used in the study

Conventional method – CM (lipid extraction and transesterification of fatty acids)

Method AOAC 963.155 is acid hydrolysis and subsequent extraction with petroleum ether. For the analysis by the Roese-Gottlieb analysis (AOAC, 2005)⁵, about 2 g of sample was weighed in a centrifugal tube, and 10 mL of distilled water was added and homogenized. So 10 mL of 95% ethyl alcohol were added, 25 mL of ethyl ether, and 25 mL of petroleum ether, and the tube was centrifuged (New Technique – NT 812) for 5 min at 3000 rpm. Following this step, the ether phase was separated and collected in a flask suitable for evaporation. The aqueous extract was twice extracted with additional 15 mL of ethyl ether and 15 mL of petroleum ether, and the ether phase was collected in the appropriate flask. The solvent was evaporated under nitrogen gas flow, and lipids were determined by gravimetry up to constant weight.

For the preparation of PUFAs, the mixed catalysis method was used, according to Hartman and Lago²⁴ modified by Maia and Rodrigues-Amaya²⁵. In approximately 100 mg of the fat extracted by the Roese-Gottlieb method, weighed in a 50 mL tube with a lid, 1 mL of each internal standard (IS) was added, which were PUFAs of C11, C13, C21, and C23, with a concentration of 2.5 mg/mL, and 4 mL of solution 2 M potassium chloride in methanol. Following agitation in the vortex, for 1 min, this solution was maintained for 5 min in a heating bath at 70 °C, and the tube was removed and cooled under running water. 5 mL of esterifying solution (prepared with sulfuric acid and ammonium chloride in methanol) was added, the tube was stirred in the vortex and the heating bath (5 min, 70 °C) was maintained. Following the cooling, 6 mL of a saturated solution of sodium chloride and 3 mL of n-hexane were added, and the tube was agitated (1 min in the vortex) and left at rest for separation of the phases. The 1 µL volume of the organic phase was injected by a gas chromatography (GC).

Direct method (“in situ”)

The direct method (DM) used was based on Golay et al¹⁰ study, with changes implemented in this study. The analytical steps were as follows: about 100 mg of the sample was weighed in a centrifuge vial of 50 mL; 2 mL of n-hexane was added, the vial was stirred for 30 s and then 300 µL of the following internal standards (PUFAs C21:0 and C23:0, and triacylglycerides of fatty acids C11:0 and C13:0) were added, all with an approximate concentration of 2.5 mg/ mL and 500 µL of 2 M sodium methoxide solution in methanol. The flask was shaken in a vortex for 2 min and heated in a heating bath 50 °C for 20 min. Then, the vial was cooled in running water until room temperature, and 2 mL of n-hexane and 10 mL of an aqueous solution of 1.5% sodium citrate and 1.0% of sodium chloride were added. The flask was shaken for a minute in a vortex. After the separation phase, 1 µL from the top phase was injected in a GC.

Analysis of fatty acids by gas chromatography with flame ionization detector

Fatty acids analysis by gas chromatography using a flame ionization detector (GC/FID) (Shimadzu, model 17A), coupled with a 100% phase fused silica capillary column with a phase of 100% bis-cyanopropyl polysiloxane (SP 2560, Supelco) of 100 m, 0.25 mm in diameter and 0.20 µm film thickness, according to the conditions described by Kramer et al²⁶: injector and detector temperature: 250 °C; flow: 1.90 mL/min; temperature ramp: 45 °C (1 min); 13 °C/min to 175 °C (27 min); 4 °C/min to 215 °C for 35 min; drag gas: hydrogen (flow: 30 mL/min); makeup gas (nitrogen): 30 mL/min; synthetic airflow: 300 mL/min; column pressure: 175 kPa; dividing ratio of the 1:15 sample. The inject mode was manual.

The separate components were identified by co-injection of standards and comparisons with

absolute and relative retention times to the internal pattern, which was calculated by dividing the retention time of each component by the retention time of the peak of the internal standard.

Quantification of polyunsaturated fatty acids

The theoretical response factor for FID was calculated based on equations 1 and 2, and in relation to IS²⁷⁻²⁹.

$$K_{FA_i} = \frac{M_{FA_i}}{(n_{FA_i} - 1) \cdot A_c} \quad (1)$$

Where:

K_{FA_i} = response correction factor for fatty acid “i”;

M_{FA_i} = molecular mass of the fatty acid methyl ester “i”;

N_{FA_i} = number of carbon atoms of the fatty acid methyl ester “i”;

Atomic mass as used for the calculation: carbon = 12.01 (A_c), hydrogen = 1.0079, oxygen = 15.994.

$$K'_{FA_i} = \frac{K_{FA_i}}{K_{IS}} \quad (2)$$

Where:

K'_{FA_i} = relative correction factor for fatty acid “i”;

K_{IS} = FID response factor for IS;

K_{FA_i} = FID response factor for fatty acid “i”.

Two procedures were used to quantify fatty acids, including the addition of an internal standard. In a previous lipid extraction, the calculations were performed according to equation 3²⁹. The internal standard used for this determination was the methyl ester C23:0 fatty acid.

$$conc_{FA_i} = \frac{M_{IS} \cdot A_{FA_i} \cdot K'_{FA_i} \cdot f_{FA_i} \cdot L}{m \cdot A_{IS}} \quad (3)$$

Where:

M_{IS} = mass of the internal standard added to the sample;

A_{FA_i} = PUFAs area in the sample chromatogram;

K'_{FA_i} = response correction factor of each PUFA in the FID to the IS;

f_{FA_i} = conversion factor from PUFAs to FA²⁹;

L = lipid content in grams percent grams of sample;

m = mass of sample, g;

A_{IS} = area of the FAME internal standard in the sample chromatogram.

In the direct method, the total fat mass was calculated. Triacylglycerol C13:0, C21:0 and C23:0 FAME were added at initial extraction. Fatty acids were calculated using equations 2 and 3, and lipids were calculated from the sum of the triacylglycerol-like components according to AOAC method 996.06 using equation 4⁵.

$$M_{FAME_i} = \frac{A_{FA_i} \cdot m_{IS} \cdot 1.0059 \cdot K'_{FA_i}}{A_{FA_{IS}}} \quad (4)$$

Where:

M_{FAME_i} = mass of each FAME component;

A_{FA_i} = peak area of each component;

m_{IS} = mass of the internal standard;

1.0059 = conversion factor of the IS TAG from corresponding FAME;

K'_{FA_i} = experimental response factor of the FID, about the IS;

$A_{FA_{IS}}$ = peak area of the IS.

$$M_{FA_i} = M_{FAME_i} \cdot f_{FA_i} \quad (5)$$

$$M_{TAG_i} = M_{FAME_i} \cdot f_{TAG_i} \quad (6)$$

Where :

M_{FA_i} = mass of each component expressed as corresponding FA;

f_{FA_i} = Conversion factor of FAME in FA⁵;

M_{FAME_i} = mass of each component expressed as the corresponding TAG;

f_{TAG_i} = conversion factor from FAME to TAG⁵.

The calculation of recovery of ISs added in the infant formula sample was based on the Validation Guide of INMETRO³⁰.

Statistical analysis

All analyses were performed in triplicate and the values were expressed on average \pm standard deviation. The comparison of the procedures was performed by the analysis of variance (ANOVA) and subsequent *Tukey* test, with a significance level of 95%, where the means followed by the same letter do not differ in the group. Statistical calculations were performed in Statistica[®] software, version 10. The correlation between the analyzed methods and values of the NIST certificate and Pearson coefficient (*r*) calculation were performed and evaluated according to the methodology described by Ludbrook²¹.

RESULTS

Table 1 shows the lipid content determined by CM and DM, given the use of 3 different IS. The value of lipids by CM was 31.50 ± 0.30 g/100 g, with a coefficient of variation of 0.95%. The lipid values obtained by calculation for the DM, according to Equation 4, were 29.07 ± 1.66 g/100 g for IS C13:0 (TAG), from 29.40 ± 1.10 g/100 g for IS C21:0 (FAME) and 31.41 ± 0.45 g/100 g for IS C23:0 (FAME), which are statistically equal (ANOVA, $\alpha < 0.05$). Lipids values were also calculated using two ISs: C13:0 (TAG) and C23:0 (FAME), with a value of 30.9 ± 0.4 g/100 g. Lipid values per DM and CM showed statistically equal values (ANOVA, $\alpha < 0.05$) on the NIST certificate (31.0 ± 0.6 g/100 g).

Table 1. Lipid content obtained for the conventional and direct methods

Method	Mean ± Standard deviation (g/100g)
Direct – TAG 13:0	29.07 ± 1.66 ^a
Direct – FAME 21:0	29.40 ± 1.10 ^a
Direct – FAME 23:0	31.41 ± 0.45 ^a
Conventional	31.50 ± 0.30 ^a

Analysis in triplicate; values in g/100 g of sample; direct method: methodology adapted from Golay et al. (2007)⁷; means followed by the same letter do not differ within the group, according to ANOVA and *Tukey* test ($\alpha = 0.05$). CV: coefficient of variation. TAG: triacylglycerol; FAME: fatty acid methyl esters

Table 2 shows the levels of FAs obtained for the NIST sample 1849 by CM and DM, in addition to the certified and reference values provided by NIST. It is possible to verify that only the values for FAs C20:4, C22:6, and C20:3, determined by DM, were statistically different (ANOVA and *Tukey* test, $\alpha = 0.05$) about NIST and CM certified values. In addition to statistical comparison by the ANOVA method and *Tukey* test, the relation between the FAs calculated by CM and DM was performed, and the relation by the DM and the values of the NIST certificate and the Pearson coefficient (r), or correlation coefficient was calculated; these data can be observed in **Figure 2**. For the relationship between CM and DM, the value of r was 0.9956 and for the DM and the values present in the NIST certificate was 0.9955, demonstrating a strong correlation between the methods and between the DM and the NIST certificate values. **Table 2** presents the calculated values for saturated fatty acids (SFAs), monounsaturated fatty acids (MUFAs), and PUFAs, obtained by the CM and DM methods, and values certified by NIST.

Table 2. Comparison of certified fatty acid contents obtained by the conventional and direct method in the NIST 1849 sample

Fatty acids	NIST	Conventional method	Direct method
6:0 ^R	0.061 ± 0.011 ^a	0.061 ± 0.019 ^a	0.061 ± 0.011 ^a
8:0 ^C	0.638 ± 0.067 ^a	0.640 ± 0.025 ^a	0.653 ± 0.050 ^a
10:0 ^C	0.473 ± 0.019 ^a	0.475 ± 0.026 ^a	0.494 ± 0.029 ^a
12:0 ^C	3.712 ± 0.075 ^a	3.709 ± 0.299 ^a	3.717 ± 0.024 ^a
14:0 ^C	1.521 ± 0.021 ^a	1.511 ± 0.050 ^a	1.519 ± 0.038 ^a
15:0 ^C	0.007 ± 0.0003 ^a	0.010 ± 0.001 ^a	0.010 ± 0.001 ^a
16:0 ^C	2.500 ± 0.1600 ^a	2.550 ± 0.310 ^a	2.510 ± 0.170 ^a
16:1 n-7 ^C	0.0262 ± 0.0016 ^a	0.027 ± 0.001 ^a	0.028 ± 0.001 ^a
17:0 ^R	0.015 ± 0.001 ^a	0.015 ± 0.002 ^a	0.015 ± 0.001 ^a
18:0 ^C	0.905 ± 0.056 ^a	0.935 ± 0.138 ^a	0.939 ± 0.087 ^a
18:1 n-9 cis ^C	10.63 ± 0.88 ^a	10.400 ± 1.050 ^a	11.430 ± 0.810 ^a
18:1 n-7 cis ^C	0.203 ± 0.021 ^a	0.199 ± 0.008 ^a	0.200 ± 0.025 ^a
18:2 n-6 cis ^C	6.02 ± 0.1 ^a	6.190 ± 0.120 ^a	5.820 ± 0.300 ^a
18:3 n-3 cis ^C	0.561 ± 0.043 ^a	0.558 ± 0.058 ^a	0.506 ± 0.012 ^a

Continues on the next page

Continuation

Fatty acids	NIST	Conventional method	Direct method
20:0 ^C	0.095 ± 0.003 ^a	0.092 ± 0.001 ^a	0.094 ± 0.011 ^a
20:1 ^R	0.062 ± 0.007 ^a	0.065 ± 0.005 ^a	0.062 ± 0.007 ^a
20:3 ^R	0.02 ± 0.004 ^a	0.0203 ± 0.001 ^a	0.010 ± 0.004 ^b
20:4 ^C	0.206 ± 0.022 ^a	0.200 ± 0.009 ^a	0.095 ± 0.008 ^b
22:0 ^R	0.08 ± 0.007 ^a	0.080 ± 0.010 ^a	0.080 ± 0.007 ^a
22:6 ^C	0.067 ± 0.006 ^a	0.061 ± 0.003 ^a	0.021 ± 0.002 ^b
24:0 ^C	0.039 ± 0.003 ^a	0.040 ± 0.002 ^a	0.040 ± 0.002 ^a
24:1 ^R	0.024 ± 0.004 ^a	0.024 ± 0.002 ^a	0.024 ± 0.004 ^a
SFA ^{CA}	10.046 ± 0.202 ^a	9.539 ± 0.467 ^a	10.129 ± 0.205 ^a
MUFA ^{CA}	10.945 ± 0.880 ^a	10.715 ± 1.050 ^a	11.744 ± 0.810 ^a
PUFA ^{CA}	6.874 ± 0.111 ^a	7.029 ± 0.134 ^a	6.462 ± 0.300 ^a

Analyses in triplicate; values expressed as mean ± standard deviation in g/100 g sample; ^C: certified fatty acid values; ^R: reference fatty acid values; ^{CA}: sum of individual fatty acid values provided by NIST; SFA: sum of saturated fatty acids; MUFA: sum of monounsaturated fatty acids; PUFA: sum of polyunsaturated fatty acids; means followed by the same letter do not differ within the group according to ANOVA and Tukey test (α = 0.05). Limit of quantification of the method = 0.01 g/100 g

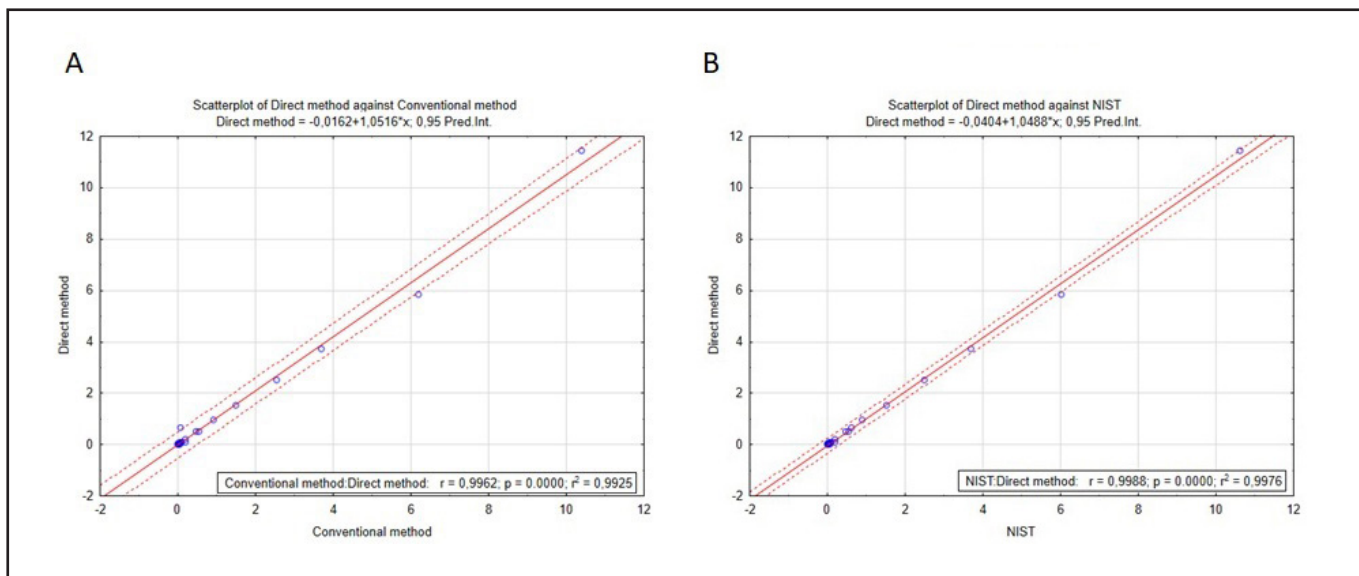


Figure 2. Correlation graph. A) Relation between the values of fatty acid for conventional method and direct method. B) Relation of the fatty acid values for the direct method to the NIST certificate values. r = correlational coefficient

DISCUSSION

The conventional method routinely used in the laboratory consists of two lipid extractions, one being performed for the quantification of total fat and the other for acid analysis; after this step, the transesterification reaction is performed, and then the analysis by gas chromatography. These reactions may take 3 to 5 days, with a high consumption of organic solvents. Thus, a comparison was made

with a direct method, where lipid extraction and fatty acids esterification occur together, reducing analysis time and solvent expenditure. For methodological comparison, a sample of NIST infant formula was used, linked to the USA. Department of Commerce, and is considered to be a CRM, i.e., CRMs characterized using state-of-the-art methods to determine chemical composition, thus ensuring that it is an excellent material for comparing the methodologies, besides having been manufactured by a company in the sector, following the steps of production and using the similar ingredients of infant formulas available in the market³¹. The NIST sample used for comparison of methods can therefore be considered representative of end-use infant formula.

When available, CRMs should be used in the validation process of a test method because they have a concentration value for each parameter and the associated uncertainty. A use of CRM is its analysis to assess the performance of the analytical method³⁰.

Lipid Determination

In CM, prior acid hydrolysis was conducted with subsequent extraction with petroleum ether for gravimetric determination of lipids (**Figure 1**). An infant formula typically consists of a variety lipid sources such as milk and vegetable fats and encapsulated fatty acids. Thus, the use of previous acid hydrolysis can help to break down microcapsules, releasing fatty acids more efficiently^{32,33}.

The study used for DM did not provide for the determination of lipids by calculation, and this modification was added in this study to simplify quantification; the calculations were performed according to Equations 4 and 6 and expressed as equivalent triacylglycerols.

In methods of quantification of lipids by calculation, the choice of the internal standard is extremely importance. Lipids are calculated as the sum of fatty acids and condense in the triacylglycerol molecule in accordance with AOAC5 and AOCS Ce 1h-0520. In the experimental work, the EMAG 21:0 and C 23:0 IS have been used for the calculations, in addition to the IS of TAG C13:0.

According to the values in **Table 1**, there was no statistical difference between the ISs for the calculation of lipids. However, if we consider the elution in which PUFA is eluted in a chromatogram, the higher the PUFAs calculated from the IS, the higher the difference in its concentration³⁴. The lipid values obtained with the C21:0 and C23:0 IS reflect the contribution of short-chain fatty acids present in dairy products, since these FAs elude far from the IS, thus having relative detector response factors greater than those calculated with a closer IS (**Figure 1**). In the case of PI TAG 13:0, it is the AGPI-CL that influences the calculation, because the values of the FID response factors are lower when calculated to this IS, because these FAs are distant from the IS in the chromatogram, as can be observed in **Figure 3**. Thus, when there is a variety of FAs in the food matrix, the ideal is quantification with two IS, that is, to use as IS the 13:0 TAG from the beginning of the elution to the stearic acid region (18:0), and the IS of the FAME 23:0 for the fatty acids between C18:0 and C22:6.

To ensure the reliability of the IS lipid results, recoveries were calculated for IS C13:0 and C23:0, with results ranging from 98 to 99% (coefficient of variation of 0.58%) and from 97 to 99% (coefficient of variation of 1.00%), considered adequate as recommended by the Validation Guide of INMETRO³⁰ for this concentration range, i.e., recoveries between 95 and 105%³⁰ for 0.1% of IS added to the sample, demonstrating the accuracy of the data presented.

Therefore, it can be verified that lipid analysis in infant formula can be performed by the DM when adding two PI for the calculation since it showed a statistically equal value (ANOVA and Tukey test, $\alpha = 0.05$) compared with both the CM and the CRM of the NIST.

Figure 3 shows a NIST 1849 infant formula chromatogram that checks the elution order of the PUFAs and the ISs additions.

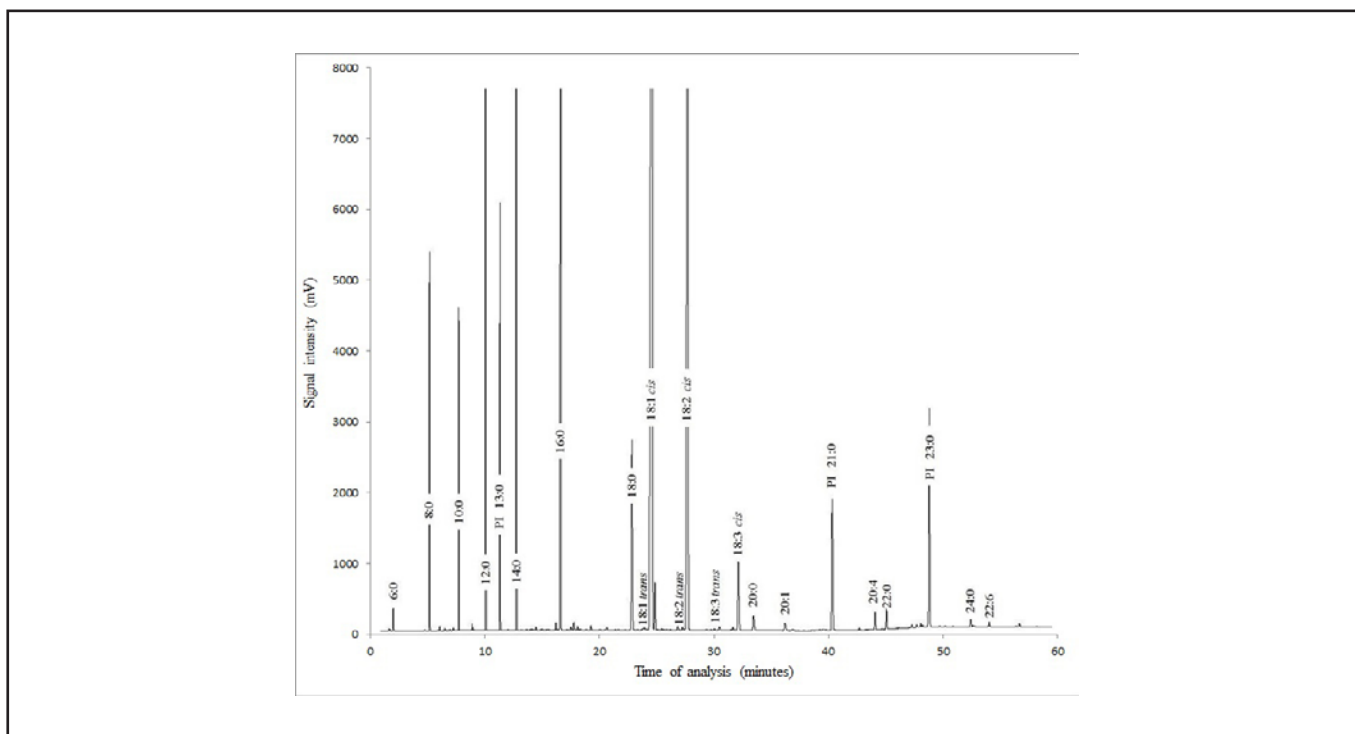


Figure 3. Chromatogram of the major fatty acids methyl esters from the gas chromatography analysis of sample NIST 1849. IS: internal standard

Quantification of fatty acids in the sampled NIST 1849

The fatty acid calculations were carried out using the TAG C13:0 IS, for the eluted FA before C18:0, and FAME C23:0, for those after C18:0 (Figure 3). The theoretical response factor for correction of the FID was that of the IS itself. For CM, equation 3 and for DM equations 4 and 5 have been used. In the infant formula CRM certificate, there are two classes of values reported to the FAs, being certified values value for FAs C8, C10, C12, C14, C15, C16, C16:1, C18, C18:1, C18:2, C18:3, C20, C20:4, C22:6, and C24 and reference values for FAs C6, C17, C20:1, C20:3, C22, and C24:1.

NIST define as a certified value the data for which there is greater reliability and accuracy, in which all known or suspected sources of bias have been fully investigated or accounted for. The uncertainty associated with a certified value usually specifies a range within which the true value is expected to be at a confidence level of approximately 95% and a study of homogeneity was carried. The reference value in the certificate is defined as the best estimate of the true value provided, where all known or suspected sources of bias outside of the certificate have not been fully investigated by NIST. The uncertainty associated with a reference value may not include all sources of uncertainty and may be only a measure of the precision of the measurement method³⁵.

For the FAs declared with certified values, the majority had very close results between the CM and the DM, being statistically equal (ANOVA and *Tukey* test, $\alpha = 0.05$), and also to the CRM, except for the polyunsaturated FAs C20:4 and C22:6, a fact observed in **Table 2**. In the case of FAs declared as a reference, only C20:3 had a statistically different value for the CM and DM methods and also for the infant formula sample (**Table 2**). Regardless of the rigidity with which the value was determined by the CRM manufacturer, those FAs with longer chains and with double unsaturations had lower values for the DM, thus demonstrating a limitation of the analytical methodology.

The DM uses a higher temperature, which may contribute to the degradation of polyunsaturated fatty acids; the steps of lipid extraction and derivatization of fatty acids in the sample may not have been efficient, especially in the case of micro-encapsulated fatty acids. In addition, the direct method was applied three weeks after the conventional method. Considering the justifications presented those polyunsaturated fatty acids which are more susceptible to degradation and/or oxidation, since they present more reactive sites, may have been degraded, which may explain the lowest levels obtained³⁶. On the other hand, methods under softer conditions, such as those used in CM, do not affect the composition of polyunsaturated fatty acids³.

The correlation observed for the values of FAs between DM and MC was 0.9955 for the FAs calculated by the DM and those of the NIST certificate were 0.9988, higher than 0.99, demonstrating a strong correlation between the methods and between the MD and the values of the NIST certificate³⁷. Thus, we can make sure that these methods are equivalent, and can be used to analyze FAs in infant formula.

FAs are typically indicated on food labels, including infant formula, such as the sum of FAs, *trans* fatty acids (TFA), MUFA, and PUFA. The NIST certificate does not contain the AGT and therefore they were not calculated. Thus, by performing this on the basis of the data in **Table 2**, it is possible to verify that these values are statistically equal (ANOVA and *Tukey* test, $\alpha = 0.05$). The difference between the values obtained by the DM and those reported in the NIST certificate was 0.82% for SFA, 7.31% for MUFA, and 6.00% for PUFA, showing that the DM can be used to calculate the sum of these FAs.

The results obtained in the present study, considering the matrix studied and using the direct methodology, were satisfactory and the DM can be used in the laboratory for quantification of FA, since when comparing its results with those of the MC and the values of the NIST certificate, of the 22 FAs analyzed, only three (13.6%) showed values for the DM different from the CM and from that provided for in the certificate of infant formula NIST. Difference percentages have been observed for SFA, MUFA, and PUFA, but they correspond to the 20% tolerance of nutritional information provided in the legislation. For the sum of the PUFAs, there were no differences between the values of DM, CM, and NIST values, and these results were statistically equal (ANOVA and *Tukey* test, $\alpha = 0.05$). However, when analyzing specific FAs like C20:3, C20:4 and C22:6, large variations were found; therefore, if the objective of the analysis is to quantify these FAs individually, further studies and adaptations of the DM are necessary.

It is noteworthy that, for infant formula, there is no official direct method, and the AOCS Ce 2b-11 and 2c-11 methodologies²⁰ can be used, which are indicated for food matrices in general.

CONCLUSION

The direct method for quantification of lipids and fatty acids in infant formula proved to be appropriate and similar to the conventional method, with the advantages of being faster and using fewer organic solvents. The calculation with the addition of two internal standards proved suitable for lipid quantification, as well as for fatty acids. Therefore, the direct method may be considered an alternative to the laboratory and used in the calculation of the concentration of most individual fatty acids, as well as for the sum of saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids in infant formula.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest.

FINANCING

Not declared.

ACKNOWLEDGEMENTS

Not declared.

AUTHORS' CONTRIBUTION

Analytical and statistics analysis and writing of the article: Mahyara Markievicz Mancio Kus Yamashita; Guidance in the analysis, data analysis and writing, correction and final review of the article: Sabria Aued Pimentel; Work guidance and article correction: Jorge Mancini Filho.

PRESENTATION NOTE: This article is part of Mahyara Markievicz Mancio Kus master's thesis entitled "Determination of polyunsaturated fatty acids in infant formulas: comparison of methodologies in analysis by gas chromatography" that was developed in the Graduate Program in Food Sciences – Area of Bromatology, at the Pharmaceutical Sciences School of the University of São Paulo, under the guidance of Prof. Dr. Jorge Mancini Filho and defended in August 2009.

REFERENCES

1. Kus MMM, Aued-Pimentel S, Mancini-Filho J. Comparação de métodos analíticos para determinação de lipídios e ácidos graxos polinsaturados por cromatografia gasosa em fórmula infantil. Rev Inst Adolfo Lutz. 2009;68(1):12-20. Available from: <https://periodicos.saude.sp.gov.br/index.php/RIAL/article/view/32737>
2. Kus MMM, Silva SA, Aued-Pimentel S, Mancini-Filho J. Informação nutricional de fórmulas infantis comercializadas no Estado de São Paulo: avaliação dos teores de lipídeos e ácidos graxos. Rev Nutr. 2011;24(2):209-18. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732011000200002>

3. Kus MMM, Aued-Pimentel S, Mancini-Filho J. Estabilidade dos ácidos graxos poli-insaturados presentes em fórmulas infantis comerciais. *Braz J Food Tech*. 2011;14(2):145-53. Available from: <http://bjft.ital.sp.gov.br/arquivos/artigos/v14n2457a.pdf>
4. Aued-Pimentel S. Avaliação de procedimentos analíticos para a determinação de lipídios e ácidos graxos em produtos alimentícios [tese de doutorado]. São Paulo (SP): Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo; 2007.
5. Official Methods of Analysis of AOAC. 21. ed., Gaithersburg: AOAC International, 2019. [Accessed on 2019 Jun 18]. Available from: <http://www.eoma.aoac.org/>
6. Adrian J, Potus J, Poiffait A, Dauvillier P. Análisis nutricional de los alimentos. Métodos físico químicos generales. Zaragoza: Editorial Acribia; 2000.
7. Christie WW. Preparation of esters derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. In: *Advances in lipid methodology – two*, 1993; 2: 69-111. [Accessed on 2006 Out 05]. Available from: <https://lipidlibrary.aocs.org/lipid-analysis/selected-topics-in-the-analysis-of-lipids/preparation-of-ester-derivatives-of-fatty-acids-for-chromatographic-analysis>
8. Carpenter DM, Ngeh-Ngwainbi J, Lee S. Lipid Analysis. In: Carpenter DE, Sullivan DM, organizer. *Methods of analysis for nutritional labeling*. Arlington: AOAC International; 1993. p.85-104.
9. Carrapiso AI, Garcia C. Development in lipid analysis: some new extraction techniques and in situ transesterification. *Lipids*. 2000;35(11):1167-77
<https://doi.org/10.1007/s11745-000-0633-8>
10. Golay PA, Dionisi F, Hug B, Giuffrida F, Destailats F. Direct quantification of fatty acids in dairy powders with special emphasis on trans fatty acids content. *Food Chem*. 2006;101(3): 1115-20.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.03.011>
11. Castro-Gómez P, Fontecha J, Rodríguez-Alcalá LM. A high-performance direct transmethylation method for total fatty acids assessment in biological and foodstuff samples. *Talanta*. 2014;128:518-23.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.05.051>
12. Liu Z, Wang J, Li C, Rochfort S. Development of one-step sample preparation methods for fatty acid profiling of milk fat. *Food Chem*. 2020;315:126281.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126281>

13. O'Fallon JV, Busboom JR, Nelson ML, Gaskins, CT. A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: application to wet meat tissues, oils, and feedstuffs. J Anim Sci. 2007; 85(6):1511-21.
<https://doi.org/10.2527/jas.2006-491>
14. Cruz-Hernandez C, Goeuriot S, Giuffrida F, Thakkar SK, Destailats F. Direct quantification of fatty acids in human milk by gas chromatography. J Chromatogr A. 2013;1284:174-9.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.01.094>
15. Abdulkadir S, Tsuchiya M. One-step method for quantification and qualitative analysis of fatty acids in marine animal samples. J Exp Mar Biol Ecol. 2008;354:1-8.
<https://doi.org/10.1016/j.jembe.2007.08.024>
16. Wang Y, Sunwoo H, Cherian G, Sim JS. Fatty acid determination in chicken egg yolk: a comparison of different methods. Poult Sci. 2000; 79(8):1168-71.
<https://doi.org/10.1093/ps/79.8.1168>
17. Mazalli MR, Bragagnolo N. Validation of two methods for fatty acids analysis in eggs. Lipids. 2007;42(5):483-90.
<https://doi.org/10.1007/s11745-007-3046-4>
18. Ehimen EA, Sun ZF, Carrington CG. Variables affecting the in situ transesterification of microalgae lipids. Fuel. 2010;89(3):677-84.
<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2009.10.011>
19. Velasquez-Orta SB, Lee JGM, Harvey A. Alkaline in situ transesterification of *Chlorella vulgaris*. Fuel. 2012;94:544-50.
<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2011.11.045>
20. Official Methods and Recommended Practices of the AOCS. Revisions 2017. 7. ed., Champaign: American Oil Chemists' Society, 2017. [Accessed on 2018 Nov 14]. Available from:
<https://www.aocs.org/attain-lab-services/methods/methods>
21. Ludbrook J. Confidence in Altman-Bland plots: a critical review of the method of differences. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2010;37(2):143-9.
<https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2009.05288.x>
22. ABNT NBR ISO/IEC 17025. Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. 2017.

23. Melo EDA. O uso dos MRC (Materiais de Referência Certificados) na avaliação dos métodos analíticos. *Rev Analytica*. 2020. [Accessed on 2021 Jun 10]. Available from: https://revistaanalytica.com.br/o-uso-dos-mrc-materiais-de-referencia-certificados-na-validacao-dos-metodos-analiticos/#_edn1
24. Hartman L, Lago RAC. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab Prac*. 1973;22(6):475-6. Available from: <https://www.scienceopen.com/document?vid=5334de68-6e03-446b-85e7-244d0ac1ce1b>
25. Maia EL, Rodrigues-Amaya DBR. Avaliação de um método simples e econômico para a metilação de ácidos graxos com lipídios de diversas espécies de peixes. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 1993;53(1-2):27-35. Available from: <https://periodicos.saude.sp.gov.br/index.php/RIAL/article/view/35982>
26. Kramer JKG, Blackadar CB, Zhou J. Evaluation of two GC columns (60-m SUPELCOWAX 10 and 100-m CP sil 88) for analysis of milkfat with emphasis on CLA, 18:1, 18:2 and 18:3 isomers, and short- and long-chain FA. *Lipids*. 2002;37(8):823-35. <https://doi.org/10.1007/s11745-002-0967-2>
27. Ackman RG, Sipos JC. Application of specific response factors in the gas chromatographic analysis of methyl esters of fatty acids with flame ionization detector. *J Am Oil Chem Soc*. 1964;41(5):377-8. <https://doi.org/10.1007/BF02654818>
28. Bannon CD, Graske JD, Hillker AE. Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability: Validation of theoretical relative response factors of unsaturated esters in the flame ionization detector. *J Am Oil Chem Soc*. 1986;63(1):105-10. <https://doi.org/10.1007/BF02676134>
29. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo – Brasil). Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4. ed. [1. ed. digital]. São Paulo (SP): Instituto Adolfo Lutz; 2008. Available from: http://www.ial.sp.gov.br/resources/editorinplace/ial/2016_3_19/analisedealimentosial_2008.pdf
30. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. Guia de Orientação sobre validação de métodos analíticos. DOQ-CGCRE-0008 – revisão 08. 2020. [Accessed on 2021 Jun10]. Available from: http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?torganismo=calibensaio
31. National Institute of Standards e Technology (NIST). Department of Commerce. United States of America. Certificate of Analysis – Standard Reference Material 1849 Infant/Adult Nutritional Formula. 2010. [Accessed on 2021 Jun 10]. Available from: <https://www-s.nist.gov/srmors/certificates/archives/1849.pdf>

32. Hirayama KB, Speridião PGL, Fagundes-Neto U. Ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa. Elect J Ped Gastroent Nutr Liver Dis. 2006;10(3):1-10.
33. Curtis JM, Berrigan N, Dauphinee P. The determination of n-3 fatty acid levels in food products containing microencapsulated fish oil using the one-step extraction method. Part 1: measurement in the raw ingredient and dry powdered foods. J Am Oil Chem Soc. 2008;85(4):297-305.
<https://doi.org/10.1007/s11746-008-1194-1>
34. Schreiner M. Quantification of long chain polyunsaturated fatty acids by gas chromatography: evaluation of factors affecting accuracy. J Chromatogr A. 2005;1095(1-2): 126-30.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.07.104>
35. National Institute of Standards e Technology (NIST). Department of Commerce. United States of America. NIST Special Publication 260-136 – Standard Reference Materials Definitions of Terms and Modes Used at NIST for Value-Assignment of Reference Materials for Chemical Measurements. 2000. [Available from: 2021 Jun 10]. Available from:
<https://www.nist.gov/system/files/documents/srm/SP260-136.PDF>
36. Maduko CO, Park YW, Akoh CC. Characterization and oxidative stability of structured lipids: infant milk fat analog. J Am Oil Chem Soc. 2008;85(3):197-204.
<https://doi.org/10.1007/s11746-007-1192-8>
37. Twomey PJ, Kroll MH. How to use linear regression and correlation in quantitative method comparison studies. Int J Clin Pract. 2008;62(4):529-38.
<https://doi.org/10.1111/j.1742-1241.2008.01709.x>





Multiparametric assay of screening for the diagnosis of mycoses of interest in Public Health: standardization of methodology

Ensaio multiparamétrico de triagem para diagnóstico de micoses de interesse em Saúde Pública: padronização da metodologia

Camila Mika Kamikawa¹ , Adriana Pardini Vicentini^{1,2*} 

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências, Área de Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública, Coordenadoria de Controle de Doenças, Secretaria de Estado da Saúde, São Paulo, SP, Brasil.

² Unidade Técnica de Imunologia das Doenças Respiratórias e Zoonóticas, Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses, Centro de Imunologia, Instituto Adolfo Lutz, Centro de Imunologia, São Paulo, SP, Brasil.

*Corresponding author / Autor de correspondência: adriana.vicentini@ial.sp.gov.br

Received/Recebido: 20.09.2021 – Accepted/Aceito: 30.03.2022

ABSTRACT

The standardization and validation of a multiplex assay requires the combination of important parameters such as sensitivity and specificity, acceptable levels of performance, robustness, and reproducibility. We standardized a multiparametric Dot-blot aimed at the serological screening of paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, and aspergillosis. A total of 148 serum were evaluated: 10 from healthy subjects, 36 from patients with paracoccidioidomycosis, 62 from patients with histoplasmosis, and 40 from patients with aspergillosis. It was found that the multiparametric Dot-blot showed a high percentage of cross-reactivity. However, when evaluated individually, in the serological screening of histoplasmosis, a good performance was observed when compared to the double immunodiffusion assay, considered the gold standard test, with 100% co-positivity and 83.3% co-negativity. The performance of serological screening for aspergillosis was not satisfactory when compared to double immunodiffusion, showing 71.4% co-positivity and 100% co-negativity. The evaluation of the stability of nitrocellulose membranes showed that membranes sensitized with *H. capsulatum* antigen remained stable for 90 days and those sensitized with *A. fumigatus* antigen for 30 days. We conclude that the use of crude antigens was not suitable for the standardization of the multiparametric Dot-blot assay, due to the high cross-reactivity, and that further tests should be performed with purified proteins.

Keywords. Paracoccidioidomycosis, Histoplasmosis, Aspergillosis, Immunologic Tests, Dot-blot.

RESUMO

A padronização e validação de um ensaio multiplex requer a combinação de parâmetros importantes, como sensibilidade e especificidade, níveis aceitáveis de desempenho, robustez e reprodutibilidade. Este trabalho padronizou um Dot-blot multiparamétrico visando a triagem sorológica da paracoccidioidomicose, histoplasmose e aspergilose. Foram avaliadas 148 amostras de soro: 10 de indivíduos saudáveis, 36 de pacientes com paracoccidioidomicose, 62 de pacientes com histoplasmose e 40 de pacientes com aspergilose. Verificou-se que o Dot-blot multiparamétrico apresentou elevado percentual de reatividade cruzada. Entretanto, quando avaliado individualmente, na triagem sorológica da histoplasmose observou-se bom desempenho quando comparado ao ensaio de imunodifusão dupla, considerado o teste padrão ouro, com 100% de co-positividade e 83,3% de co-negatividade. O desempenho da triagem sorológica da aspergilose não foi satisfatório quando comparado a imunodifusão dupla, apresentando 71,4% de co-positividade e 100% de co-negatividade. A avaliação da estabilidade das membranas de nitrocelulose mostrou que membranas sensibilizadas com antígeno de *H. capsulatum* permaneceram estáveis por 90 dias e as sensibilizadas com antígeno de *A. fumigatus*, por 30 dias. Concluímos que o uso de antígenos brutos não foi adequado para a padronização do ensaio de Dot-blot multiparamétrico, devido ao alto índice de reatividade cruzada, e que novos testes devem ser realizados com proteínas purificadas.

Palavras-chave. Paracoccidioidomicose, Histoplasmose, Aspergilose, Testes Imunológicos, Dot-blot.

INTRODUCTION

Systemic fungal infections have increased dramatically in incidence, prevalence, and severity over the last few decades, in concert with the number of patients living for extended periods with significant immune dysfunction. AIDS, cancer chemotherapy, and organ transplantation have all contributed to this rise, as has the widespread use of the antibiotics¹. The use of serological assays is extremely important in the diagnosis of infectious processes caused by endemic or opportunistic fungi, since the demonstration in direct examination as well as the isolation and identification of these fungi often has negative results, especially in cases of self-limited diseases²⁻⁶.

Among the different serologic assays, the Double Immunodiffusion (DI) is the “gold standard” methodology used for the diagnosis of paracoccidioidomycosis, histoplasmosis and aspergillosis. The DI assay has high specificity; however, depending on the *P. brasiliensis* antigen used, the sensitivity can range from 65 to 100%⁷; 70 to 95% for *H. capsulatum*³; and 89.3 to 100% for *A. fumigatus*^{5,6}. Although the DI assay has advantages in cost and feasibility, there is a need to implement in serological routine a more rapid and sensitive test that contributes with the disease screening in order to initiate appropriate therapy, prevention of further damage and monitor fungal dissemination to other organs^{2,4-7}. For the detection of many protozoan, viral and fungus diseases, Dot-blot has been widely accepted as a rapid, versatile and simple test based on the principle of enzyme immunoassays^{8,9}. The greatest advance in the applicability of the Dot-blot methodology is described for the immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis⁹⁻¹³, followed by aspergillosis¹⁴⁻¹⁶; however there are no studies in the literature that address the use of this assay in relation to the diagnosis of histoplasmosis. Based on the previous experience of the Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses, with the Dot-blot assay in paracoccidioidomycosis, it was decided to standardize the Dot-blot aiming at the simultaneous diagnosis of paracoccidioidomycosis, histoplasmosis and aspergillosis.

METHODS

Serum samples

A total of 148 serum samples were evaluated, including 36 samples from patients with paracoccidioidomycosis, 62 from patients with histoplasmosis and 40 from patients with aspergillosis. Ten serum samples from healthy individuals (normal human serum [NHS]) were used as negative control and anti-*P. brasiliensis*, anti-*P. lutzii*, anti-*H. capsulatum* and anti-*A. fumigatus* polyclonal antibodies, obtained from rabbits, were used as a positive control.

Ethics consideration

This research was conducted within the standards required by Resolution 466 of December 12, 2012, of the Ministério da Saúde – Conselho Nacional da Saúde, and it was approved by the Comitê de Ética em Pesquisa of Adolfo Lutz Institute (CEPIAL n°. 13673313.1.0000.0059).

P. brasiliensis antigen

The antigen used was a 20-day culture filtrate (Ag CF) obtained, according to Silva¹⁷, from

the yeast phase of 113 *P. brasiliensis* strain. The fungi were cultured in NGTA 3% (w/v) neopeptone, 1.8% (w/v) glucose, 0.009% (w/v) asparagine and 0.125% (w/v) thiamine liquid medium for 20 days at 36 °C with shaking. After incubation time, the cultures were treated with an aqueous borate-thimerosal solution (1:5,000) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), and left to stand for 96 hours at 4 °C. After this, the supernatants were filtered through Whatman® n°. 1 paper (Whatman, Brentford, UK), divided into small volumes, and stored at 4 °C until use. Protein contents were subsequently assessed by the Bradford method¹⁸.

***H. capsulatum* antigen**

The *H. capsulatum* antigen was obtained, according to Freitas¹⁹ and Freitas et al²⁰. Mycelial cells of 200 *H. capsulatum* strains were grown in solid Sabouraud-dextrose (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) medium at 27 °C during 33 days. After incubation time, the cultures were treated with an aqueous solution of thimerosal 1:5,000 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) and left to stand for 24 hours at room temperature. After this, the supernatants were filtered through Whatman® n°. 1 paper (Whatman, Brentford, UK), constituting the preparation of *H. capsulatum* antigen. Antigens were concentrated 10 to 20-fold by a lyophilization procedure. Protein contents were subsequently quantified by the Bradford method¹⁸.

***A. fumigatus* antigen**

Seven-day mycelial cells from 734, 736 and 727 of *A. fumigatus* strains were inoculated into 500 mL Erlenmeyer flasks containing 250 mL of Sabouraud dextrose broth (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), and incubated for 30 days at 27 °C, in a stationary phase. After this period, the cultures were inactivated by the addition of 1:5,000 thimerosal (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) solution and left to rest for five days at 4 °C. Then they were filtered on Whatman® paper n°. 3 (Whatman, Brentford, UK) and the supernatants were concentrated by lyophilization (Edward's – Super Modulyo) and stored at -20 °C until the moment of use. Protein contents were subsequently quantified by the Bradford method¹⁸.

Dot-blot assay

The methodology was in PBS (pH 7.4) containing 5% non-fat dry milk (PBS-L 5%), under constant shaking at room temperature. These adsorbed and blocked membranes were stored at room temperature until use. For antibody detection, the membranes were placed on plates containing channels and then incubated for 2h with 1 mL dilutions of either 1:100 of the test sera (individual sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, aspergillosis and sera from healthy individuals as well as anti-fungal polyclonal antibodies) in PBS containing 3% non-fat dry milk (PBS-L 3%), under constant shaking at room temperature. After three washes with 1 mL per well of 0.1% Tween-20 in PBS (PBS-T 0.1%), the membranes were immersed in a 1:2,000 dilutions of secondary antibody: goat anti-human IgG immunoglobulin conjugated to peroxidase (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) in PBS-L 3% for 90 minutes, at room temperature. After this incubation time the membranes were washed again. Then, the membranes were immersed in a fresh mixture prepared using 15 mg of 4-chloro-1-naphtol (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) diluted in 5mL of absolute methanol, 30 µL of 30-vol hydrogen peroxide and 20 mL Tris-HCl 0,5 M pH 6.8. The reaction was stopped by washing with distilled water.

Nitrocellulose membranes were dried on filter paper and the development of blue dots was considered evidence of a positive result.

Three researchers with expertise in enzyme-linked immunosorbent assays such as immunoblotting and ELISA performed the analysis of a serum anonymous sample. The samples were identified with sequential numbering to avoid identification of cases and controls by analysts. The DB assays were then performed on different days, including all the steps of the method. The test was carried out in duplicate to evaluate the intra- and inter-related content.

Analysis of the membranes stability

Nitrocellulose membranes previously sensitized with the *P. brasiliensis*, *H. capsulatum* and *A. fumigatus* antigens, were maintained at room temperature and evaluated progressively for their antigenic reactivity over the time periods of 7, 15, 30, 45, 60 and 90 days.

Double immunodiffusion assay

The reactions were performed according to the modified Ouchterlony's method²². Glass slides were covered with 3.0 mL of a gel composed of 1% agarose type II medium (Sigma Chemical Co., MO, USA) in a buffered saline solution pH 6.9 containing 0.4% sodium citrate and 7.5% glycine. Antigen (12 µL) was placed in the central well, while control and patient sera (12 µL) were put in the surrounding wells. The slides were incubated in a humid chamber at room temperature for 48 hours. Then, they were washed with saline solution with several changes over a 24-hour period. Gels were dried and stained in 0.4% Coomassie brilliant blue R-250® (Sigma Chemical Co., MO, USA) in an ethanol-acetic acid-water mixture as solvent.

RESULTS

The analysis of the results for Dot-blot for the immunodiagnosis of histoplasmosis revealed 100% co-positivity and 83.3% co-specificity and, for *A. fumigatus*, the intrinsic parameter calculations were 71.4% and 100% for co-positivity and co-specificity, respectively.

The shelf life or stability of nitrocellulose membranes sensitized with *H. capsulatum* and *A. fumigatus* antigens showed a different pattern from that previously obtained for membranes sensitized with *P. brasiliensis*^{13,21}. For histoplasmosis the membranes revealed stability for 90 days and for aspergillosis the membranes remained stable for 30 days.

The analysis of the results of the multiparametric Dot-blot revealed the occurrence of cross-reactivity both of the species-specific polyclonal antibodies and of the serum samples with the different antigenic preparations immobilized on the nitrocellulose membrane. A high cross-reactivity index was observed when serum samples from patients with paracoccidioidomycosis were evaluated: 82% of the samples also showed reactivity against the *H. capsulatum* antigen and 48.4% against the *A. fumigatus* antigen. Of the total serum samples from patients with histoplasmosis, 55% reacted against the antigen of *P. brasiliensis* and 27% against the antigen of *A. fumigatus* and of the total of serum samples from patients with aspergillosis, 52% also showed reactivity towards the antigen. *P. brasiliensis* and 64% against *H. capsulatum* antigen as presented in [Figure](#).

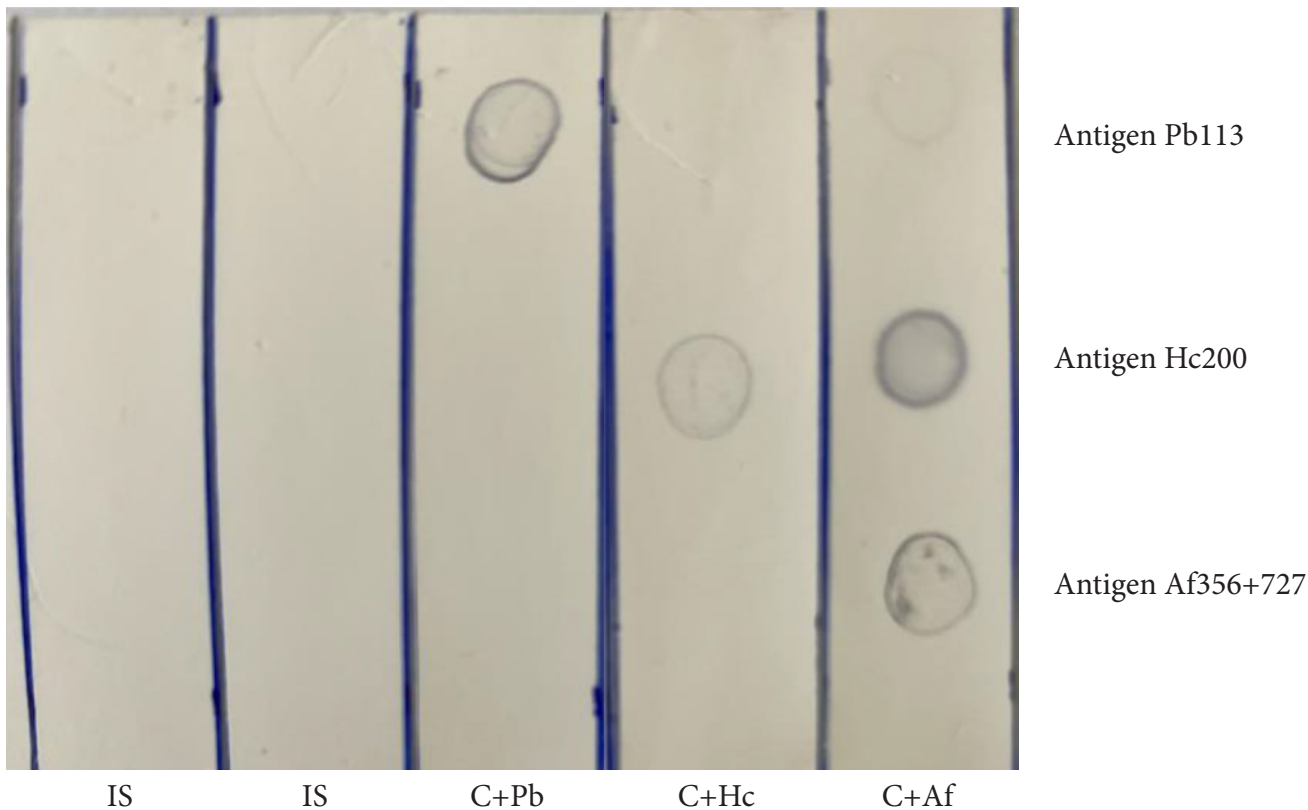


Figure. Cross-reactivity *A. fumigatus*' polyclonal species-specific anti-antigen against *P. brasiliensis* and *H. capsulatum* antigens, where Ag Pb113 is the antigen of *P. brasiliensis*, sample 113; Ag Hc200 is an antigen of *H. capsulatum*, isolated 200; Ag Af356+727 is the antigen of *A. fumigatus*, pool of samples 356 and 727; IS means healthy individual; C+ Pb means tape incubated with the polyclonal anti-antigen of *P. brasiliensis*; C+ Hc means tape incubated with the anti-antigen of *H. capsulatum* and C+ Af means tape incubated with the anti-antigen of *A. fumigatus*

DISCUSSION AND CONCLUSION

Given the excellent experience obtained with the standardization and validation of the Dot-blot methodology for the immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis and seeking new alternatives that could contribute to the quick diagnosis of the infectious processes caused by *H. capsulatum* and *A. fumigatus*, for the development of this study it was proposed to standardize the multiparametric Dot-blot assay with the objective of simultaneously evaluating and discriminating positive or highly suspicious cases for the three conditions, that are, paracoccidioidomycosis, histoplasmosis and aspergillosis.

The standardization of the multiparametric assay preceded the individual assessment of Dot-blot for histoplasmosis and aspergillosis. Given the high rate of co-positivity, it can be suggested that the Dot-blot methodology aimed at the immunodiagnosis of histoplasmosis can be used as a serological screening test, helping as observed in the Dot-blot for *P. brasiliensis*, for the quickly release of discarded cases, allowing that the diagnostic hypothesis initially formulated to be reviewed. On the other hand, the high co-specificity index suggests that Dot-blot for the immunodiagnosis of aspergillosis can be used as a test for diagnosis, since it discriminated against all truly positive sera.

The high rate of cross-reactivity observed in the multiparametric Dot-blot was not new, since this phenomenon has been frequently reported in the immunodiagnosis of mycoses by several authors. There

are several hypotheses for this. One of them, perhaps the most important, focuses on the composition of the cell wall of fungal species. The three main components of the cell wall, shared by most clinically important fungal species, are: β -glucans (which are polymers of glucose), especially β -(1,3)-glucans; chitin (which is a polymer of N-acetylglucosamine) and mananas (which are chains of several hundred mannose molecules that are added to fungal proteins through N or O linkages)²³⁻²⁵. Connolly et al²⁶, in an attempt to develop an quantitative enzyme immunoassay for the diagnosis of histoplasmosis demonstrated cross-reactivity in 80% of samples from patients with paracoccidioidomycosis or pneumocystosis, in 60% of those with coccidioidomycosis, and almost 10% of those with aspergillosis.

Other hypotheses that can explain the occurrence of reactivity crossed are: the overlapping of the ecological niche of different fungal species; the composition of the cell wall; the ubiquity of antigenic determinants; the presence of heterophile antibodies and the great antigenic similarity between dimorphic fungi²⁷⁻³². Sato et al²⁷ evaluated the performance of the Dot-ELISA assay aiming the investigation of circulating anti-*B. dermatitidis* antibodies against 21 serum samples from patients with blastomycosis, obtaining a sensitivity of 76.2%.

The occurrence of cross-reactivity was observed against antigenic preparations of *H. capsulatum* and *Coccidioides immitis*. According to the authors, as the endemic of blastomycosis and histoplasmosis overlap one cannot be completely sure that anti-*Histoplasma* antibodies are absent in those patients with diagnosed blastomycosis. Two works developed in the Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses, support and corroborate the hypothesis that the similarity antigenicity or sharing of antigenic determinants may be involved in cross-reactivity. Beraldo³⁰ confirmed the existence of cross-reactivity between *P. brasiliensis* and *P. lutzii* by observing that 91.66% of serum samples from patients with confirmed paracoccidioidomycosis, residing in a non-endemic region for *P. lutzii*, and with serological reactivity for *P. brasiliensis*, showed reactivity against *P. lutzii* antigenic preparations. It was also observed that 76.19% of serum samples from patients with paracoccidioidomycosis, residing in the state of Rondônia, Brazil, a potentially endemic region for *P. lutzii*, also showed serological reactivity against both antigenic preparations. In the same study, the evaluation of the electrophoretic profile of *P. lutzii* and *P. brasiliensis* antigens reveals that both species present in their antigenic constitution fractions that are common to each other.

Buccheri et al³¹ confirmed the antigenic complexity present in the genus *Paracoccidioides* and warned of the need for a careful interpretation of the results generated. In this work, the authors used the immunoblotting assay to verify the pattern of recognition from a biological sample obtained from a patient with no epidemiological link to *P. lutzii*, but with serological reactivity, titer of 1:256, by double immunodiffusion assay. Thus, the sample was evaluated by immunoblotting, against the culture filtrate obtained from the *P. brasiliensis* isolate 113 and against the cell free antigen of *P. lutzii*, revealing strong recognition of the 43 and 70 kDa fractions of *P. brasiliensis* and the recognition of multiple fractions, between 26 to 115 kDa, of *P. lutzii*. Using the semi Nested PCR assay, the patient sequence was found to show 98% identity when compared to the *P. brasiliensis* gp43 sequences available from GenBank®.

The use of purified or recombinant antigens was discarded for the development of this work for two reasons. The first is that this strategy makes the method more expensive and does not match the philosophy of the Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses, that is, the development of low-cost products that can be used by laboratories without so many technological and human resources. The second is that different studies have shown the existence of cross-reactivity even when using recombinant antigens. The most recent, published by Peron et al³² aiming at the diagnosis of paracoccidioidomycosis,

showed that the use of rHSP60 did not prove to be a good diagnostic option due to the high index of cross reactions observed.

This research project was idealized thinking mainly about developing a diagnostic platform that could serve as a tool for screening or even for the rapid and accurate diagnosis of paracoccidioidomycosis, histoplasmosis and aspergillosis. The expectation was that the multiparametric Dot-blot could be validated and made available to the Public Health system, not only at the Adolfo Lutz Institute, but that it could be shared and implemented in more distant laboratories and with less installed capacity in both it concerns the technological park as well as in relation to human resources when compared to the laboratories considered to be reference or universities that are strategically and geographically located in large centers.

It was also expected that the multiparametric Dot-blot could be used in the field, helping to carry out seroepidemiological surveys, as Brazil lacks information on the prevalence of mycoses. The expectation was that Dot-blot would be developed without the need to use more refined and complex technologies, such as, for example, the use of purified or recombinant antigens and even chemical treatment of the antigens aiming at their deglycosylation, a procedure that oxidizes the glycidic part of the antigens contributing to the reduction of cross-reactivity, as these procedures increase the final cost of the product.

Although this study did not reach its main objective, that is, the standardization of a platform that would allow the simultaneous assessment of circulating antibodies against *Paracoccidioides* spp., *H. capsulatum* and *A. fumigatus*, we are certain of the need to conduct other studies that further investigate the serological approach for the diagnosis of these mycoses.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest.

FUNDING

This research has been co-financed by Adolfo Lutz Institute (Projeto CTC-IAL#42-J/2017) and by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

Camila Mika Kamikawa conducted laboratory evaluations and drafted the first version of the article. Adriana Pardini Vicentini made critical revision of the text. All authors read and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS:

We thank the financial support of Adolfo Lutz Institute (Projeto CTC-IAL#42-J/2017). Camila Mika Kamikawa received a grant from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). We are grateful to Miss Lucia Cupertino Barreto (*in memoriam*), for technical assistance.

PRESENTATION NOTE

The partial results of this article integrate the doctoral thesis by Camila Mika Kamikawa, entitled "Standardization of the Dot-blot methodology for the multiparametric diagnosis of mycoses of interest in Public Health", defended in 2020, in the Programa de Pós-Graduação em Ciências of the Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

REFERENCES

1. Bongomin F, Gago S, Oladele RO, Denning DW. Global and multi-national prevalence of fungal diseases – estimate precision. J Fungi. 2017;3(4):57.
<https://doi.org/10.3390/jof3040057>
2. Silva-Ferreira C, de Castro Ribeiro EM, Miranda Goes AD, Mello Silva BD. Current strategies for diagnosis of paracoccidioidomycosis and prospects of methods based on gold nanoparticles. Future Microbiol. 2016;11:973-85.
<https://doi.org/10.2217/fmb-2016-0062>
3. Almeida-Silva F, Gonçalves D, Abreu Almeida M, Guimarães AJ. Current aspects of diagnosis and therapeutics of histoplasmosis and future trends: moving onto a new immune (diagnosis and therapeutic) era? Curr Clin Micro Rpt. 2019;6:98-107.
<https://doi.org/10.1007/s40588-019-00118-3>
4. Alvarado P, Pérez-Rojas Y, Zambrano EA, Gonzatti MI, Roschman-González A. Improved serodiagnosis of histoplasmosis by use of deglycosylated extracellular released antigens of *Histoplasma capsulatum*. J Microbiol Methods. 2020;175:105981.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105981>
5. Latgé JP, Chamilos G. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis in 2019. Clin Microbiol Rev. 2019;33(1):e00140-18.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00140-18>
6. Volpe Chaves CE, do Valle Leone de Oliveira SM, Venturini J, Grande AJ, Silvestre TF, Poncio Mendes R et al. Accuracy of serological tests for diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis: a systematic review and meta-analysis. PLoS One. 2020;15(3):e0222738.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222738>
7. da Silva JF, de Oliveira HC, Marcos CM, Assato PA, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJS. Advances and challenges in paracoccidioidomycosis serology caused by Paracoccidioides species complex: an update. Diagn Microbiol Infect Dis. 2016;84(1):87-94.
<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.06.004>
8. Pappas MG. Recent applications of the Dot-ELISA in immunoparasitology. Vet Parasitol. 1988;29(2-3):105-29.
[https://doi.org/10.1016/0304-4017\(88\)90120-3](https://doi.org/10.1016/0304-4017(88)90120-3)

9. Tabora CP Camargo ZP. Diagnosis of paracoccidioidomycosis by Dot immunobinding assay for antibody detection using the purified and specific antigen gp43. J Clin Microbiol. 1994;32(2):554-6.
[https://doi.org/ 10.1128/jcm.32.2.554-556.1994](https://doi.org/10.1128/jcm.32.2.554-556.1994)
10. Martins R, Marques S, Alves M, Fecchio D, de Franco MF. Serological follow-up of patients with paracoccidioidomycosis treated with itraconazole using Dot-blot, ELISA and Western-blot. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1997;39(5):261-9.
[https://doi.org/ 10.1590/s0036-46651997000500004](https://doi.org/10.1590/s0036-46651997000500004)
11. Carvalho KC, Vallejo MC, Camargo ZP, Puccia R. Use of recombinant gp43 isoforms expressed in *Pichia pastoris* for diagnosis of paracoccidioidomycosis. Clin Vaccine Immunol. 2008;15(4):622-9.
[https://doi.org/ 10.1128/CVI.00437-07](https://doi.org/10.1128/CVI.00437-07)
12. Assunção TRS. Desenvolvimento de método para diagnóstico da paracoccidioidomicose humana utilizando antígeno recombinante de *Paracoccidioides brasiliensis*. [dissertação de mestrado]. Londrina (PR): Universidade Estadual de Londrina; 2012.
13. Kamikawa, CM, Mendes RP, Vicentini AP. Standardization and validation of Dot-ELISA assay for *Paracoccidioides brasiliensis* antibody detection. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2017;23:11.
[https://doi.org/ 10.1186/s40409-017-0101-3](https://doi.org/10.1186/s40409-017-0101-3)
14. Shahid M, Malik A, Bhargava R. Prevalence of aspergillosis in chronic lung diseases. Indian J Med Microbiol. 2001;19(4):201-5.
15. Malik A, Shahid M, Bhargava R. Prevalence of aspergillosis in bronchogenic carcinoma. Indian J Pathol Microbiol. 2003;46(3):507-10.
16. Shahid M, Malik A, Bhargava R. Bronchogenic carcinoma and secondary aspergillosis common yet unexplored: evaluation of the role of bronchoalveolar lavage-polymerase chain reaction and some nonvalidated serologic methods to establish early diagnosis. Cancer. 2008;113(3):547-58.
[https://doi.org/ 10.1002/cncr.23570](https://doi.org/10.1002/cncr.23570)
17. Silva DF. Análise da estabilidade de exoantígenos de *Paracoccidioides brasiliensis* [dissertação de mestrado]. São Paulo (SP): Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde; 2005.
18. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72(1-2):248-254.
[https://doi.org/ 10.1006/abio.1976.9999](https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999)

19. Freitas RS. Caracterização fenotípica e padronização de antígenos de *H. capsulatum* var. *capsulatum* para o diagnóstico da histoplasmose. [dissertação de mestrado]. São Paulo (SP): Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde; 2005.
20. Freitas RS, Kamikawa CM, Vicentini AP. Fast protocol for the production of *Histoplasma capsulatum* antigens for antibody detection in the immunodiagnosis of histoplasmosis. Rev Iberoam Micol. 2018;35(1):27-31.
<https://doi.org/10.1016/j.riam.2017.04.004>
21. Kamikawa CM. Padronização da metodologia de Dot-blot para o diagnóstico rápido da paracoccidiodomicose. [dissertação de mestrado]. São Paulo (SP): Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde; 2014.
22. Ouchterlony O. Antigen-antibody reactions in gels. Acta Path Microbiol Scand. 1949;26(4):507-15.
<https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1949.tb00751.x>
23. Gorocica P, Taylor ML, Alvarado-Vásquez N, Pérez-Torres A, Lascurain R, Zenteno E. The interaction between *Histoplasma capsulatum* cell wall carbohydrates and host components: relevance in the immunomodulatory role of histoplasmosis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104(3):492-6.
<https://doi.org/10.1590/s0074-02762009000300016>
24. Gow NAR, Latge JP, Munro CA. The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function. Microbiol Spectr. 2017;5(3).
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016>
25. Garcia-Rubio R, de Oliveira HC, Rivera J, Trevijano-Contador N. The fungal cell wall: candida, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* species. Front Microbiol. 2020;10:2993.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02993>
26. Connolly PA, Durkin MM, Lemonte AM, Hackett EJ, Wheat LJ. Detection of histoplasma antigen by a quantitative enzyme immunoassay. Clin Vaccine Immunol. 2007;14(12):1587-91.
<https://doi.org/10.1128/CVI.00071-07>
27. Sato H, Honigman AS, Scalarone GM. Development of a comparative Dot-ELISA for the detection of antibodies in blastomycosis. Diagn Microbiol Infect Dis. 1987;7(1):37-43.
[https://doi.org/10.1016/0732-8893\(87\)90067-8](https://doi.org/10.1016/0732-8893(87)90067-8)
28. Mendes-Giannini MJ, Camargo ME, Lacaz CS, Ferreira AW. Immunoenzymatic absorption test for serodiagnosis of paracoccidiodomycosis. J Clin Microbiol. 1984;20(1):103-8.
<https://doi.org/10.1128/jcm.20.1.103-108.1984>

29. Sylvestre TF, Silva LRF, Cavalcante RS, Moris DV, Venturini J, Vicentini AP et al. Prevalence and serological diagnosis of relapse in paracoccidioidomycosis patients. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(5):e2834.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002834>
30. Beraldo KR. Comparação do perfil antigênico de *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii* para o imunodiagnóstico da paracoccidioidomicose. [dissertação de mestrado]. São Paulo (SP): Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde; 2018.
31. Buccheri R, Morais VS, Kamikawa CM, Vidal MSM, Naves G, Del Negro GMB et al. Case report: misleading serological diagnosis of paracoccidioidomycosis in a young patient with the acute form disease: *Paracoccidioides brasiliensis* or *Paracoccidioides lutzii*?. Am J Trop Med Hyg. 2018;98(4):1082-85.
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0812>
32. Salazar F, Brown GD. Antifungal innate immunity: a perspective from the last 10 years. J Innate Immun. 2018;10(5-6):373-97.
<https://doi.org/10.1159/000488539>
33. Peron G, Fernandes FF, Landgraf TN, Martinez R, Panunto-Castelo A. Recombinant 60-kDa heat shock protein from *Paracoccidioides brasiliensis*: is it a good antigen for serological diagnosis of paracoccidioidomycosis? Braz J Med Biol Res. 2017;50(4):e5928.
<https://doi.org/10.1590/1414-431X20175928>





Ocorrência de perigos físicos em alimentos

Occurrence of physical hazards in food

Elaine Cristina de Mattos^{1*} , Laís Fernanda de Pauli-Yamada² , Augusta Mendes da Silva² , Márcia Dimov Nogueira² , Márcia Bittar Atui² , Maria Aparecida Moraes Marciano² 

¹ Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas, Centro de Laboratório Regional de Santo André, Instituto Adolfo Lutz, Santo André, SP, Brasil.

² Núcleo de Morfologia e Microscopia, Centro de Alimentos, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil.

*Autor de correspondência/Corresponding author: elaine.mattos@ial.sp.gov.br

Recebido/Received: 13.10.2021 - Aceito/Accepted: 31.03.2022

RESUMO

A ocorrência de matérias estranhas com potencial perigo físico em alimentos é um grande desafio para a indústria alimentícia, e a análise microscópica é provavelmente o instrumento mais útil para detectá-las e identificá-las. Considerando a escassez de dados sobre os perigos físicos em produtos alimentícios no Brasil, o objetivo deste estudo foi descrever essa ocorrência nos produtos analisados no Núcleo de Morfologia e Microscopia do Centro de Alimentos do Laboratório Central do Instituto Adolfo Lutz (IAL), em São Paulo, no período de 2008 a 2020. Os resultados revelaram que, das 7.221 amostras de alimentos analisadas, 89 (1,2%) estavam em desacordo com a legislação em vigor, por conterem perigos físicos. De acordo com a categoria de alimentos, a ocorrência foi maior para bebidas (43%), seguida de cereais, farinha e farelo (22%). Quanto ao tipo de matéria estranha, os plásticos (duros e flexíveis) foram os mais frequentes (48%), seguidos dos metais (15%) entre as partículas perigosas detectadas nas amostras. A detecção e identificação de perigos físicos, por meio de análises microscópicas, contribuem para a segurança e qualidade dos produtos alimentícios oferecidos à população.

Palavras-chave. Controle de Perigos, Segurança Alimentar, Análise de Alimentos, Microscopia, Risco à Saúde.

ABSTRACT

The occurrence of physical hazards in food is a great challenge for the food industry, and microscopic analysis is probably the most useful instrument to detect and identify them. Considering the scarcity of data on physical hazards in food products in Brazil, the aim of this study was to describe this occurrence in the products analyzed at the Nucleus of Morphology and Microscopy of the Food Center of the Adolf Lutz Institute's Central Laboratory (IAL) in São Paulo, from 2008 to 2020. Results revealed that of the 7,221 analyzed food samples, 89 (1.2%) did not comply with the legislation due to the presence of physical hazards. According to the food category, the occurrence was higher in beverages (43%), followed by cereals, yeasts, flour and bran (22%). Regarding the type of foreign matter, among the dangerous particles detected, the most frequently found were plastics (48%) (hard and flexible), followed by metals (15%). The detection and identification of physical hazards by microscopic analysis contributes to the safety and quality of food products offered to the public.

Keywords. Hazard Control, Food Safety, Food Analysis, Microscopy, Health Risk Behaviors.

INTRODUÇÃO

O alimento pode ser um meio de veiculação de agentes físicos, químicos ou biológicos perigosos à saúde humana, capazes de causar doenças e até mesmo a morte. A segurança dos alimentos é uma responsabilidade compartilhada entre produtores, processadores, transportadores, varejistas, fornecedores de serviços alimentícios e também do consumidor, uma vez que os potenciais riscos podem ser agregados durante toda a cadeia produtiva. Dentre os agentes físicos veiculados por alimentos, destacam-se os objetos rígidos, fragmentos de vidro e filmes plásticos capazes de causar lesões e repulsa ao consumidor, tornando o alimento impróprio ao consumo¹⁻⁴.

Considera-se matéria estranha em alimentos qualquer material não constituinte do produto, associado a condições ou práticas inadequadas na sua cadeia produtiva, incluindo fragmentos de vidro, metal ou plástico, dentre outros contaminantes^{2,5,6}. Objetos como fragmentos de metal, vidro, peças de plástico, pedras e madeira estão entre os tipos mais frequentes de matérias estranhas encontradas em alimentos^{7,8}.

A ocorrência de matérias estranhas nos alimentos é um grande problema para a indústria alimentícia. As reclamações dos consumidores prejudicam a reputação das empresas e podem causar perdas econômicas significativas, especialmente se a presença da matéria estranha levar ao recolhimento do produto do mercado (*recall*). A situação frequentemente é agravada pela divulgação na mídia e órgãos de defesa do consumidor^{5,9}.

A legislação sanitária brasileira, Resolução da Diretoria Colegiada – RDC ANVISA nº 623 de 09 de março de 2022, que revogou a RDC ANVISA nº 14 de 28 de março de 2014 (vigente até 30 de março de 2022), define como matérias estranhas de risco à saúde, dentre outros elementos que podem causar lesões ao consumidor: objetos rígidos, pontiagudos e/ou cortantes, iguais ou maiores que 7 mm (medido na maior dimensão), como fragmentos de osso ou de metal, lasca de madeira e plástico rígido; objetos rígidos, com diâmetros iguais ou maiores que 2 mm (medido na maior dimensão) como pedra, metal, dentes, caroço inteiro ou fragmentado; fragmentos de vidro de qualquer tamanho ou formato; e filmes plásticos que causem danos à saúde do consumidor².

A área de Microscopia Alimentar contribui com a detecção e identificação dessas matérias estranhas, sendo a análise macroscópica a abordagem inicial das investigações, com o objetivo de avaliar as prováveis fontes de contaminação e, quando possível, elucidar se o objeto estranho estava ou não no produto quando foi processado. É importante fazer uma observação minuciosa da matéria estranha, avaliando seu tamanho, coloração, textura, inserção no produto, antes do exame em estereomicroscópio, de preferência com registros fotográficos^{5,10}.

No Brasil, embora haja vários estudos sobre a ocorrência de patógenos em alimentos, principalmente relacionados a surtos¹¹⁻¹⁴, são poucos os registros na literatura sobre contaminantes físicos que representem potencial perigo à saúde. Considerando esta escassez de dados, os objetivos deste trabalho foram descrever a ocorrência de matérias estranhas com potencial perigo físico nos produtos analisados pelo Núcleo de Morfologia e Microscopia do Centro de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz – Laboratório Central de São Paulo, no período de 2008 a 2020, e ressaltar as formas de prevenção e controle desta ocorrência e sua relação com a saúde do consumidor.

MATERIAL E MÉTODOS

Procedeu-se um levantamento retrospectivo dos resultados das análises realizadas no Núcleo de Morfologia e Microscopia do Centro de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz (IAL) – Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de São Paulo, Brasil, no período de 2008 a 2020, relacionadas à presença de matérias estranhas consideradas perigos físicos, com exceção de sujidades.

Na ocasião das análises, a legislação em vigor aplicada às matérias estranhas em alimentos era a RDC ANVISA nº 14 de 28 de março de 2014, revogada em 01 de abril de 2022 pela RDC ANVISA nº 623 de 09 de março de 2022². Os procedimentos foram conduzidos com base nas orientações do *Technical Bulletin Number 5, Macroanalytical Procedures Manual*¹⁵ e dos manuais técnicos do Instituto Adolfo Lutz^{16,17}. O método contemplou a detecção macroscópica da matéria estranha por exame direto, confirmação da sua identificação com auxílio de instrumentos ópticos, quando necessário, e descrição minuciosa da amostra. As análises foram fotodocumentadas e as matérias estranhas foram avaliadas em relação às suas dimensões e localização no alimento, dentre outras evidências e particularidades.

Como critério de inclusão para este trabalho, foram considerados os resultados das amostras que continham matérias estranhas com as dimensões mínimas descritas na legislação sanitária. Para a análise dos resultados, foram feitos agrupamentos por tipo de matéria estranha e produto, e os dados foram tabulados em planilhas no programa Microsoft Excel® 2010 para análise descritiva e confecção das tabelas.

RESULTADOS

No período considerado, de 2008 a 2020, das 7.221 amostras de alimentos analisadas para pesquisa de matérias estranhas, 89 (1,2%) estavam em desacordo com a legislação, por conter matérias estranhas consideradas potenciais perigos físicos para o consumidor.

A **Tabela 1** demonstra a frequência de amostras que apresentaram matérias estranhas consideradas perigos físicos, por categoria de alimento, evidenciando que as bebidas foram o tipo de alimento com a maior ocorrência (43%), seguida de produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos (22%).

Tabela 1. Frequência de amostras que apresentaram matérias estranhas consideradas perigos físicos, por categoria de alimentos e tipo de matéria estranha

Categoria de Alimentos	Matéria Estranha											Total	%
	PR	PF	ME	MA	VI	BO	BA	PA	FD	FO	Outras		
Água mineral	1			1				1				3	3
Bebidas	14	17	1			1	1	4				38	43
Chocolates e produtos de cacau			3					1	1			5	6
Doces											1	1	1
Grãos	1											1	1

Legenda: PR – plástico rígido; PF – plástico flexível; ME – metal; MA – madeira; VI – vidro; BO – borracha; BA – barbante; PA – papel; FD – fragmento de dente; FO – fragmento de osso

Continua na próxima página

Continuação

Categoria de Alimentos	Matéria Estranha											Total	%	
	PR	PF	ME	MA	VI	BO	BA	PA	FD	FO	Outras			
Mistura para o preparo de alimentos e alimentos prontos para o consumo	1		1		1							1	4	4
Óleos, gorduras e creme vegetal	1												1	1
Proteína animal (Produtos cárneos e peixes)		1	3		1	1				2		3	11	12
Produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos	2	3	4	4	1	1	1	1	1			2	20	22
Produtos de tomate						1							1	1
Produtos lácteos						1							1	1
Produtos para adoçar			1										1	1
Sal	1												1	1
Vegetal em conserva							1						1	1
Total	21	21	13	5	3	5	3	7	2	2	7	89	100	

Legenda: PR – plástico rígido; PF – plástico flexível; ME – metal; MA – madeira; VI – vidro; BO – borracha; BA – barbante; PA – papel; FD – fragmento de dente; FO – fragmento de osso

Os dados apresentados na **Tabela 1** demonstram que, dentre as matérias estranhas detectadas nas amostras, os materiais plásticos foram os de maior ocorrência, com 48%, somando-se os rígidos e flexíveis, seguido pela presença de metais com 15%.

Os tipos de plásticos detectados, relacionados aos alimentos analisados, estão apresentados na **Tabela 2**. De 42 amostras que continham material plástico, 11 foram identificados como microtubos de laboratório, com ocorrência exclusiva em bebidas, e 21 como filmes plásticos detectados, principalmente, em bebidas (81%).

Tabela 2. Frequência e tipos de plásticos rígidos encontrados em amostras de alimentos analisadas no Instituto Adolfo Lutz, no período de 2008 a 2020

Plásticos	n	Tipos de alimentos
Microtubo de laboratório	11	Cerveja e refrigerante
Hastes flexíveis	2	Refrigerante
Fragmentos	3	Batata frita, pão de frios, sal rosa
Lacre refrigerante	1	Cerveja
Pontiagudo	3	Pão de frios, água mineral, margarina
Torcido e pontiagudo	1	Ervilha seca
Filmes plásticos	21	Refrigerante, cerveja, biscoito, linguiça

A **Tabela 3** apresenta os tipos de metais detectados nas amostras, demonstrando uma maior ocorrência em produtos cárneos, chocolate e pão francês.

Tabela 3. Frequência e tipos de metais encontrados em amostras de alimentos analisadas no Instituto Adolfo Lutz, no período de 2008 a 2020

Metais	n	Tipos de alimentos
Arame	2	Mortadela, chocolate em barra
Parafuso	2	Hamburguer, adoçante
Agulha de costura	1	Pão francês
Bocal de lâmpada	1	Farinha de trigo
Porca	1	Pão de queijo congelado
Tarrachas pontiagudas	1	Chocolate em barra
Corrente	1	Linguças
Filamentos metálicos	1	Chocolate em barra
Fragmento pontiagudo	1	Biscoito
Lâmina	1	Pão francês
Peças de equipamentos	1	Bebida

Em relação aos demais tipos de matérias estranhas detectados, apresentados na **Tabela 1**, os fragmentos de madeira ocorreram principalmente em produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos como biscoito, pão francês e panetone, além de uma amostra de água mineral, sendo a maioria deles pontiaguda (80%). Fragmentos de vidros foram identificados em lanche pronto, hambúrguer e farinha de trigo, sendo neste caso um fragmento de lâmpada. Derivados de borracha como fragmento de luvas e outros fragmentos foram detectados em alimentos diversos como iogurte, refrigerante, mortadela e biscoito. Em uma amostra de extrato de tomate foi encontrado um preservativo. Pedacos de barbante de cerca de 10 cm foram isolados de amostras de milho verde em conserva, refrigerante e biscoito. Fragmentos de papel ocorreram principalmente em bebidas (71%), além de amostras de chocolate, biscoito e água mineral. Fragmento de dente foi encontrado em pão francês e bombom, e fragmento de osso em duas amostras de linguça.

A categoria “Outras” (**Tabela 1**) foi composta por matérias estranhas diversas detectadas em diferentes alimentos. Entre elas destaca-se uma concha de molusco em amostra de salgadinho de milho; fragmentos de esponja de limpeza em doce e em produto de cereais; espinha em filé de peixe; fibras sintéticas em produtos de cereais; pele animal e pelos em produtos cárneos; roedor inteiro em milho em conserva e em pipoca doce, e um anuro inteiro em amostra de pickles.

Na **Figura** estão destacados exemplos de matérias estranhas isoladas das amostras de alimentos, consideradas como potenciais perigos físicos.

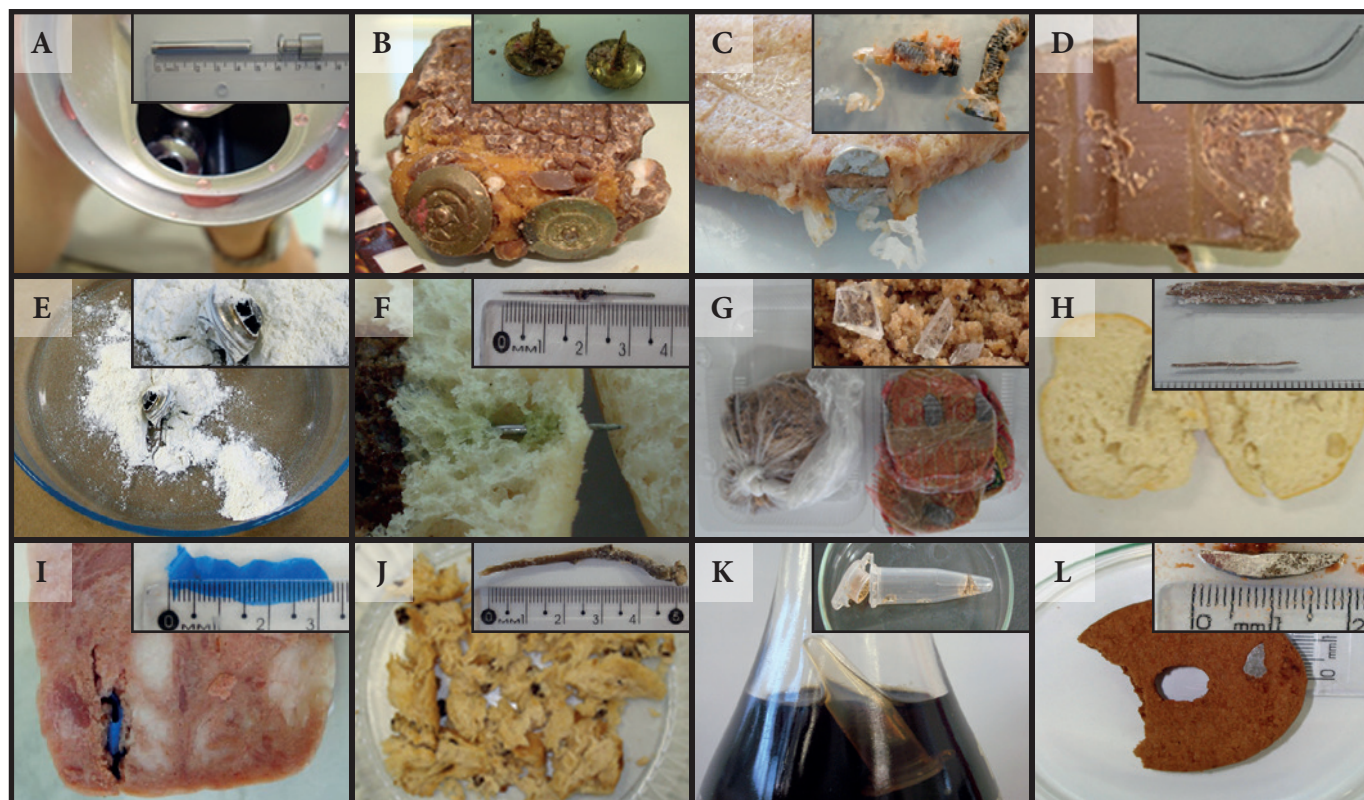


Figura. Amostras de alimentos contendo matérias estranhas e detalhe das estruturas consideradas como potencial perigo físico em amostras insatisfatórias: (A) bebida com peças metálicas em seu interior; (B) chocolate contendo peças metálicas pontiagudas; (C) produto cárneo contendo parafusos; (D) chocolate com arame inserido; (E) farinha de trigo com bocal de lâmpada e fragmentos de vidro; (F) pão francês com agulha de costura inserida na massa; (G) hambúrguer com fragmentos de vidro; (H) pão francês contendo fragmento de vegetal; (I) linguíça calabresa contendo plástico flexível; (J) amostra de panetone contendo pedúnculo vegetal; (K) refrigerante retornável com microtubo de laboratório em seu interior; (L) biscoito de chocolate com fragmento metálico parcialmente inserido na massa

DISCUSSÃO

Considerando-se o total de amostras analisadas no período do estudo, o percentual relativo à presença de matérias estranhas com potencial perigo físico é baixo (1,2%), contudo é relevante, por se tratar de matérias estranhas com probabilidade de causarem lesões importantes aos consumidores.

Relatos na literatura alertam para a ingestão acidental de corpos estranhos, incluindo os relacionados a alimentos, por populações vulneráveis como idosos e crianças menores de 6 anos, sendo, muitas vezes, necessária intervenção endoscópica para a remoção, dependendo do seu tamanho. Em relação aos fatores de risco, os objetos cortantes e pontiagudos são os mais implicados em injúrias, seja com lesões na boca ou perfurações e engasgamentos¹⁸⁻²⁰.

A agência americana *U.S. Food and Drug Administration (FDA)* tem monitorado lesões resultantes de corpos estranhos desde 1972 e concluiu que, em geral, objetos estranhos rígidos ou pontiagudos

medindo entre 7 mm e 25 mm são considerados perigosos e podem causar lesões²¹. No entanto, o tamanho da matéria estranha deve ser analisado caso a caso. O *US Food Safety* e o serviço de inspeção americano concluíram, por exemplo, que partículas ósseas com dimensão de 1 a 2 cm são de baixo risco, enquanto as partículas maiores que 2 cm têm maior potencial de causar lesões aos consumidores²². As principais lesões que as matérias estranhas pontiagudas e rígidas podem causar incluem laceração e perfuração dos tecidos da boca, língua, garganta, estômago e intestino, bem como danos aos dentes e gengivas²³.

Algumas matérias estranhas como os plásticos, detectados com maior frequência nas amostras analisadas, são partes de embalagens de produtos, como invólucros de balas e cigarros. Com o uso crescente de plásticos nas indústrias, em substituição a metais e vidros, especialmente nas embalagens, não é surpreendente que muitas empresas de alimentos os considerem como uma das causas mais importantes e recorrentes de reclamações de consumidores⁹.

Dentre os plásticos encontrados, os fragmentos pontiagudos, gerados muitas vezes pela quebra de utensílios, representam um risco à saúde por serem de difícil visualização e com possibilidade de causarem lesões. Entretanto, os microtubos foram os materiais plásticos que se destacaram por sua ocorrência em bebidas de embalagens retornáveis. Este fato pode estar relacionado à introdução manual desses objetos por consumidores, de forma intencional, associado à falhas nos procedimentos de lavagem e higienização. Algumas técnicas podem ser utilizadas na indústria para a detecção de materiais plásticos, como métodos de filtragem²⁴, ultrassom²⁵ e imagem hiperespectral²⁶. Li et al²⁷ e Einarsdóttir et al²⁸ propuseram uma solução para este problema introduzindo as lentes de raios-X policapilares e imagens de raios-X multimodais baseadas em grade.

Os metais, segundo tipo de material detectado com maior frequência neste estudo, em sua maioria se tratavam de peças dos maquinários utilizados na indústria que, possivelmente, se desprenderam nos processos de produção. Porém, outras ocorrências merecem destaque, como o caso da amostra de pão francês que continha lâmina e agulha de costura, utilizadas como ferramenta para sulcar a superfície da massa e retirar bolhas ocasionadas pela fermentação, que podem ter sido descuidadamente esquecidas.

Uma ampla gama de fragmentos de metal é relatada em produtos alimentícios, como fragmentos de arame, peneiras, fio elétrico, latas, ferramentas de corte e peças de maquinários⁹, semelhantes aos resultados obtidos neste estudo. Losito et al²⁹ apontam que a falta de uso de detectores de metal nas plantas de produção é um dos maiores riscos para a segurança dos alimentos.

Avanços consideráveis no emprego de equipamentos mais eficientes ocorreram nos últimos anos, entre os dispositivos eletrônicos de detecção de metal. Portanto, além das técnicas de baixo custo, como os detectores de metal e ímãs, há também métodos como espectroscopia no infravermelho próximo (NIR)³⁰, técnica de imagem hiperespectral (HSI)³¹ e microscopia eletrônica de varredura (SEM), sendo este último um excelente método para determinar o tipo de metal, com base em sua composição, e para distinguir um tipo de metal de outro⁵.

Os fragmentos de vidro estão entre as matérias estranhas consideradas de perigo físico mais importante, independente de seu tamanho, devido à possibilidade de causar ferimentos graves⁹, como observado no presente estudo, em uma amostra de lanche pronto para o consumo, onde o risco de ingestão acidental é maior do que em alimentos que seriam processados, como o hambúrguer cru.

Eventualmente, partículas semelhantes a vidro são encontradas em alimentos como, por exemplo, plásticos, estruvita (fosfato de amônio e magnésio) em produtos enlatados, dióxido de silício

e bitartarato de potássio. Para diferenciar essas outras substâncias, que podem ser erroneamente classificadas como vidro, pode ser usada a espectroscopia por dispersão de energia (EDS), procedimento não destrutivo que fornece uma análise semiquantitativa de fragmentos de vidro⁵. Partículas de açúcar ou sal cristalizado do próprio produto também podem ser confundidas com fragmentos de vidro e, nestes casos, uma análise microscópica permite a sua diferenciação e caracterização, podendo ser usado também o recurso da polarização.

Dentre os derivados de borracha, o preservativo em amostra de molho de tomate chama a atenção, não pelo seu potencial de causar danos ao consumidor, pois pode ser detectado a olho nu, exceto no caso de pessoas com deficiências visuais, mas pelo caráter repugnante e provavelmente intencional desse tipo de ocorrência. Diferente disso, os fragmentos de luvas, detectados no biscoito e na mortadela, possivelmente de caráter acidental, apresentam maior risco de ingestão por serem menores e estarem inseridos na massa.

De maneira geral, as matérias estranhas rígidas, pontiagudas e/ou cortantes detectadas neste estudo, como fragmentos de madeira e de dente em produtos de cereais, e fragmentos de ossos em produtos cárneos, representam um alto risco de injúria aos consumidores pela sua rigidez e baixa capacidade de percepção visual, quando inserido no alimento.

A presença de fragmentos de ossos em produtos cárneos pode estar relacionada a falhas no processo de desossa e deve ocorrer, até mesmo, com maior frequência do que a relatada no presente estudo, porém são raras as publicações sobre matérias neste tipo de alimento no Brasil. Em produtos cárneos, aves e frutos do mar comercializados no Canadá, a frequência de ossos é significativamente mais alta do que metal, vidro e pedra, devido às falhas no processo de separação das partes comestíveis de partes indesejáveis, como ossos, aponevroses e cartilagens, por exemplo²⁵. Djekic et al⁷ e Capla et al³² revelaram notificações frequentes da presença de matérias estranhas de risco à saúde em produtos de origem animal na Europa Ocidental.

Em muitos países, a ocorrência de matérias estranhas em alimentos é a causa mais comum de denúncias relacionadas aos produtos alimentícios. Na União Europeia esse tipo de notificação é enviada ao *Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF)*, plataforma que mantém dados atualizados sobre segurança e fraude alimentar. No Canadá há a *Canadian Food Inspection Agency (CFIA)* que também conta com um sistema de notificações e estatísticas sobre problemas relacionados às indústrias de alimentos. Nos EUA, tanto o *U.S. Department of Agriculture (USDA)* como o *FDA* recebem as denúncias de consumidores e mantêm um banco de dados sempre atualizado a respeito dessas ocorrências³³⁻³⁶.

Um estudo desenvolvido na Europa compilou dados de notificações de injúrias pelo consumo de alimentos, no período de 1998 a 2015, e revelou que houve 1.446 registros referenciando “matéria estranha”. A análise das categorias de alimentos envolvidas nessas notificações revelou que as três mais envolvidas foram frutas e vegetais, nozes, produtos de nozes e sementes e produtos de panificação e confeitaria⁷.

Capla et al³² avaliaram as notificações da União Europeia no *RASFF* para presença de matérias estranhas no período de 2016 a 2018, e encontraram um total de 409 notificações em que foi possível constatar que vidro, metal e plástico foram prevalentes na Europa Ocidental, e insetos e borracha foram mais comumente relatados no norte da Europa. O risco grave estava presente em 63,6% dos casos, pouco graves em 23% dos casos e indefinidos apenas em 13,4% dos casos.

Em Hong Kong, o *Centre for Food Safety* reportou que, dentre os incidentes alimentares do ano de 2019, incluindo microbiológicos, químicos e físicos, 24% estavam relacionados a ocorrências de perigos físicos³⁷.

Dados do Canadá, oriundos do *CFIA*, revelaram um total de 269 notificações no período de 2014 a 2019, com maior número de notificações para produtos hortifrutícolas, seguidos de carnes, aves e frutos do mar, entre outros produtos alimentícios. De forma geral, além das contaminações biológicas, as reclamações sobre alimentos pela presença de matérias estranhas, no período do estudo, foram pela ocorrência de metal, plástico, objeto desconhecido e vidro²⁵.

Os resultados do estudo de Khairi et al²⁵ indicaram que existiu uma associação entre os produtos alimentares e os tipos de contaminantes físicos. Fragmentos de plástico e osso foram significativamente mais encontrados em laticínios e carnes, aves e frutos do mar. Vidro foi encontrado mais expressivamente em vinhos e bebidas e outros produtos alimentícios. Plástico foi o material altamente detectado em doces e produtos de confeitaria.

De acordo com dados do *FDA*, relacionados a *recalls*, retiradas de produtos do mercado e alertas de segurança sobre alimentos, somente 34 ocorrências foram relativas à presença de matérias estranhas no período de 2017 a 2021. Em relação aos tipos de alimentos, leites e produtos lácteos foram os de maior ocorrência, seguidos de vegetais, produtos de panificação e cereais, frutas, produtos de origem animal, suplementos e molhos. O plástico foi a matéria estranha mais relatada, seguida de metal e vidro³⁶.

Os dados da Europa e Canadá diferem dos encontrados no presente estudo, considerando que os principais materiais de risco à saúde nos alimentos notificados foram vidro e metal. Contudo, as estatísticas dos Estados Unidos pelo *FDA* estão em concordância com os resultados deste trabalho, considerando que o plástico foi a principal matéria estranha de risco à saúde associada aos alimentos^{7,25,32,36}.

No Brasil há uma escassez de dados sobre a ocorrência de matérias estranhas consideradas perigos físicos, assim como não há um sistema de notificação para estes registros. Em 2016, Mattos et al⁸ descreveram os resultados das análises de alimentos realizadas no Instituto Adolfo Lutz, Centro de Laboratório Regional de Santo André (São Paulo), no período de 2001 a 2015, referentes à presença de matérias estranhas, e relataram que aquelas consideradas perigos físicos, como metal, pedra, vidro e madeira, foram encontradas em 8% das amostras analisadas.

A análise dos diferentes tipos de matérias estranhas nos produtos alimentícios permite inferir sobre as condições de fabricação, manipulação, embalagem e armazenamento dos alimentos. Esses resultados podem auxiliar na implementação do sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (HACCP) e na adoção das Boas Práticas³⁸⁻⁴⁰.

As Boas Práticas de Fabricação são procedimentos imprescindíveis para a minimização da contaminação dos alimentos por matérias estranhas, em especial aquelas associadas a perigos à saúde humana³⁸⁻⁴⁰.

CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que matérias estranhas diversas, consideradas prováveis perigos físicos, ocorrem em diferentes tipos de alimentos, embora sejam pouco relatados no Brasil. Plásticos rígidos ou flexíveis em bebidas foram as ocorrências de maior destaque neste estudo.

A divulgação desses dados colabora tanto para a indústria, na definição dos principais pontos críticos de controle no processo de produção, quanto para a avaliação da segurança dos alimentos ofertados à população.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não existir conflitos de interesse.

FINANCIAMENTO

Não declarado.

AGRADECIMENTO

Ao Antônio Roberto de Souza Ferreira, técnico de apoio à pesquisa do Centro de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz Laboratório Central, pelos registros fotográficos realizados. Ao Leovil Loreno Lira da Silva, Biomédico do Centro de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz Laboratório Central, pela ajuda na compilação dos dados.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Elaine Cristina de Mattos e Maria Aparecida Moraes Marciano participaram da concepção e planejamento do trabalho. Todos os autores declararam a participação na execução da metodologia, análise e interpretação dos dados e preparação do manuscrito. Declararam também que a versão final do manuscrito foi lida e aprovada por todos.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Presidência da República. Casa Civil. Lei nº. 8.078, de 11 de setembro de 1990. Código de Defesa do Consumidor. Dispõe sobre a proteção do consumidor e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 12 set 1990. Seção 1 (Supl):1-109. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l8078compilado.htm
2. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 623, de 09 de março de 2022. Dispõe sobre os limites de tolerância para matérias estranhas em alimentos, os princípios gerais para o seu estabelecimento e os métodos de análise para fins de avaliação de conformidade. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 16 mar 2022. Seção 1 (51):119-21.
3. Rodrigues RMMS, Martini MH, Chiarini PFT, Prado SPT. Matérias estranhas e identificação histológica em manjerona (*Origanum majorana* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.) e salsa (*Petroselinum sativum* Hoffm.), em flocos, comercializados no estado de São Paulo. Rev Inst Adolfo Lutz. 2005;64(1):25-30. Disponível em: <https://periodicos.saude.sp.gov.br/index.php/RIAL/article/view/33029>

4. Tondo EC. Perigos nos alimentos. São Paulo: Senac; 2020.
5. Charbonneau JE. Investigation of foreign substances in food. Scanning. 2001;23(1),51-7.
<https://doi.org/10.1002/sca.4950230107>
6. Edwards M. Other Significant Hazards: Physical Hazards in Foods. In: Motarjemi Y, Moy GGM, Todd ECD, editors. Encyclopedia of Food Safety. Elsevier Ltd; 2014.p.117-23.
7. Djekic I, Jankovic D, Rajkovic A. Analysis of foreign bodies present in European food using data from Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF). Food Control. 2017;79:143-9.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.03.047>
8. Mattos EC, Daros VSMG, Dal Col R, Nascimento AL. Occurrence of foreign matter in food: applied identification method – association of Official Agricultural Chemists (AOAC) and Food and Drug Administration (FDA). Int J Nutr Food Eng. 2016;10(3):133-7.
<https://doi.org/10.5281/zenodo.1111855>
9. Edwards MC, Stringer MF. The Breakdowns in Food Safety Group. Observations on patterns in foreign material investigations. Food Control. 2007;18(7):773-82.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.01.007>
10. Lewis DF. A tutorial and comprehensive bibliography on the identification of foreign bodies found in food. Food Structure. 1993;12(3):365-78. Disponível em:
<https://digitalcommons.usu.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1327&context=foodmicrostructure>
11. Herod A, Goodridge L, Rohde J. Recalls of foods due to microbial contamination classified by the Canadian Food Inspection Agency, 2000 to 2017. J Food Prot. 2019;82(11):1901-8.
<https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-235>
12. Lipcsei LE, Brown LG, Coleman EW, Kramer A, Masters M, Wittry BC et al. Foodborne illness outbreaks at retail establishments – National Environmental Assessment Reporting System, 16 State and Local Health Departments, 2014-2016. MMWR Surveill Summ. 2019;68(1):1-20.
<http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.ss6801a1>
13. Seys SA, Sampedro F, Hedberg CW. Factors associated with recovery of meat products following recalls due to Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Epidemiol Infect. 2016;144(14):2940-7.
<https://doi.org/10.1017/S0950268816001266>

14. Coordenação-Geral de Zoonoses e Doenças de Transmissão Vetorial do Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis (CGZV/DEIDT/SVS). Informe sobre surtos notificados de doenças transmitidas por água e alimentos – Brasil, 2016-2019. Boletim Epidemiológico [Internet]. 2020;51(32):27-31. Disponível em:
<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/arquivos/informe-sobre-surtos-notificados-de-doencas-transmitidas-por-agua-e-alimentos-2013-brasil-2016-2019.pdf>
15. U.S. Food and Drug Administration – FDA. Macroanalytical Procedures (MPM). Technical Bulletin N° 5. [acesso 2021 Set 09]. Disponível em:
<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/macroanalytical-procedures-manual-mpm>
16. Marciano MAM, Silva AM, Nogueira MD, Soares JS, Mattos EC, Zorzenon FJ et al. Manual técnico para a pesquisa de matérias estranhas – Volume I – Farinhas, massas, produtos de panificação e derivados de cereais. São Paulo: Núcleo de Morfologia e Microscopia, Centro de Alimentos, Instituto Adolfo Lutz; 2014.
17. Marciano MAM, Soares JS, Mattos EC, Silva AM, Nogueira MD, Zorzenon FJ et al. 2015. Manual técnico para a pesquisa de matérias estranhas – Volume II – Chás. São Paulo: Núcleo de Morfologia e Microscopia, Centro de Alimentos, Instituto Adolfo Lutz; 2015.
18. Aydoğdu S, Arıkan C, Cakir M, Baran M, Yüksekaya HA, Saz UE et al. Foreign body ingestion in Turkish children. Turk J Pediatr. 2009;51 (2):127-32.
19. Mathys P, D'Angelo F, Frossard JL, Bichard P. Prise en charge des corps étrangers digestifs. Rev Med Suisse. 2020;16(704):1560-3.
<https://doi.org/10.53738/REVMED.2020.16.704.1560>
20. Smith MT, Wong RK. Foreign bodies. Gastrointest Endosc Clin N Am. 2007;17(2):361-82, VII.
<https://doi.org/10.1016/j.giec.2007.03.002>
21. Stier FR. The dirty dozen: ways to reduce the 12 biggest foreign materials problems. Food Saf Mag. 2003;9(2):44-50. Disponível em:
<https://www.food-safety.com/articles/4797-the-dirty-dozen-ways-to-reduce-the-12-biggest-foreign-materials-problems>
22. Food Safety and Inspection Service – FSIS. Public Health Hazard Analysis Board Report; Availability. Federal Register. 9 CFR Parts 319 and 381. 1996;61(130):35157-8. Disponível em:
<https://www.govinfo.gov/content/pkg/FR-1996-07-05/pdf/96-17001.pdf>
23. Olsen AR. Regulatory action criteria for filth and other extraneous materials. I. Review of hard or sharp foreign objects as physical hazards in food. Regul Toxicol Pharmacol. 1998;28(3):181-9.
<https://doi.org/10.1006/rtp.1998.1249>




24. U.S. Food and Drug Administration – FDA. Hazards & Controls Guide For Dairy Foods HACCP. [acesso 2021 Set 06]. Disponível em:
<https://wayback.archive-it.org/7993/20170406024253/https://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/HACCP/UCM292647.pdf>
25. Khairi MTM, Ibrahim S, Yunus MM, Faramarzi M, Pusppanathan J, Abid A. Occurrence and assessment of physical contaminants based on food recalls in Canada. J Fac Food Eng. 2020; 14(3):219-227. Disponível em:
https://www.researchgate.net/publication/344399687_Occurrence_and_assessment_of_physical_contaminants_based_on_food_recalls_in_Canada
26. Gowen AA, O'Donnell CP, Cullen PJ, Downey G, Frías JM. Hyperspectral imaging – An emerging process analytical tool for food quality and safety control. Trends Food Sci Technol. 2007;18(12):590-8.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.06.001>
27. Li F, Liu Z, Sun T, Ma Y, Ding X. Confocal three-dimensional micro X-ray scatter imaging for non-destructive detecting foreign bodies with low density and low-Z materials in food products. Food Control. 2015;54:120-5.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.01.043>
28. Einarsdóttir H, Emerson MJ, Clemmensen LH, Scherer K, Willer K, Bech M et al. Novelty detection of foreign objects in food using multi-modal X-ray imaging. Food Control. 2016;67:39-47.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.02.023>
29. Losito P, Visciano P, Genuardo M, Cardone G. Food supplier qualification by an Italian Large-scale-Distributor: Auditing system and non-conformances. Food Control. 2011;22(12):2047-51.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.05.027>
30. Pallav P, Diamond GG, Hutchins DA, Green RJ, Gan TH. A near-infrared (NIR) technique for imaging food materials. J Food Sci. 2009;74(1):23-33.
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.01011.x>
31. Yoon SC, Lawrence KC, Smith DP, Park B, Windham WR. Bone fragment detection in chicken breast fillets using transmittance image enhancement. Trans ASABE. 2008;51(1):331-9.
<https://doi.org/10.13031/2013.24209>
32. Čapla J, Zajác P, Fikselová M, Bobková A, Belej L, Janeková V. Analysis of the incidence of foreign bodies in european foods. J Microbiol Biotechnol Food Sci. 2019;9(special):370-5.
<https://doi.org/10.15414/jmbfs.2019.9.special.370-375>

33. Europe Comission. RASFF – Food and Feed Safety Alerts. [acesso 2021 Set 19]. Disponível em:
https://ec.europa.eu/food/safety/rasff_en
34. Government of Canada. CFIA – Canadian Food Inspection Agency. Food recall warnings and allergy alerts. [acesso 2021 Set 25]. Disponível em:
<https://inspection.canada.ca/food-recall-warnings-and-allergy-alerts/eng/1351519587174/1351519588221?ay=2021&fr=17&fc=0&fd=0&ft=2>
35. U.S. Department of Agriculture – USDA. [acesso 2021 Ago 07]. Disponível em:
<https://www.fsis.usda.gov/food-safety/recalls-public-health-alerts/annual-recall-summaries/summary-recall-cases-calendar-0>
36. U.S. Food and Drug Administration – FDA. [acesso 2021 Set 05]. Disponível em:
<https://www.fda.gov/safety/recalls-market-withdrawals-safety-alerts>
37. Centre for Food Safety. Review of Food Incidents in 2019. [acesso 2021 Set 02]. Disponível em:
https://www.cfs.gov.hk/english/multimedia/multimedia_pub/multimedia_pub_fsf_163_01.html
38. Kong D, Shi L, Yang Z. Product recalls, corporate social responsibility, and firm value: evidence from the Chinese food industry. Food Policy. 2019;83:60-9.
<https://doi.org/10.1016/j.foodpol.2018.11.005>
39. Pozo VF, Schroeder TC. Evaluating the costs of meat and poultry recalls to food firms using stock returns. Food Policy. 2016;59:66-77.
<https://doi.org/10.1016/j.foodpol.2015.12.007>
40. Unsal O, Hassan MK, Zirek D. Product recalls and security prices: new evidence from the US market. J Bus Econ. 2017;93:62-79.
<https://doi.org/10.1016/j.jeconbus.2017.07.003>



Results of a sample-to-cutoff ratio using Abbott Architect rHTLV-I/II assay allow to predict detection of HTLV-1 and HTLV-2 proviral DNA by real-time PCR

Resultados da razão sinal da amostra sobre o *cutoff* da reação no ensaio Abbott Architect rHTLV-I/II permite prever a detecção de DNA proviral por PCR em tempo real

Lucas José do Nascimento Cruz¹ , Carolina de Alcântara Maneschy¹ , Katarine Antonia dos Santos Barile¹ ,
Maurício Koury Palmeira¹ , Carlos Eduardo de Melo Amaral¹ 

¹ Gerência de Biologia Celular e Molecular, Fundação Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará, Brazil.

*Corresponding author / Autor de correspondência: camaneschy@gmail.com

Received/Recebido: 24.03.2022 – Accepted/Aceito: 16.05.2022

ABSTRACT

The present study aims to correlate the sample-to-cutoff ratios (S/CO) distributions of reactive results for HTLV-1/2 antibodies with the detection of proviral DNA in a population of blood donor candidates. It was carried out a retrospective data search of 632 HTLV-1/2 reactive samples, submitted to confirmatory testing from January 2015 to December 2019. Serological screening was performed by chemiluminescent microparticle immunoassay Architect rHTLV-I/II, whereas confirmatory testing was performed by in-house real-time polymerase chain reaction method. 496 out of 632 samples (78%) had undetectable HTLV-1/2 proviral DNA and 136 (22%) had detectable proviral DNA. HTLV infection was not confirmed in any individual for whom the S/CO ratio value was <4 , and proviral DNA detection rates gradually escalated as S/CO ratio values increased. The sensitivity and predictive positive value found for the Architect rHTLV-I/II was 100% and 22%, respectively. The receiver operating characteristic (ROC) curve analysis showed that the optimal S/CO ratio value for predicting the presence of HTLV-1/2 was 18.11. High S/CO ratios were more associated with the detection of proviral DNA. The S/CO ratio value <4 suggests excluding true HTLV infection and the risk of blood transmission.

Keywords. HTLV-1 Infections, HTLV-2 Infections, Chemiluminescent Microparticle Immunoassay (CMIA), Real-Time Polymerase Chain Reaction, Blood Donors.

RESUMO

O estudo tem como objetivo correlacionar às distribuições das razões *sample-to-cutoff* (S/CO) de resultados reagentes para anticorpos HTLV-1/2 com a detecção de DNA proviral em uma população de candidatos à doação de sangue. Realizou-se uma busca retrospectiva de dados de 632 amostras reagentes para HTLV-1/2 submetidas à testagem confirmatória entre janeiro de 2015 a dezembro de 2019. A triagem sorológica foi realizada pelo imunoensaio quimioluminescente de micropartículas Architect rHTLV-I/II, enquanto o teste confirmatório foi realizado pelo método de PCR em tempo real *in-house*. 496 de 632 amostras (78%) apresentaram DNA proviral indetectável e 136 (22%) apresentaram DNA proviral detectável. A infecção por HTLV não foi confirmada em nenhum indivíduo com valor de S/CO <4 e as taxas de detecção de DNA proviral escalonaram gradualmente à medida que as razões S/CO aumentaram. A sensibilidade e valor preditivo positivo encontrados para o Architect rHTLV-I/II foram 100% e 22%, respectivamente. Utilizando análise de curva ROC, o valor de razão S/CO ideal para prever a presença de DNA proviral foi de 18,11. Razões S/CO elevadas foram mais associadas à detecção de DNA proviral. Em suma, o valor de S/CO <4 sugere a exclusão de infecção por HTLV e o risco de transmissão pelo sangue.

Palavras-chave. Infecções por HTLV-1, Infecções por HTLV-2, Imunoensaio Quimioluminescente de Micropartículas (CMIA), Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real, Doadores de Sangue.

INTRODUCTION

The human T-lymphotropic virus (HTLV) is a member of the family *Retroviridae*, genus *Deltaretrovirus*¹. It was the first human retrovirus to be discovered and associated with cancer, and it is currently classified into types 1, 2, 3 and 4, although both HTLV-3 and HTLV-4 have not been consistently linked to diseases^{2,3}. Conversely, HTLV-1 and 2 infection is considered pathogenic, with HTLV-1 primarily infecting CD4+ T lymphocytes, which can lead to fatal and/or inflammatory and neurodegenerative diseases such as adult T-cell leukemia (ATL) and HTLV-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP), respectively. HTLV-2 infects primarily CD8+ T lymphocytes and its pathogenicity is less certain since it is rarely associated with other diseases^{4,5}.

It is estimated that 5 to 10 million people worldwide are infected with HTLV-1. The Southwestern part of Japan, sub-Saharan Africa, South America, the Caribbean area, and a few foci in the Middle East and Australo-Melanesia are considered HTLV-1 endemic regions⁶. In Brazil, an endemic area, approximately 800,000 to 2.5 million HTLV-1 carriers are estimated. The prevalence varies according to geographic regions of the country, and highest rates are found in the Northern and Northeastern^{7,8}. However, HTLV infection is not included on the list of notifiable diseases in most Brazilian states, thus the available epidemiological data are usually from specific population groups such as blood donors, pregnant women, injecting drug users and sex workers^{9,10}. Regarding the epidemiology among blood donors in the State of Pará, some recent HTLV seroprevalence studies, previously conducted by our group, described prevalence rates of 0.2%⁸ and 0.3%¹¹, but only 22% of such reactive samples confirmed the presence of HTLV-1/2 proviral DNA¹¹.

HTLV transmission is lymphocyte mediated and occurs mostly by direct contact between infected cells and target cells, known as cell-to-cell transmission¹². The virus is spread through unprotected sexual intercourse, from mother to child (during birth and mainly by breastfeeding), and via parenteral route (including needle sharing among intravenous drug users and transfusion/transplantation of contaminated blood/organs)^{13,14}. To mitigate the risks of transfusion transmission, HTLV-1/2 mandatory screening of blood donors has been implemented in several countries since the late-1980s¹⁵.

In Brazil, HTLV-1 and HTLV-2 screening in hemotherapy services became mandatory in 1993¹⁶. Following the Brazilian technical regulations on hemotherapeutic procedures determined by the Ministry of Health¹⁷, the screening consists in serological testing for the detection of antibodies to HTLV-1 and HTLV-2. Currently, highly sensitive enzyme-linked immunosorbent (ELISA), chemiluminescence (CLIA) and electrochemiluminescence (ECLIA) assays are widely used as screening tests¹⁸.

Blood donor samples repeatedly reactive on anti-HTLV-I/II screening tests require further confirmatory testing to define a final donor status. Although serological immunoassays, Western blotting (WB) and line immunoassay (LIA) are the most commonly used tests for confirmation worldwide, the molecular assay polymerase chain reaction method (PCR) can also be performed. It offers higher sensitivity and more accurate discrimination between HTLV-1 and HTLV-2 infections. In addition, PCR tests have been increasingly used for confirmation given the cost reduction of molecular biology reagents and the introduction of real-time PCR methods (qPCR)¹⁹⁻²¹. It is important to note that in Brazil, confirmatory tests are not mandatory in blood banks, and blood bags are discarded without confirming HTLV-1/2 infections.

The need for confirmatory testing is partly due to the high biologic false reactive (BFR) rates of the commercial screening tests. False reactivity in blood donation screening tests is a well-known

concern as a number of reports have shown that most repeatedly reactive results are not confirmed by further testing. Furthermore, the signal sample-to-cutoff ratio (S/CO) of screening immunoassays appears to play an important role in distinguishing between BFR and confirmed-positive results²²⁻²⁴. The comparative analysis between HTLV-1 and 2 screening and confirmatory tests results should help to define the serological and molecular profile of these deferred blood donors and determine the S/CO ratios of HTLV truly infection. Therefore, the purpose of this study was to correlate the S/CO ratio values distributions of reactive results for HTLV-1 and HTLV-2 antibodies with the detection of proviral DNA in a population of blood donor candidates.

MATERIAL AND METHODS

The present study was reviewed and approved by the Integrated School Brazil Amazon (FIBRA) Research Ethics Committee, under protocol number CAAE 19-004-819.7.0000.8187 and was conducted at the Foundation Center for Hemotherapy and Hematology of Pará (HEMOPA), Northern Brazil. The HEMOPA Foundation encompasses 11 blood donation centers located throughout the Pará State, in the cities of Belém, Ananindeua, Castanhal, Santarém, Marabá, Abaetetuba, Altamira, Tucuruí, Redenção and Capanema.

This was a retrospective, cross-sectional, descriptive and quantitative study that included serological and molecular data on blood donations from January 2015 to December 2019. As inclusion criteria, subjects over the age of 18 who had samples that were reactive on serological screening and were sent to confirmatory detection by molecular biology were chosen. Subjects under the age of 18 and samples that did not provide results for one of the tests were used as exclusion criteria in the research.

During the study period, the HEMOPA Foundation performed HTLV serological screening using the chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) Architect rHTLV-I/II (Abbott Laboratories) for the qualitative detection and quantification of antibodies to HTLV-1 and HTLV-2. The resulting chemiluminescent reaction was detected by the Architect System optics as relative light units (RLUs), which have a direct relationship with the amount of anti-HTLV-1/2 antibodies in the sample. The results were calculated based on the ratio of the sample RLUs signal to the cutoff RLU signal (S/CO) for each specimen and control, and defined by the manufacturer as positive when $S/CO \geq 1.00$. According to the product insert, the sensitivity of the Architect rHTLV-I/II is 100% and the specificity among blood donors is 99.95%.

In the study period, Abbott Architect reactive samples were subsequently submitted to confirmatory tests performed by the in-house real-time PCR (qPCR) method, using the TaqMan[®] (Applied Biosystems) system, as previously described²⁵. This assay consists of searching for three targets: the albumin gene as an endogenous control and the non-homologous regions of the HTLV-1 and HTLV-2 *pol* genes it has a detection limit of 215 copies/mL²⁵.

The data was obtained from the HEMOPA Foundation systems databases (SBS Web and Progress) and included the results of serological screening (CMIA) and qPCR. Serological results were collated and stratified by the S/CO ratio values into four strata: 1-4, 4.01-20, 20.01-100 and >100; and were given a final status according to the qPCR results as HTLV detectable or HTLV undetectable. The sensitivities and positive predictive values (PPVs) of the initial Abbott Architect S/CO ratio results were calculated for each

S/CO range, and receiver operating characteristic curve (ROC Curve) analysis was conducted to define an optimized threshold based on diagnostic accuracy in the software Statistical Package for Social Sciences (SPSS), version 20.0 (SPSS Inc., Chicago, USA).

RESULTS

A total of 453,626 blood donation samples were screened serologically in the state of Pará between January 2015 and December 2019. Overall, 1,476 (0.3%) of these donations were found to be inapt due to the serological detection of HTLV, and 747 (51%) of these samples were submitted to a confirmatory test for HTLV-1 and 2 proviral DNA detection by qPCR. A total of 115 samples were omitted from the analyses due to the fact that they did not satisfy the selection criteria for the study. The data on 632 samples was thus analyzed, of which 496 (78%) had undetectable proviral DNA and 136 (22%) had detectable HTLV. HTLV-1 was detected in 106 out of 136 detectable samples (77.94%) and HTLV-2 was detected in 30 (22.06%).

HTLV infection was not confirmed in any individual for whom the initial S/CO ratio was <4 . When the S/CO ratio in the initial sample was in the range of 4.01–20, 4.26% of the subjects were confirmed to have HTLV infection. For S/CO ratios range 20.01–100, HTLV infection was confirmed in 85.07% of the subjects, whereas for S/CO ratios of >100 , HTLV infection was confirmed in 95.06%. In comparison to HTLV-1, HTLV-2 infection was not confirmed in any sample in the 4.01–20 range and was detected less frequently in all subsequent ranges. The range of S/CO ratios according to detection of proviral DNA are presented in [Table](#).

Table. S/CO ratios from the Abbott Architect rHTLV-I/II according to the final status of HTLV infection

Architect rHTLV-I/II S/CO range	N	Undetectable HTLV	Detectable HTLV	Detectable HTLV-1	Detectable HTLV-2
1–4	437	437 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
4.01–20	47	45 (95.74%)	2 (4.26%)	2 (100%)	0 (0%)
20.01–100	67	10 (14.93%)	57 (85.07%)	39 (68.42%)	18 (31.58%)
>100	81	4 (4.94%)	77 (95.06%)	65 (84.42%)	12 (15.58%)
Total	632	496 (78.48%)	136 (21.52%)	106 (77.94%)	30 (22.06%)

Overall, the sensitivity and PPV found in this study for the Architect rHTLV-I/II were 100% and 22%, respectively. For the range of 1–4 S/CO the sensitivity of the initial Architect rHTLV-I/II results was also 100%, whereas PPV was 0%. In the range of 4.01–20, the sensitivity and PPV were 100% and 4%, respectively. In the range of 20.01–100, the sensitivity was 51% and the PPV was 85%, and for the S/CO >100 range, the sensitivity was 85.7% and PPV was 95%.

The ROC curve analysis ([Figure](#)) was performed to determine the optimal S/CO ratio of Architect rHTLV-I/II for predicting HTLV-1 and HTLV-2 proviral DNA detection by qPCR. The maximum diagnostic sensitivity (100%) and specificity (97.2%) were observed at an S/CO ratio of 18.11.

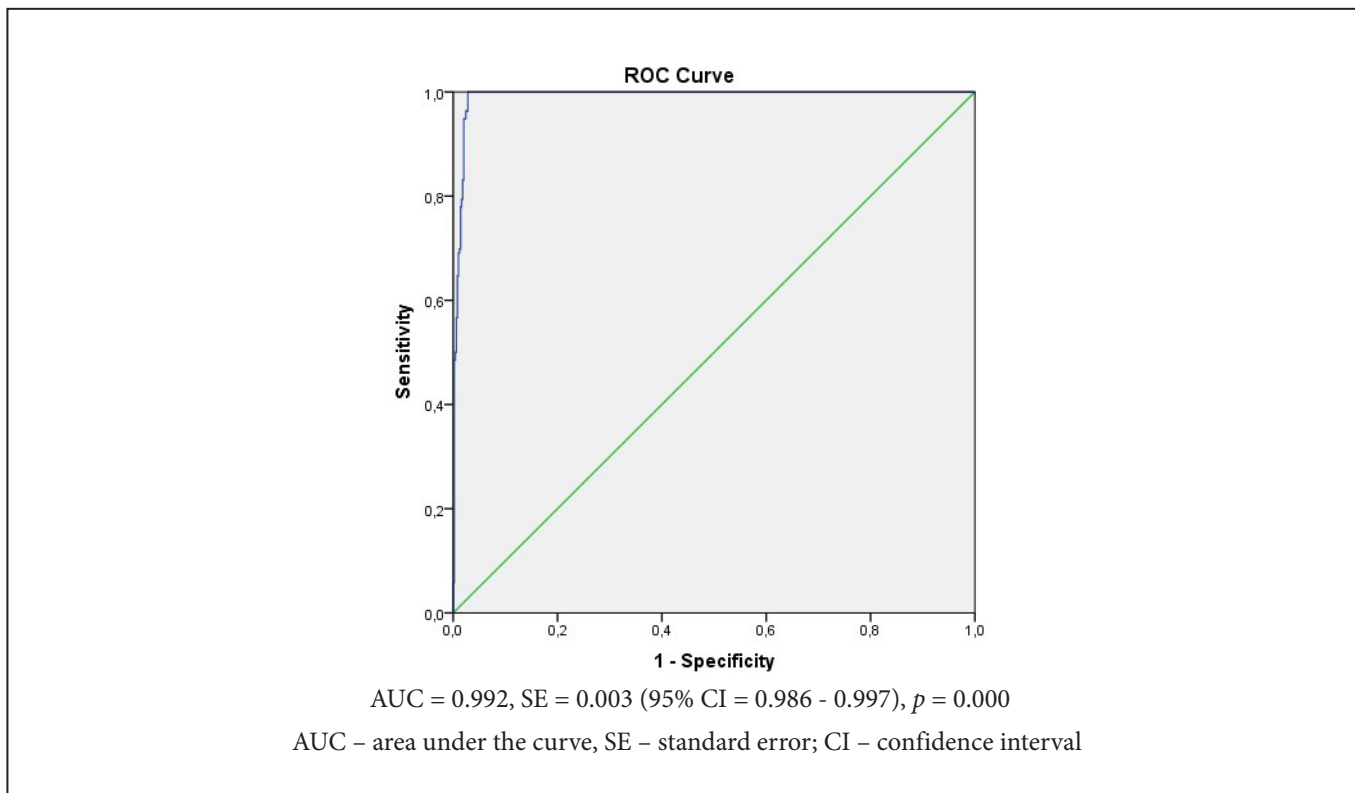


Figure. ROC curve for Architect rHTLV-I/II

DISCUSSION

In the present study, the S/CO ratios of reactive results for anti-HTLV-1/2 antibodies and the detection of proviral DNA in Brazilian blood donors were examined. It has been shown previously in blood donor populations that high reactivity in serological screening tests for transfusion transmissible infections (TTI) is predictive of confirmed-positive results, whereas low reactivity is frequently associated with BFR results^{26,27}.

The results of S/CO ratios according to detection of proviral DNA observed in this study demonstrated that although the highest frequency of reactive results occurred in the 1–4 S/CO range (437/632; 69.14%), none of the samples had confirmed HTLV infection. Moreover, a correlation between high S/CO ratios and confirmed-positive results was found, since proviral DNA detection rates gradually increased as S/CO ratios increased. This result is in agreement with the study by Tosswill and Taylor²⁴, in which no HTLV infection was confirmed when the S/CO ratio value was below 4, and higher S/CO ratios were more predictive of confirmed-positive results. Thus, blood bags that had S/CO <4 may have been discarded unnecessarily.

Importantly, HTLV-2 infection was detected in only 30 samples (22.06%), and was not confirmed in any individual when the S/CO ratio value was below 20. Also, in each S/CO range with detectable HTLV results, the proportion of HTLV-2 infection was inferior to HTLV-1. These findings reflect HTLV-2's lower prevalence compared to HTLV-1²⁸, as well as a lower mean PVL in HTLV-2 infected individuals, making it more difficult to detect using molecular methods^{29,30}.

With the exception of the 1–4 S/CO range, HTLV confirmed-positive results and BFR results overlapped in all S/CO ranges. Kiely et al²² also reported overlapping of S/CO ratios distributions of BFR and confirmed-positive results for HTLV in blood donors. Matsumoto et al³¹ reported a weakly positive relationship between HTLV-1 PVL and antibody levels in a cluster of blood donation samples with low antibody titers and high PVL. These findings reinforce the importance of HTLV confirmatory testing, especially because HTLV nucleic acid testing (NAT) is not currently used for blood donor screening and due to the fact that Brazil is considered an endemic area for HTLV, with higher prevalences in the North and Northeast^{6,11}.

It must be highlighted that it is not mandatory for blood services to conduct confirmatory tests for TTI¹⁷. In the HEMOPA Foundation, the confirmation and discrimination of HTLV-1 and HTLV-2 infections by qPCR have been performed since 2006 as part of its institutional testing algorithm. Even so, only reactive blood donors who returned for counseling and collection of a second sample were submitted for molecular confirmation (747/1,476; 51%).

The overall high sensitivity found for Architect rHTLV-I/II in the present study is in accordance with other studies conducted in blood banks worldwide. Architect rHTLV-I/II showed 100% sensitivity in Korea³², Saudi Arabia³³, Europe and Japan³⁴. Brito et al³⁵ evaluated the performance of commercially available screening tests in Brazil for HTLV diagnosis and reported that all screening tests showed 100% sensitivity. According to the World Health Organization³⁶, the minimum evaluated sensitivity and specificity levels of all assays used for blood screening should be as high as possible, and preferably not less than 99.5%. The maximized sensitivity (100%) and specificity (97.2%) at S/CO ratio 18.11 determined by ROC curve analysis means this threshold has greater capacity to discriminate individuals with detectable PVL of those with undetectable HTLV.

The high sensitivity of blood donation screening tests can lead to high proportions of BFR results, as demonstrated by the overall low PPV reported in this study for Architect rHTLV-I/II (22%). A study conducted in China found that PPVs for screening HTLV-1/2 antibodies assays used in blood centers varied from 0–26.30 with an average value of 10.17%³⁷. Our findings showed an optimized intersection of sensitivity and PPV in the highest S/CO range (S/CO>100), whereas low S/CO ratios displayed higher sensitivities but poor PPVs. BFR results have negative implications for blood services, not only in financial terms due to the costs regarding confirmatory testing and blood discard, but also have an impact on the blood supply and blood donors' quality of life^{38,39}. Nevertheless, avoiding false negative results is crucial in blood bank settings to enhance transfusion safety⁴⁰.

CONCLUSION

The results of this study demonstrated that high S/CO ratios were more associated with the detection of proviral DNA by qPCR. Low reactivity in the Architect rHTLV-I/II assay showed a poor relationship with further confirmation testing, especially in the lowest S/CO range in which no confirmed-positive results were reported, suggesting a low risk of HTLV infection in samples with an S/CO ratio of <4. However, the S/CO ratio distribution overlapped for detectable HTLV and undetectable HTLV results, reaffirming the importance of confirmatory tests. The optimal S/CO ratio for predicting the presence of proviral DNA was 18.11.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest.

FUNDING

This research did not receive any specific grant from funding agencies.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

All the authors contributed to the study conception and design. The preparation of material, data collection and analysis were all conducted by Lucas José Nascimento Cruz, Carolina de Alcântara Maneschy and Carlos Eduardo de Melo Amaral. The first draft of the manuscript was written by Lucas José Nascimento Cruz and Carolina de Alcântara Maneschy. All the other authors critically reviewed the article and commented on previous versions of the manuscript. All the authors have read and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors did not declare.

REFERENCES

1. International Committee on Taxonomy of Viruses – ICTV. Taxonomy history: primate T-lymphotropic virus 1; 2019. [Accessed on 2022 Mar 23]. Available from:
https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=201904999
2. Lima VFS, Torres RM, Guerra FM, Carvalho TL, Magalhães PMR. Human T-cell lymphotropic viruses (HTLV-1 and HTLV-2): literature review. *Braz J Health Rev.* 2021;4(5):20900-23.
<https://doi.org/10.34119/bjhrv4n5-193>
3. Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1980;77(12):7415-9.
<https://doi.org/10.1073/pnas.77.12.7415>
4. Forlani G, Shallak M, Accolla RS, Romanelli MG. HTLV-1 infection and pathogenesis: new insights from cellular and animal models. *Int J Mol Sci.* 2021;22(15):8001.
<https://doi.org/10.3390/ijms22158001>
5. Martinez MP, Al-Saleem J, Green PL. Comparative virology of HTLV-1 and HTLV-2. *Retrovirology.* 2019;16(1):21.
<https://doi.org/10.1186/s12977-019-0483-0>

6. Gessain A, Cassar O. Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection. *Front Microbiol*. 2012;3:388.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00388>
7. Catalan-Soares B, Carneiro-Proietti ABF, Proietti FA; Interdisciplinary HTLV Research Group. Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. *Cad Saúde Pública*. 2005;21(3):926-31.
<https://doi.org/10.1590/S0102-311X2005000300027>
8. Maneschy CA, Barile KAS, Castro JAA, Palmeira MK, Castro RBH, Amaral CEM. Seroprevalence of the Human T Lymphotropic Virus (HTLV 1 and HTLV 2) in blood donor candidates in the state of Pará, Northern Brazil. *Res Soc Dev*. 2022;11(4):e1111427082.
<https://doi.org/10.33448/rsd-v11i4.27082>
9. Mendes MFC, Lima JRO, Melo BO, Pinto CMFS, Maia HS, Ferro TAF et al. Molecular detection of human T cell lymphotropic virus type 1 in pregnant women from Maranhão state, Brazil. *Braz J Microbiol*. 2020;51(2):637-45.
<https://doi.org/10.1007/s42770-020-00233-0>
10. Coordenação Geral de Vigilância das Infecções Sexualmente Transmissíveis: Grupo técnico de especialistas em HTLV. Prevalência da infecção por HTLV-1/2 no Brasil. *Boletim Epidemiológico SVS/MS*. 2020;51(48):25-33.
11. Maneschy CA, Barile KAS, Castro JAA, Palmeira MK, Castro RBH, Amaral CEM. Epidemiological and molecular profile of blood donors infected with HTLV-1/2 in the state of Pará, northern Brazil. *Braz J Microbiol*. 2021;52(4):2001-6.
<https://doi.org/10.1007/s42770-021-00609-w>
12. Gross C, Thoma-Kress AK. Molecular mechanisms of HTLV-1 cell-to-cell transmission. *Viruses*. 2016;8(3):74.
<https://doi.org/10.3390/v8030074>
13. Eusebio-Ponce E, Anguita E, Paulino-Ramirez R, Candel FJ. HTLV-1 infection: an emerging risk. Pathogenesis, epidemiology, diagnosis and associated diseases. *Rev Esp Quimioter*. 2019;32(6):485-96.
14. Rosadas C, Brites C, Arakaki-Sanchez D, Casseb J, Ishak R. Brazilian Protocol for Sexually Transmitted Infections 2020: human T-cell lymphotropic virus (HTLV) infection. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2021;54(Suppl 1):e2020605.
<https://doi.org/10.1590/0037-8682-605-2020>

15. Busch MP, Bloch EM, Kleinman S. Prevention of transfusion-transmitted infections. *Blood.* 2019;133(17):1854-64.
<https://doi.org/10.1182/blood-2018-11-833996>
16. Caterino-de-Araujo A, Gonçalves MG. Diagnóstico molecular de vírus T-linfotrópico humano (HTLV): histórico e estado da arte. *BEPA, Bol Epidemiol Pauli.* 2021;18(212):14-62.
17. Ministério da Saúde (BR). Portaria de consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017. Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. Anexo IV. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 2017. Available from:
<https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/sctie/farmacia-popular%20old/legislacao/prc-5-portaria-de-consolida-o-n-5-de-28-de-setembro-de-2017.pdf/@download/file/PRC-5-Portaria-de-Consolida---o-n---5--de-28-de-setembro-de-2017.pdf>
18. Ji H, Chang L, Yan Y, Jiang X, Sun H, Guo F et al. A Strategy for screening and confirmation of HTLV-1/2 infections in Low-Endemic Areas. *Front Microbiol.* 2020;11:1151.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01151>
19. Andrade RG, Ribeiro MA, Namen-Lopes MSS, Silva SMN, Basques FV, Ribas JG et al. Evaluation of the use of real-time PCR for human T cell lymphotropic virus 1 and 2 as a confirmatory test in screening for blood donors. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010;43(2):111-15.
<https://doi.org/10.1590/s0037-86822010000200001>
20. Campos KR, Santos FLN, Brito VS, Gonçalves NLS, Araujo THA, Galvão-Castro B et al. Line immunoassay for confirmation and discrimination of human T-cell lymphotropic virus infections in inconclusive western blot serum samples from Brazil. *J Clin Microbiol.* 2019;58(1):e01384-19.
<https://doi.org/10.1128/JCM.01384-19>
21. Marqué L, Liehl P, De Boer J, Pottel H, Murphy EL, Bruhn R et al. A novel high performing multiplex immunoassay multi-HTLV for serological confirmation and typing of HTLV infections. *PLoS Negl Trop Dis.* 2021;15(11):e0009925.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009925>
22. Kiely P, Walker K, Parker S, Cheng A. Analysis of sample-to-cutoff ratios on chemiluminescent immunoassays used for blood donor screening highlights the need for serologic confirmatory testing. *Transfusion.* 2010;50(6):1344-51.
<https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2009.02572.x>

23. Stramer SL, Notari EP, Zou S, Krysztof DE, Brodsky JP, Tegtmeier GE et al. Human T-lymphotropic virus antibody screening of blood donors: rates of false-positive results and evaluation of a potential donor reentry algorithm. *Transfusion*. 2011;51(4):692-701.
<https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2010.02903.x>
24. Tosswill JHC, Taylor GP. Interpretation of low reactivity in the Abbott Architect rHTLV I/II assay. *Transfus Med*. 2018;28(4):326-30.
<https://doi.org/10.1111/tme.12482>
25. Tamegão-Lopes BP, Rezende PR, Maradei-Pereira LMC, Lemos JAR. HTLV-1 and HTLV-2 proviral load: a simple method using quantitative real-time PCR. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006; 39(6):548-52.
<https://doi.org/10.1590/S0037-86822006000600007>
26. Pham D, Nguyen D, Nguyen TA, Tran C, Tran L, Devare S et al. Seroprevalence of HTLV-1/2 among voluntary blood donors in Vietnam. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2019;35(4):376-81.
<https://doi.org/10.1089/aid.2018.0240>
27. Zhao J, Zhao F, Han W, Xu X, Wang L, Li R et al. HTLV screening of blood donors using chemiluminescence immunoassay in three major provincial blood centers of China. *BMC Infect Dis*. 2020;20(1):581.
<https://doi.org/10.1186/s12879-020-05282-2>
28. Murphy EL, Cassar O, Gessain A. Estimating the number of HTLV-2 infected persons in the world. *Retrovirology*. 2015;12(Suppl 1):O5.
<https://doi.org/10.1186/1742-4690-12-S1-O5>
29. Murphy EL, Lee TH, Chafets D, Nass CC., Wang B, Loughlin K et al. Higher human T lymphotropic virus (HTLV) provirus load is associated with HTLV-I versus HTLV-II, with HTLV-II subtype A versus B, and with male sex and a history of blood transfusion. *J Infect Dis*. 2004;190(3):504-10.
<https://doi.org/10.1086/422398>
30. Waters A, Oliveira AL, Coughlan S, de Venecia C, Schor D, Leite AC et al. Multiplex real-time PCR for the detection and quantitation of HTLV-1 and HTLV-2 proviral load: addressing the issue of indeterminate HTLV results. *J Clin Virol*. 2011;52(1):38-44.
<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2011.05.022>
31. Matsumoto C, Sagara Y, Sobata R, Inoue Y, Morita M, Uchida S et al. Analysis of HTLV-1 proviral load (PVL) and antibody detected with various kinds of tests in Japanese blood donors to understand the relationship between PVL and antibody level and to gain insights toward better antibody testing. *J Med Virol*. 2017;89(8):1469-76.
<https://doi.org/10.1002/jmv.24802>

32. Yun SG, Kim, SW, Sohn JY, Cho Y. Evaluation of Elecsys HTLV-I/II assay in comparison with ARCHITECT rHTLV-I/II assay with Korean samples. *J Clin Lab Anal.* 2019;33(6):e22909.
<https://doi.org/10.1002/jcla.22909>
33. Al-Hababi FH, Al-Deailej IM, Al-Sulatan HA, Al-Ghamdi YA, Al-Dossari KM. Human T lymphotropic virus antibodies seroprevalence among healthy blood donors and high risk groups at Riyadh regional laboratory in Riyadh, Saudi Arabia. *Saudi Crit Care J.* 2020;4(2):73-8.
https://doi.org/10.4103/sccj.sccj_13_20
34. Laperche S, Sauleda S, Piron M, Mühlbacher A, Schennach H, Schottstedt V et al. Evaluation of sensitivity and specificity performance of elecsys HTLV-I/II assay in a multicenter study in Europe and Japan. *J Clin Microbiol.* 2017;55(7):2180-7.
<https://doi.org/10.1128/JCM.00169-17>
35. Brito VS, Santos FLN, Gonçalves NLS, Araujo THA, Nascimento DSV, Pereira FM et al. Performance of commercially available serological screening tests for human T-cell lymphotropic virus infection in Brazil. *J Clin Microbiol.* 2018;56(12):e00961-18.
<https://doi.org/10.1128/JCM.00961-18>
36. World Health Organization – WHO. Screening donated blood for transfusion-transmissible infections: recommendations. Geneva: World Health Organization; 2010.
37. Chang L, Ou S, Shan Z, Zhu F, Ji H, Rong X et al. Seroprevalence of human T-lymphotropic virus infection among blood donors in China: a first nationwide survey. *Retrovirology.* 2021;18(1):2.
<https://doi.org/10.1186/s12977-020-00546-w>
38. Kiely P, Hoad VC, Wood EM. False positive viral marker results in blood donors and their unintended consequences. *Vox Sang.* 2018;113(6):530-9.
<https://doi.org/10.1111/vox.12675>
39. Vo MT, Bruhn R, Kaidarova Z, Custer BS, Murphy EL, Bloch EM. A retrospective analysis of false-positive infectious screening results in blood donors. *Transfusion.* 2016;56(2):457-65.
<https://doi.org/10.1111/trf.13381>
40. Trevethan R. Sensitivity, Specificity, and Predictive Values: Foundations, Pliabilities, and Pitfalls in Research and Practice. *Front Public Health.* 2017;5:307.
<https://doi.org/10.3389/fpubh.2017.00307>



Detection of antigens in paraffin sections of worms and snails infected by *Angiostrongylus cantonensis* by immunofluorescence reaction

Detecção de antígenos em cortes parafinados de vermes e caramujos infectados por *Angiostrongylus cantonensis* pela reação de imunofluorescência

Felipe Correa Rezende de Souza¹ , Leyva Cecília Vieira de Melo¹ , Cristina Kanamura² , Dan Jessé Gonçalves da Mota³ ,
Sílvia Gabriel Chiodelli¹ , Pedro Luiz Silva Pinto^{1*} 

¹ Núcleo de Enteroparasitas, Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz.

² Núcleo de Anatomia Patológica, Centro de Patologia, Instituto Adolfo Lutz.

³ Secretaria Municipal da Saúde de São Paulo – (UVIS Parelheiros), Departamento de Vigilância Sanitária, Prefeitura do Município de São Paulo.

*Autor de correspondência/Corresponding author: pedro.lui44@terra.com.br

Received/Recebido: 19.07.2021 - Accepted/Aceito: 27.06.2022

ABSTRACT

The Indirect Immunofluorescence Assay (IFA) was used to identify stage-specific antigenic structures in paraffin sections of female larvae and worms and snails tissues, infected with third stage larvae of *Angiostrongylus cantonensis*. Sera from eosinophilic meningitis cases were used to assess reactivity. Non-reactive sera from patients with other parasitic diseases and from individuals without other etiologies were used as controls for cross-reactivity. Larvae and worms showed high reactivity to IgG antibodies. IgM antibodies reacted with low intensity only to larvae. Fluorescent reactions were observed in the cuticles and internal structures on worms sections, with a marked reaction in the uterus content. In the snail tissues, the larvae were found exclusively inside the granulomas, with fluorescent markings in the cuticles of the larvae and inside the granulomatous tissues. This fluorescent pattern suggests the presence of excretory/secretory antigens distributed throughout the granulomas. Expressive cross-reactivity occurred in sera from patients with other parasitic diseases, especially strongyloidiasis. The use of IFA applied to paraffin sections to identify structures with antigenic potential and the study of new serological markers, can contribute to the improvement of the laboratory diagnosis of eosinophilic meningitis.

Keywords. *Angiostrongylus cantonensis*, Angiostrongyliasis, Antigens, Helminth, Histological Techniques, Immunofluorescence, Indirect.

RESUMO

A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) foi utilizada para localizar antígenos em estruturas estágio-específicas em cortes parafinados de vermes fêmeas e em tecidos de caramujos do Gênero *Biomphalaria* infectados com larvas de terceiro estágio de *Angiostrongylus cantonensis*. Soros de casos confirmados de meningite eosinofílica foram usados para avaliação da reatividade. Soros não reagentes de casos suspeitos de pacientes com outras parasitoses e de indivíduos sem outras etiologias foram utilizados como controle de reatividade cruzada. Anticorpos da classe IgG foram reativos para antígenos presentes nos dois estágios e anticorpos IgM, somente para o estágio larvário. Nos cortes de vermes, as marcações fluorescentes foram assinaladas nas cutículas e estruturas internas, com acentuada marcação para os conteúdos uterinos. Nos tecidos dos caramujos, as larvas foram encontradas exclusivamente no interior dos granulomas, com marcações fluorescentes nas cutículas das larvas e no interior dos tecidos granulomatosos. O padrão de fluorescência no granuloma sugere a marcação de antígenos excretores/secretores. Reatividade cruzada mais expressiva ocorreu com anticorpos presentes em soros de pacientes com outras parasitoses, com destaque para estrogiloidíase. A RIFI em cortes parafinados abre novas perspectivas para identificação de antígenos e de marcadores sorológicos, que possam ser aplicados no aprimoramento do diagnóstico laboratorial da meningite eosinofílica.

Palavras-chaves. *Angiostrongylus cantonensis*, Angiostrongilíase, Antígenos de Helminthos, Técnicas Histológicas, Imunofluorescência Indireta.

INTRODUCTION

Angiostrongylus cantonensis (Chen, 1935) is a metastrongylids nematode, a natural parasite of the pulmonary arterial system of rodents. The larval development phase occurs in tissues of different species of terrestrial molluscs (snails and slugs) and freshwater snails¹. Human infection is considered occasional and occurs through the intentional or habitual ingestion of intermediate hosts parasitized with infective third-stage larvae, when consumed *in natura* or undercooked^{1,2}. By the same mechanism, reptiles, amphibians, crustaceans, among others, considered paratenic hosts, when parasitized with the same larval stage, can also serve as sources of dissemination^{1,2}. Vegetables contaminated by the mucus of infected molluscs, constitute a lower risk of transmission mechanism³.

In humans, ingested larvae penetrate through the intestinal wall and are disseminated through the blood or lymphatic circulation to other organs. The infective larvae have an obligatory tropism for the central nervous system (neurotropism), inducing an intense inflammatory reaction, which is the cause of eosinophilic meningitis⁴. The larvae remain in the organ, where they evolve to the stage of young worms and die before reaching the adult stage^{1,4}. The mechanisms involved in the formation of the eosinophilic infiltrate in the nervous system are not fully known⁵. However, during experimental infection in rodents, the expression of interleukins 5 (IL-5) and 13 (IL-13) was associated with intense mobilization of eosinophils to the nervous tissue, suggesting that this is one of the effector mechanisms for the death of the parasites⁵.

Clinical manifestations are related to meningitis and are characterized by severe headache, fever, vomiting, diarrhea, paresthesia and nausea. Usually the infection follows as mild or moderate, but many severe and fatal cases have been reported^{2,6}. In addition, the parasite can lodge in the ocular globe and cause ocular angiostrongyliasis, usually described in children, and may or may not be associated with meningitis^{2,6}.

Eosinophilic meningitis caused by *A. cantonensis*, also known as neuroangiostrongyliasis or meningoencephalic angiostrongyliasis, is endemic in Asian, Pacific Island and Caribbean countries^{1,2,6} and, recently, it has taken on an emerging character in some countries of the American Continent⁷. In Brazil, the first cases were reported in 2007 in the municipality of Cariacica, ES, followed by reports of isolated cases and small family outbreaks in other municipalities, in different states of the federation⁷⁻⁹. Despite this, the parasitosis is still unknown by most health professionals, which may explain the low frequency of cases in the country⁷. On the other hand, reports of the parasite presence in definitive and intermediate hosts are increasing, demonstrating that it is an emerging zoonosis with a potential risk of expansion in Brazil^{10,11}.

In laboratory diagnosis, the observation of larvae or part of them, or even the detection of DNA fragments of the parasite in the cerebrospinal fluid (CSF) proves the infection, which is not always possible, as it depends on the stage of the disease and on the parasite load acquired by the patient^{4,12}. The investigation of antibodies in CSF and serum samples has been widely used for diagnosis, however the humoral response and the nature of the applied antigens have limited the infection confirmation in some cases^{4,12}.

A. cantonensis presents a biological complexity evidenced by the diversity of adaptative forms found in its evolutionary cycle, with great adaptability to different hosts¹. These biological characteristics influence the parasite-host relationship since, in physiological and pathological processes; numerous potentially antigenic molecules are expressed by the parasite, which determines a complex immune response from the host¹³⁻¹⁵.

Thus, the improvement of the immunodiagnosis of the infection involves the search for purified antigens that are able to provide higher sensitivity, specificity and predictive values for the analysis¹⁶. Low molecular weight antigens are considered as immunological markers of greater efficiency in relation to total extracts of adult worms^{13,16}, although cross reactions have already been identified in fractions which are considered more specific, such as 31 kDa¹⁷. The use of synthetic peptides and monoclonal antibodies are promising, however they have restricted practical applications considering their low availability².

Thus, the present study aims to locate structures with higher reactivity for human sera in paraffin sections of snail tissues, experimentally infected; and adult worms of *A. cantonensis*, using the indirect immunofluorescence assay (IFA). It is intended to relate the located structures with antigens of greater diagnostic potential for *A. cantonensis* infection, contributing to the improvement of the laboratory diagnosis of the disease.

MATERIAL AND METHODS

Legal ethical aspects

This study was part of a project registered in the Conselho Técnico Científico (CTC) of the Adolfo Lutz Institute (IAL) (n. CTC68I/2016); and received approval from the Comitê de Ética (CEP) of the IAL (CEPIAL n. 2.271.089). All procedures involving experimental animals were performed according to the guidelines of the Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA), and received approval from the Comitê de Ética Animal of IAL (CEUA/IAL/Pasteur n. 042012). The rodents supply, in order to maintain the evolutionary cycle of *A. cantonensis*, was approved by the CEUA of the Institute of Tropical Medicine of São Paulo (IMT/SP n. 077/11).

A. cantonensis isolate

A. cantonensis was isolated from *Rattus norvegicus* from the southern region of São Paulo, SP, Brazil, and has been maintained under experimental conditions in albino rats of the strain (Wistar) and in *Biomphalaria glabrata*, since 2010 at the Núcleo de Enteroparasitas (NE) of the IAL. The isolate was identified by morphological, biological and molecular criteria by the NE/ IAL and by the Laboratório de Biologia Molecular de Parasitos e Fungos, of Centro de Parasitologia e Micologia of IAL. The strain was registered in the collection as *Village*¹⁰.

Maintenance of *A. cantonensis* in the laboratory

The adult worms of *A. cantonensis* and the infected specimens of *B. glabrata* were obtained from the experimental cycle maintained by the NE/ IAL, where groups of 15 snails of the species *B. glabrata* (strain BH) from the molluscary are routinely used. Three Wistar rats were obtained from the Institute of Biomedical Sciences (ICB/USP), with the collaboration of the Medical Investigation Laboratory (LIM 06/IMT/FMUSP).

Biomphalaria glabrata infection

The first stage larvae (L1) were extracted from the feces of rodents, with patent *A. cantonensis* infection (over 45 days), using the technique of Rugai et al¹⁸ technique. Each snail was individualized and exposed to 700 larvae (L1) and the inoculum was deposited directly through the shell opening. After 18 hours of contact, the specimens were collected and transferred to an aquarium until they completed 45 days of infection.

Infection of Wistar rats

For rodent infection, 45 days after infection, molluscs were crushed from their shells, pooled and cut into small pieces. The tissue mass was incubated at 37 °C for two hours with 100 mL of a solution containing: 4% pepsin (Pepsin 1:10000 porcine Purex, INLAB[®]) and 0.7% hydrochloric acid (HCl PA, Merck[®]). Third stage larvae (L3) were extracted from the digested fragments using the Rugai et al¹⁸ technique. Thirty L3 larvae were administered through gastric tube to each animal. Infected animals were kept under proper maintenance conditions for at least 45 days, when their feces were collected and used for new infections in molluscs, as previously mentioned.

Obtaining adult worms

Wistar rats, after 45 days of infection, were anesthetized with 87 mg/kg of ketamine hydrochloride solution, (Dopalen, Ceva[®]) and 13 mg/kg of xylazine hydrochloride (Xilazin, Syntec[®]), intraperitoneally and euthanized in a CO₂ chamber. Blood was removed from the circulatory system by portal-mesenteric perfusion using 40 mL of 0.85% saline solution with 2.5% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, Merck[®]) in continuous flow and under pressure. The heart and lungs were separated and dissected to allow the removal of worms from inside the arterial heart chambers and intrapulmonary arterial vessels. The specimens were washed in 0.85% saline solution, grouped according to sex and kept according to their use.

Paraffin sections for Indirect Immunofluorescence Assay (IFA)

Preparation of infected Biomphalaria glabrata

Five specimens of *B. glabrata*, with approximately 10 mm in shell diameter, from the experimental cycle and with five months of infection were used for the blocks. After breaking the shells and removing the body masses, each snail was macroscopically divided into three parts, in order to facilitate the paraffin embedding process and the better positioning of the structures in the paraffin sections.

Thus, the regions of the cephalopodium (section close to the collar of the mantle), viscera (between the collar of the mantle to the posterior third of the digestive gland), and hermaphrodite glands (final third of the digestive gland to the ovotestis) were separated.

The preparation process consisted of tissue fixation in Rossman's solution, dehydration in an alcoholic series and treatment with Methyl benzoate, following the protocol established by Deelder and Kornelis¹⁹, for paraffin sections of adult *Schistosoma mansoni* worms. At the time of embedding, the portions of *B. glabrata* were carefully positioned inside the block and received a portion of melted paraffin, according to the direction of the intended cut (transverse or longitudinal). Serial 3 µm sections were performed in a microtome (HM-315, Micron[®]) and five to ten sections were put on each slide.

To identify the histological structures and distribution of L3 in the tissues of infected snails, sections from each region were separated and stained with Hematoxylin-Eosin (HE), according to Michalany²⁰. Histological descriptions were based on the observations from Pan²¹.

Preparation of adult females of A. cantonensis

On average, six female specimens of *A. cantonensis* were used for each paraffin block. The preparation process followed the same steps used for the *Biomphalaria* specimens, according to Deelder and Kornelis¹⁹. The worms were positioned to obtain serial 5 µm cross-sections and eight sections were put on each slide.

Human serum samples

A panel of 46 sera, which were part of the official serum library of the NE/IAL was used for the study. These samples were obtained from the laboratory routine. Following issuance of laboratory report, they were classified, organized, fractionated and stored at -20 °C. All procedures were in accordance with the institutional guidelines for this type of repository. The panel was composed of:

- *Group I*: 14 reagent samples for the immunodiagnosis of eosinophilic meningitis caused by *A. cantonensis*. Cases defined by clinical and laboratory criteria;
- *Group II*: 16 non-reagent samples for the immunodiagnosis of eosinophilic meningitis caused by *A. cantonensis*. Suspected cases not confirmed by laboratory analysis;
- *Group III*: 11 samples from patients with other parasites; five samples from patients with schistosomiasis and six with strongyloidiasis;
- *Group IV*: five samples from individuals classified as free from other parasites; with non-reactive results for angiostrongyliasis, schistosomiasis, toxocariasis and cysticercosis serological tests. Parasitological stool examination was negative for helminth eggs and protozoan cysts.

Indirect Immunofluorescence Assay (IFA)

The reaction was performed according to the technique described by Kanamura et al²² for paraffin-embedded sections of adult *Schistosoma mansoni* worms. Sera samples were diluted 1:10 and 50 µL of each dilution was added onto the slides containing the tissue sections from *B. glabrata* or female *A. cantonensis* worms. The slides were incubated for 50 minutes at 37 °C and washed with 0.01M phosphate buffered saline (PBS) pH 7.2 three times. Then, 25 µL of the diluted (1:150) fluorescein isothiocyanate-labeled anti-IgG or anti-IgM human conjugates (Biolab®) was added, following incubation for 50 minutes at 37 °C. After three PBS washes, the slides were mounted with buffered glycerin pH 9.5 and examined under a fluorescence microscope. The different fluorescent patterns were recorded using an A640 digital camera (Canon®).

RESULTS

In the tissue samples of *B. glabrata* stained by HE, the parasitism was characterized by the view of nodular reactions (granulomas) containing the larval stages, with greater recurrence in the connective tissue, and distributed in different regions within the mantle and digestive glands. Granulomas were also observed in tissues adjacent to the stomach, intestine and kidney wall. In the cephalopodium, larvae were found in transversal and longitudinal sections, dispersed by the loose connective tissue. In the saccular portion of the kidney, there was presence of a larval fragment in the non-modulated fibrous

connective tissue, supported by a thin layer of muscle fibers. In addition, larvae were also identified near the epithelium of the visceral mass. The only larva found in the ovotestis was surrounded by a granuloma inside the acini. **Figure 1** shows the main histological features observed in the infection of *B. glabrata* by *A. cantonensis* in different tissues.

Despite the inoculum being considered high, of about 700 larvae per snail, and the encapsulated larvae being observed in several locations, as demonstrated in the HE-stained sections, the number of larval structures found per slice and per slide was reduced. This occurrence limited the use of all sera samples from the selected panel for the antigenic targeting study in *Biomphalaria* tissues by IFA. In this case, the technique was performed only with sera from Group I (samples from confirmed cases of the disease).

For the IgG marker, two fluorescent patterns were observed: the first, focal in relation to the larvae fragments inside the granulomas, with delimitation of the larvae cuticle; the second, with more intense

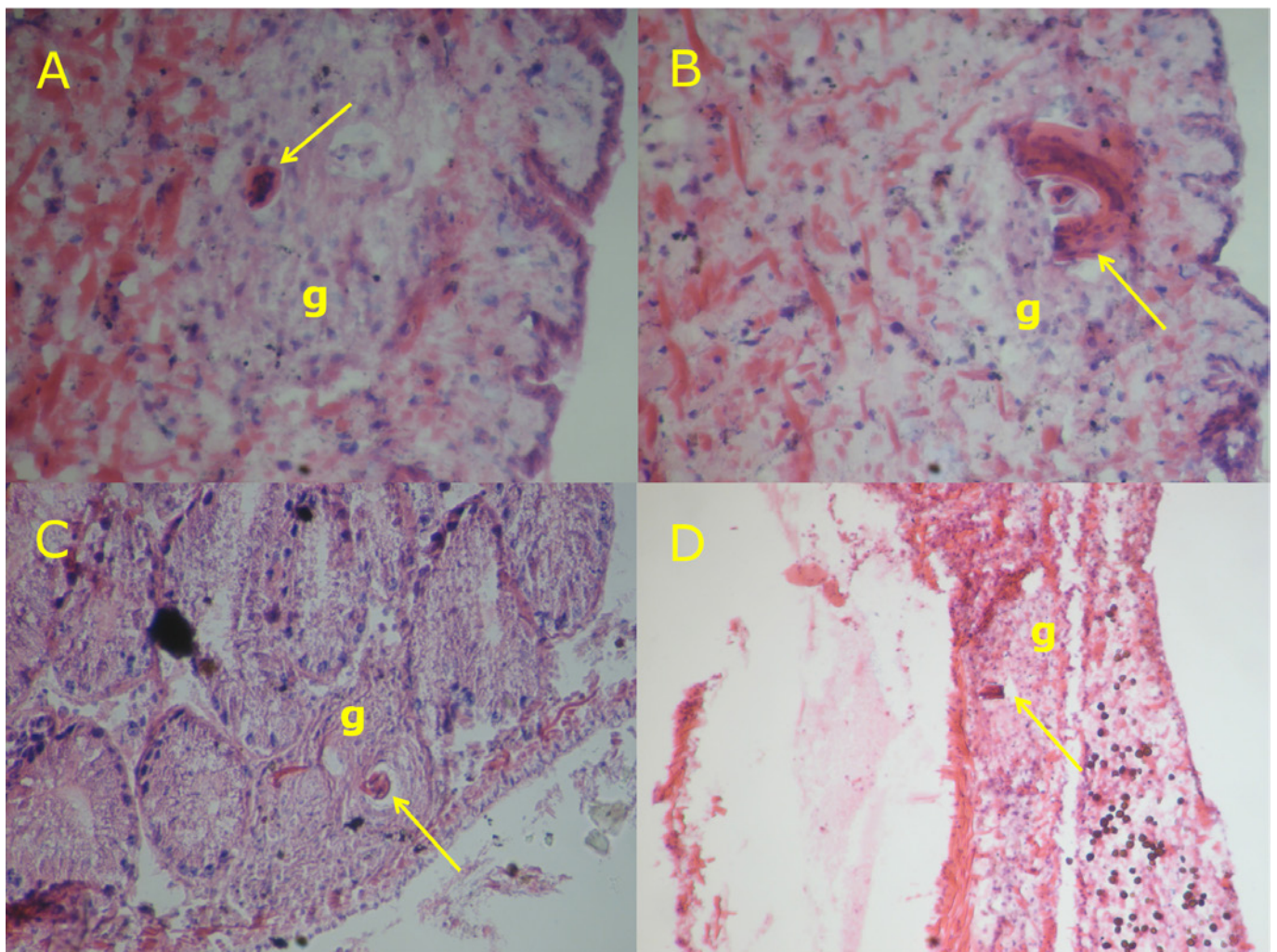


Figure 1. Details of granulomas (g) containing infective larvae of *A. cantonensis*. In (A) and (B) cephalopodium. (A) Arrow indicates encapsulated larva in cross section. 400X magnification. (B) Arrow indicates large larval fragment in longitudinal section. Also note a smaller fragment in cross section. 250X magnification. In (C) digestive glands. Arrow shows larva in cross section with retraction space between it and the granulomatous reaction. In (D) sacculus portion of the kidney. Arrow shows larvae in cross section and the space inside the capsule. 125X magnification

and diffuse fluorescence, observed in the space between the larvae and the granulomas. This pattern was also observed distributed among cells of some granulomas. However, other structures with no apparent relationship with parasitism, such as the epithelium of the edge of the mantle and the interior of the intestine, also showed fluorescence with this marker. For IgM antibodies, low-intensity fluorescent reactions were observed in the granuloma and in the larvae cuticles. The fluorescence patterns found for IgG antibodies related to larval stages, granulomas and other tissues are represented in **Figure 2**.

In the paraffin sections of *A. cantonensis* female worms, IFA was performed in all samples from the selected panel. Reactivity for IgM antibodies was null. However, IgG antibodies showed, in the internal structures of the worms, focal or diffuse fluorescent patterns of different intensities, which varied according to the group of samples. Homogeneous focal fluorescence was observed in the cuticle, inner lining of the pseudocoelom, and outer walls of the intestine, ovaries, and uterus. The diffuse fluorescence pattern was

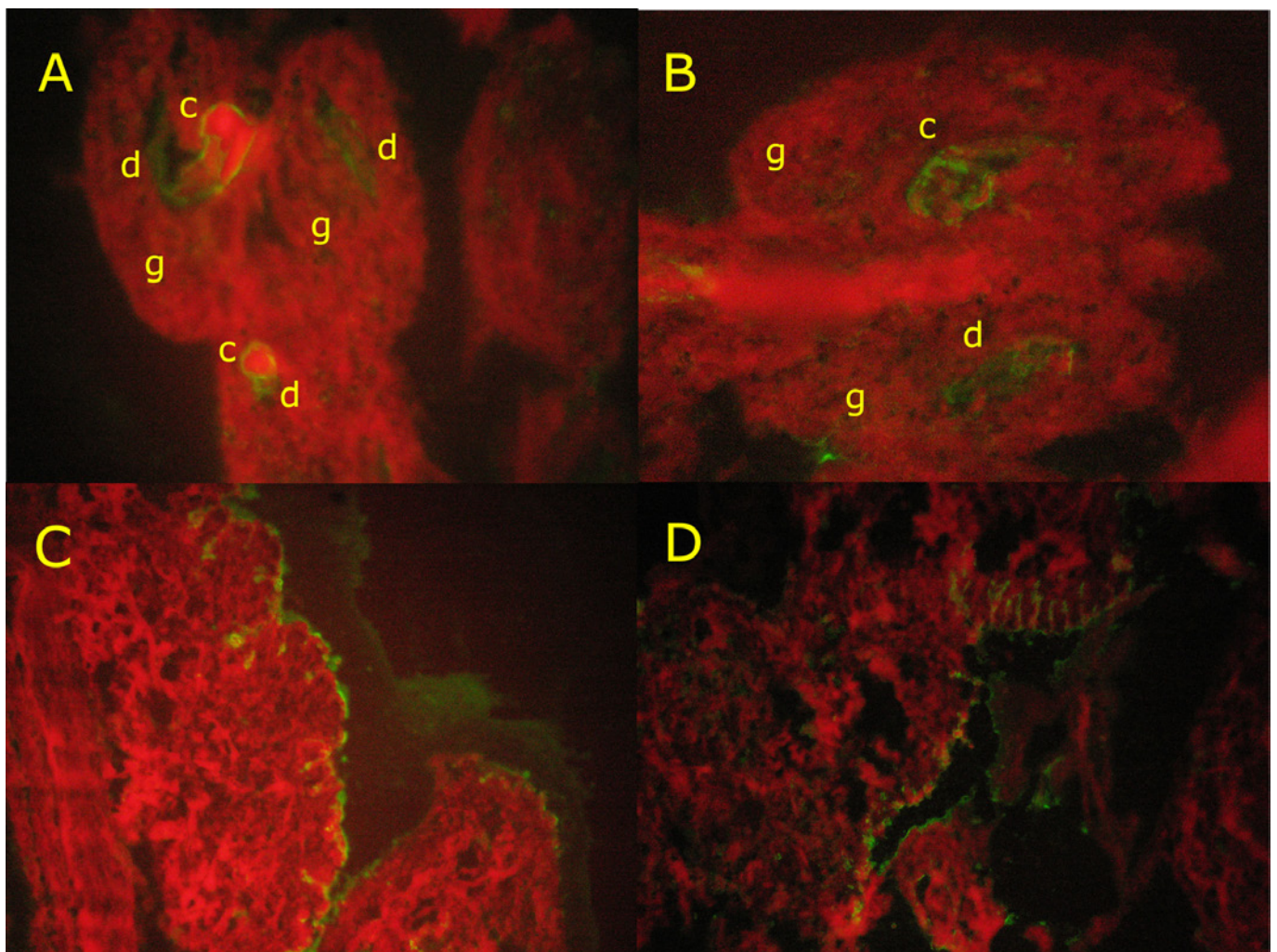


Figure 2. Paraffin tissues sections of *B. glabrata* infected by *A. cantonensis*. In (A) and (B) granulomas (g) formed around the larvae, showing the fluorescence patterns for IgG antibodies against sera samples from Group I (confirmed cases of the disease) by IFA. Focal pattern with cuticle delineation (c) and diffuse pattern (d) in the space between the larva and the granuloma. In (C) and (D) reactivity for the IgG fraction against sera samples from Group I, with delineation of the mantle border epithelium and the intestinal epithelium, respectively

exclusively observed in the uterine contents. **Figure 3** compares a reactive sample for IgG antibodies with a non-reactive sample, regarding the characteristics of the focal and diffuse fluorescence patterns.

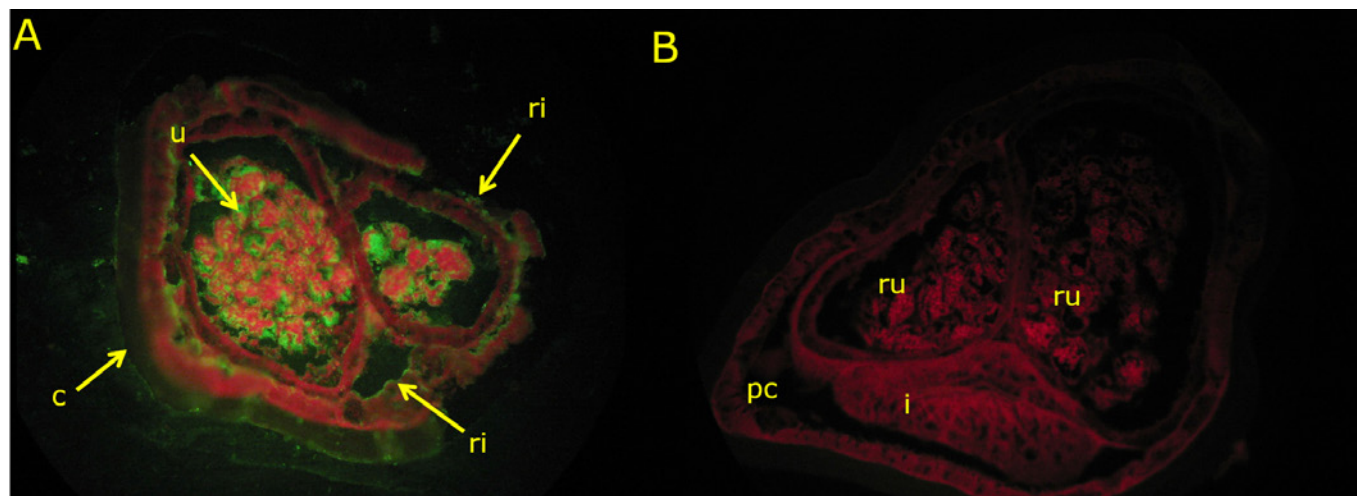


Figure 3. Paraffin sections of adult female *A. cantonensis* worms comparing the reactivity patterns for the IgG fraction in (A) a sample from Group I, and in (B) a sample from Group II. In (A) the arrows point to focal fluorescence of the cuticle (c) and internal coatings (ri); and diffuse fluorescence in the uterus (u). In (B) absence of reactivity in the pseudocoelom coating (pc), intestine (i) and internal contents of the uterine branches (ru)

The uterine contents were the regions with the highest antigenic focus for IgG, with markings of eggs and, possibly, of embryonic structures related to them. **Figure 4** shows the differences in staining patterns and fluorescence intensity in the uterine contents of *A. cantonensis* females.

There were variations in the reactivity for IgG antibodies among the 46 samples evaluated, and according to the category of the group of sera used in the assays. In Group I, 100% of the samples (14/14) were reactive for uterine structures; in 78.5% (11/14) the intensity of the reactions ranged from high to moderate, and the other samples (3/14) exhibited low intensity. In this group, reactivity for the cuticle and inner coatings occurred less frequently than for the uterus. In Group II, there was no reactivity for the uterine contents with the exception of a single sample that showed a low-intensity reaction. The reactivity for uterine structures in Group III was 80% (4/5) for schistosomiasis and 83% (5/6) for strongyloidiasis, with a predominance of medium and low intensity reactions. Reactivity for the cuticle and internal linings occurred in this group, mainly in samples from patients with strongyloidiasis. In Group IV there was no reactivity for the uterine contents or for other structures, with the exception of one sample that presented a low-intensity reaction both for the uterus and cuticle.

DISCUSSION

For more than six decades, IFA has been used for the immunodiagnosis of parasitic diseases caused by protozoa and helminths. In general, the technique has good sensitivity and specificity rates, which may vary according to the nature of the antigens used and the immunoglobulin class involved in the host's humoral response. Whole, fragmented or cut parasites, from different evolutionary stages, have been used as sources of antigens for the reaction²³.

In our field, the immunofluorescence test is used in sero-epidemiological surveys and in the

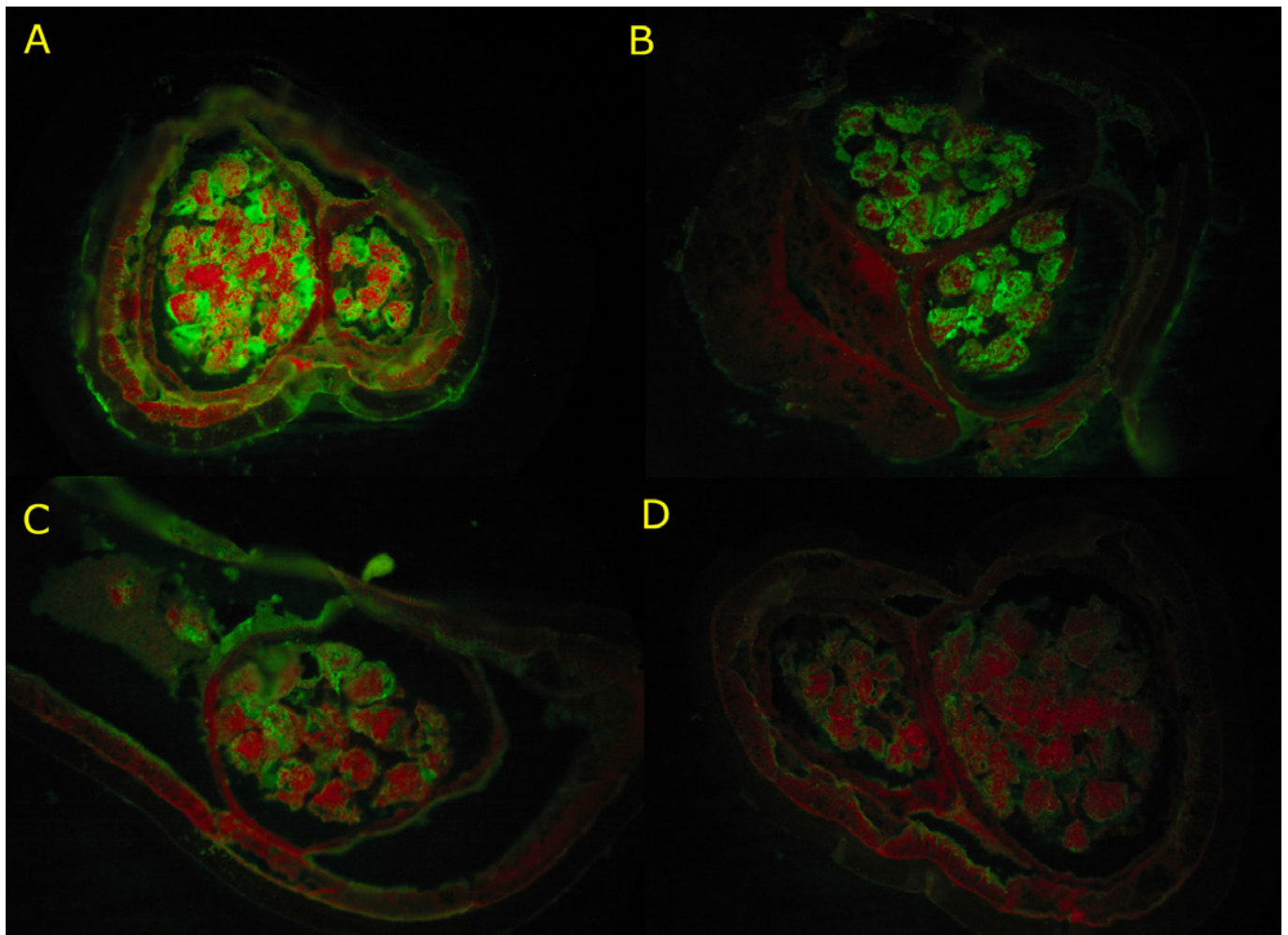


Figure 4. Paraffin sections of adult female *A. cantonensis* worms showing marking and fluorescence intensity patterns in uterine contents by IFA-IgG. In (A) high fluorescence intensity; (B) mean fluorescence intensity; (C) low fluorescence intensity; (D) very low fluorescence intensity

complementary diagnosis of the acute and chronic phases of schistosomiasis. The reaction uses paraffin sections of adult *S. mansoni* worms, which expose polysaccharide and proteoglycan antigens, related to the digestive tract, with high reactivity for IgM antibodies. This technique was originally described by Nash²⁴ who introduced Rossman's solution as a fixative, a reagent that promotes the denaturation of protein epitopes. Later, the polysaccharide nature of the antigens was confirmed by other authors using immunofluorescence, and these components were demonstrated in other evolutionary forms of *S. mansoni*^{25,26}.

In the present study, it was possible to identify, using the same protocol, stage-specific antigenic structures in tissue sections of experimentally infected *B. glabrata* and female worms, against sera from confirmed cases of eosinophilic meningitis caused by *A. cantonensis*. In addition, a panel composed of samples which were not reactive for the disease; samples from patients infested with other parasites, and samples from individuals free from other parasites served as controls to evaluate cross-reactivity in sections of adult females. The results pointed to high antigenicity of the two evolutionary stages (larvae and worms) in paraffin sections. Likewise, Bender et al²⁷, using IFA in frozen sections, also demonstrated high antigenicity of different evolutionary stages of *A. costaricensis*, another metastrongylid species of medical interest. However, it is noteworthy that the use of

paraffin sections of infected *B. glabrata* tissues and female worms, for this purpose, seems to be unprecedented, since there was no reference in the literature about this approach for *A. cantonensis*.

For tissue sections, it was decided to use snails with infections that lasted longer than usual (five months), as a guarantee that the evolutionary forms were in the stage of infective L3 larvae. Under the previously described conditions, encapsulated larvae were observed inside granulomas and distributed in different tissues of the snails, as revealed by HE staining. According to Harris and Cheng²⁸, encapsulation results from the host tissue reaction, which is not capable of making the larvae unviable. The authors observed that encapsulated larvae survived for more than 12 months in snail tissues after infection.

The two fluorescence patterns found in paraffin sections of infected snails are associated with L3 larvae within the granulomas. The reactivity of IgG antibodies present in the entire Group I sera, against these structures, showed that the infective larvae retained their antigenicity when transmitted, through the food chain, to other hosts.

Focal fluorescence, with cuticular delineation, suggests that the host's humoral response is directed against the surface constituents of the larvae. The use of Rossman's solution as a fixative in histological preparations prevents the binding of antibodies to protein epitopes, which is why labeling did not occur within the larvae. The diffuse fluorescence found between larvae and granulomas points to dispersed antigenic constituents, which suggests the presence of excretion/secretion antigens produced by the parasites, throughout their lives. The excretory/secretory activity is common to parasites as a form of adaptation to the evolutionary cycle and, therefore, related to the mechanisms of host's immune response invasion, migration, evasion, among other functions²⁹. The ability of L3 larvae and other evolutionary stages of *A. cantonensis* to produce excretion/secretion antigens has been proven *in vitro*³⁰, and their antigenicity was evaluated by monoclonal antibodies^{31,32}.

In paraffin sections of female worms, IgG antibodies were reactive for cuticle and internal structures, with accentuated marking of uterine structures. Considering the variations in both the reactivity and fluorescence intensity found among the different groups of serum samples, the focal fluorescence pattern, with cuticular delineation and internal delineation of the viscera, was interpreted as nonspecific. Although all samples from Group I were reactive for uterine contents, cross-reactivity to IgG antibodies was observed in most samples from Group III, mainly in patients with strongyloidiasis. The diffuse fluorescence pattern observed in the organ suggests that more than one component is responsible for the reactivity of IgG antibodies. Bender et al²⁷ related the high antigenicity of eggs and uterine content of adult females of *A. costaricensis* to the maturation of the reproductive tube.

The results of the present study only allow us to infer that the markings observed in tissue sections and female worms of *A. cantonensis* indicate the existence of components of high antigenicity; but do not provide a basis for a deeper discussion about the biochemical nature of these antigens. However, some considerations must be pointed out based on new knowledge generated in the last two decades. A wide variety of molecules with different functions have already been identified in all forms of the life cycle of *A. cantonensis*, derived from excretion/secretion products, crude extracts of worms and purified fractions^{14,16,31-35}. Glycoconjugates play an important role in the host's innate and adaptive immune response³⁶. It is assumed that these molecules participate in the parasite/host interaction and the glycan portion is responsible for inducing the immune response in the host³⁷. Glycoproteins have already been identified in different antigenic preparations of *A. cantonensis*, including the purified fraction of 31 kDa used in immunodiagnosis^{37,38}. Cross-reactions with other parasitic diseases have already been reported, with emphasis on those that can

determine clinical conditions of eosinophilic meningitis, such as toxocariasis, gnathostomiasis, strongyloidiasis, among others^{13,15}. These data demonstrate the need to improve the immunodiagnosis of eosinophilic meningitis and introduce the differential diagnosis as a medical practice in the routine investigation of cases¹³.

CONCLUSION

In this study, IFA applied to paraffin sections was able to focus antigens on structures present in infected *B. glabrata* tissues and in female *A. cantonensis* worms. Based on the different patterns of fluorescence, the observed results pointed to the possibility of the presence of excretory and secretory antigens inside the granulomas that involve L3 larvae in the tissues of *B. glabrata*, and for antigens present in the uterine structures of the worms, which reacted with antibodies IgG present in sera from confirmed cases of the disease. Cross-reactivity, especially with antibodies present in sera from patients with other parasites, was observed in uterine structures of female worms, which confirms the results of other studies. Therefore, IFA in paraffin sections opens a new perspective for the identification of structures with antigenic potential and other serological markers that can be applied to improve the laboratory diagnosis of eosinophilic meningitis.

The difficulty in obtaining purified antigens has limited the laboratory response in relation to case confirmation, which makes Laboratory Surveillance less efficient. The implementation of a Health Surveillance Program associated with Laboratory Surveillance is essential for the identification and monitoring of new cases, a measure that contributes to the knowledge of the disease in our environment.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest.

RESEARCH FUNDING

This research has been co-financed by the Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) – CNPq of the Adolfo Lutz Institute and by the Programa de Pós-Graduação em Ciências of the Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

AUTHORS CONTRIBUTIONS

All authors contributed to the design, planning, analysis, interpretation of data. All authors read and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) – CNPq of the Adolfo Lutz Institute for granting the scholarship to Felipe Correa Rezende de Souza and the Programa de Pós-Graduação em Ciências of the Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo for funding part of the consumable cost of this study.

PRESENTATION NOTE

The partial results of this article integrate the doctoral thesis by Leyva Cecília Vieira de Melo, entitled “Immunodiagnosis of meningoencephalic angiostrongyliasis against different antigenic preparations of *Angiostrongylus cantonensis*”, defended in 2020 in the Programa de Pós-Graduação em Ciências of the Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

REFERENCES

1. Wang QP, Lai DH, Zhu XQ, Chen XG, Lun ZR. Human angiostrongyliasis. Lancet Infect Dis. 2008;8(10):621-30.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(08\)70229-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(08)70229-9)
2. Graeff-Teixeira C, Morassutti AL, Jones MK. Diagnosing and understanding angiostrongyliasis, a zoonotic cause of meningitis. ACS Chem Neurosci. 2018;21;9(3):393-4.
<https://doi.org/10.1021/acchemneuro.8b00018>
3. Kramer K J, Posner J, Gosnell W L. Role of gastropod mucus in the transmission of *Angiostrongylus cantonensis*, a potentially serious neurological infection. ACS Chem Neurosci. 2018;9(4):629-32.
<https://doi.org/10.1021/acchemneuro.7b00491>
4. Graeff-Teixeira C, da Silva AC, Yoshimura K. Update on eosinophilic meningoencephalitis and its clinical relevance. Clin Microbiol Rev. 2009;22(2):322-48, Table of Contents.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00044-08>
5. Feng Y, Zheng C, Zhou Z, Xiong H, Feng F, Xie F et al. IL-17A neutralizing antibody attenuates eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* by involving IL-17RA/Traf6/NF- κ B signaling. Exp Cell Res. 2019;384(1):111554.
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.111554>
6. Lv S, Zhou XN, Andrews JR. Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*. ACS Chem Neurosci. 2017;8(9):1815-6.
<https://doi.org/10.1021/acchemneuro.7b00233>
7. Morassutti AL, Thiengo SC, Fernandez M, Sawanyawisuth K, Graeff-Teixeira C. Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*: an emergent disease in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014;109(4):399-407.
<https://doi.org/10.1590/0074-0276140023>
8. Espírito-Santo MC, Pinto PL, Mota DJ, Gryscek RC. The first case of *Angiostrongylus cantonensis* eosinophilic meningitis diagnosed in the city of São Paulo, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2013;55(2):129-32.
<https://doi.org/10.1590/s0036-46652013000200012>
9. Barbosa TA, Thiengo SC, Fernandez MA, Graeff-Teixeira C, Morassutti AL, Mourão FRP et al. Infection by *Angiostrongylus cantonensis* in both humans and the snail *Achatina (Lissachatina) fulica* in the city of Macapá, in the Amazon Region of Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2020;115:e200115.
<https://doi.org/10.1590/0074-02760200115>

10. da Mota DJG, de Melo LCV, Pereira-Chiocola VL, Gava R, Pinto PLS. First record of natural infection by *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongyloidea) in *Belocaulus willibaldoi* and *Rattus norvegicus* in an urban area of São Paulo city, SP, Brazil. Heliyon. 2020;6(10):e05150.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05150>
11. Souza FN, Aguiar Santos M, Almeida Alves D, Cecília Vieira de Melo L, Jessé Gonçalves da Mota D, Cristina Pertile A et al. *Angiostrongylus cantonensis* in urban populations of terrestrial gastropods and rats in an impoverished region of Brazil. Parasitology. 2021;148(8):948-1002.
<https://doi.org/10.1017/S0031182021000597>
12. Wang QP, Wu ZD, Wei J, Owen RL, Lun ZR. Human *Angiostrongylus cantonensis*: an update. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012;31(4):389-95.
<https://doi.org/10.1007/s10096-011-1328-5>
13. Morassutti AL, Levert K, Perelygin A, da Silva AJ, Wilkins P, Graeff-Teixeira C. The 31-kDa antigen of *Angiostrongylus cantonensis* comprises distinct antigenic glycoproteins. Vector Borne Zoonotic Dis. 2012;12(11):961-8.
<https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0957>
14. Song Z, Huang H, Tan F, Zhang E, Hu J, Pan C. Differential proteomics analysis of female and male adults of *Angiostrongylus cantonensis*. Exp Parasitol. 2012;131(2):169-74.
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.03.019>
15. Chen KY, Lu PJ, Cheng CJ, Jhan KY, Yeh SC, Wang LC. Proteomic analysis of excretory-secretory products from young adults of *Angiostrongylus cantonensis*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2019;114:e180556.
<https://doi.org/10.1590/0074-02760180556>
16. Eamsobhana P, Yong HS. Immunological diagnosis of human angiostrongyliasis due to *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Angiostrongylidae). Int J Infect Dis. 2009;13(4):425-31.
<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2008.09.021>
17. Morassutti AL, Rascoe LN, Handali S, DA Silva AJ, Wilkins PP, Graeff-Teixeira C. Cross-reactivity of the 31 kDa antigen of *Angiostrongylus cantonensis* – Dealing with the immunodiagnosis of meningoencephalitis. Parasitology. 2017;144(4):459-63.
<https://doi.org/10.1017/S0031182016001918>
18. Rugai E, Mattos T, Brisola AP. Nova técnica para isolar larvas de nematóides das fezes – Modificação do Método de Baermann. Rev Inst Adolfo Lutz. 1954;14(1):5-8. [cited 2021 Jun 17]. Available from:
<https://periodicos.saude.sp.gov.br/index.php/RIAL/article/view/33246>

19. Deelder AM, Kornelis D. A comparison of the IFA and the ELISA for the demonstration of antibodies against schistosome gut-associated polysaccharide antigens in schistosomiasis. Z Parasitenkd. 1980;64(1):65-75.
<https://doi.org/10.1007/BF00927057>
20. Michalany J. Técnica Histológica em Anatomia Patológica: com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico. 3.ed. São Paulo: Editora Michalany; 1998.296p.
21. Pan, CT. The general histology and topographic microanatomy of *Australorbis glabratus*. Bull. Mus. Comp. Zool. 1958; 119(3):237-59. [cited 2021 Jun 28]. Available from:
<https://ia800204.us.archive.org/4/items/biostor-854/biostor-854.pdf>
22. Kanamura HY, Silva RM, Chiodelli SG, Glasser CM, Dias LC. IgM-immunofluorescence test as a diagnostic tool for epidemiologic studies of Schistosomiasis in low endemic areas. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97(4):485-9.
<https://doi.org/10.1590/s0074-02762002000400005>
23. Voller A, De Savigny D. Diagnostic serology of tropical parasitic diseases. J Immunol Methods. 1981;46(1):1-29.
[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(81\)90328-8](https://doi.org/10.1016/0022-1759(81)90328-8)
24. Nash TE. Antibody response to a polysaccharide antigen present in the schistosome gut. I. Sensitivity and specificity. Am J Trop Med Hyg. 1978;27(5):939-43.
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.1978.27.939>
25. Deelder AM, van Zeyl RJ, Fillié YE, Rotmans JP, Duchenne W. Recognition of gut-associated antigens by immunoglobulin M in the indirect fluorescent antibody test for schistosomiasis mansoni. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1989;83(3):364-7.
[https://doi.org/10.1016/0035-9203\(89\)90506-3](https://doi.org/10.1016/0035-9203(89)90506-3)
26. Andrade ZA, Sadigursky M. Estudos sobre um antígeno polissacáride do *Schistosoma mansoni*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1980;75(1-2):47-56.
<https://doi.org/10.1590/s0074-02761980000100005>
27. Bender AL, Maurer RL, da Silva MC, Ben R, Terraciano PB, da Silva AC et al. Ovos e órgãos reprodutores de fêmeas de *Angiostrongylus costaricensis* são reconhecidos mais intensamente por soros humanos de fase aguda na angiostrongilíase abdominal. Rev Soc Bras Med Trop. 2003;36(4):449-54.
<https://doi.org/10.1590/s0037-86822003000400003>
28. Harris KR, Cheng TC. The encapsulation process in *Biomphalaria glabrata* experimentally infected with the metastrongylid *Angiostrongylus cantonensis*: light microscopy. Int J Parasitol. 1975;5(5):521-8.
[https://doi.org/10.1016/0020-7519\(75\)90044-2](https://doi.org/10.1016/0020-7519(75)90044-2)

29. Dzik JM. Molecules released by helminth parasites involved in host colonization. Acta Biochim Pol. 2006;53(1):33-64.
30. Oku Y, Kamiya M. Circumoval and circumlarval precipitate reactions of *Angiostrongylus cantonensis*. Jpn J Vet Res. 1984;32(1):23-39.
31. Chen MX, Zhang RL, Chen JX, Chen SH, Li XH, Gao ST et al. Monoclonal antibodies against excretory/secretory antigens of *Angiostrongylus cantonensis*. Hybridoma (Larchmt). 2010;29(5):447-52.
<https://doi.org/10.1089/hyb.2010.0008>
32. Shih HH, Chen SN. Immunodiagnosis of angiostrongyliasis with monoclonal antibodies recognizing a circulating antigen of mol. wt 91,000 from *Angiostrongylus cantonensis*. Int J Parasitol. 1991;21:171-7.
[https://doi.org/10.1016/0020-7519\(91\)90007-T](https://doi.org/10.1016/0020-7519(91)90007-T)
33. Lai SC, Jiang ST, Chen KM, Lee HH. Matrix metalloproteinases activity demonstrated in the infective stage of the nematodes, *Angiostrongylus cantonensis*. Parasitol Res. 2005;97(6):466-71.
<https://doi.org/10.1007/s00436-005-1484-6>
34. Lee JD, Yen CM. Protease secreted by the infective larvae of *Angiostrongylus cantonensis* and its role in the penetration of mouse intestine. Am J Trop Med Hyg. 2005;72(6):831-6.
35. Morassutti AL, Levert K, Pinto PM, da Silva AJ, Wilkins P, Graeff-Teixeira C. Characterization of *Angiostrongylus cantonensis* excretory-secretory proteins as potential diagnostic targets. Exp Parasitol. 2012;130(1):26-31.
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.10.003>
36. Rudd PM, Elliott T, Cresswell P, Wilson IA, Dwek RA. Glycosylation and the immune system. Science. 2001;291(5512):2370-6.
<https://doi.org/10.1126/science.291.5512.2370>
37. Veríssimo CM, Morassutti AL, von Itzstein M, Sutov G, Hartley-Tassell L, McAtamney S et al. Characterization of the N-glycans of female *Angiostrongylus cantonensis* worms. Exp Parasitol. 2016;166:137-43.
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.04.012>
38. Morassutti AL, Levert K, Perelygin A, da Silva AJ, Wilkins P, Graeff-Teixeira C. The 31-kDa antigen of *Angiostrongylus cantonensis* comprises distinct antigenic glycoproteins. Vector Borne Zoonotic Dis. 2012;12(11):961-8.
<https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0957>





Use of laboratory methodologies to confirm an outbreak of acute diarrheal disease caused by multiple pathogens

Uso de metodologias laboratoriais para confirmação de surto de doença diarreica aguda causada por múltiplos patógenos

Maria Aparecida Moraes Marciano¹ , Rafaela Aparecida Silva¹ , Maria Luísa Barbosa¹ , Pedro Luiz da Silva Pinto² , Ricardo Gava³ , Vera Lucia Pereira-Chioccola^{3*} 

¹ Núcleo de Morfologia e Microscopia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brazil.

² Núcleo de Enteroparasitas, Centro de Parasitologia e Micologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brazil.

³ Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas e Fungos, Centro de Parasitologia e Micologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brazil.

*Corresponding author/Autor de correspondência: pchioccola@gmail.com

Received/Recebido: 16.12.21 – Accepted/Aceito: 15.08.2022

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate an outbreak caused by protozoa, which occurred in a municipality in the Brazil southern region. The investigations were carried out analyzing 47 fresh stool samples and 26 water samples by parasitological and molecular methods, as well as, direct immunofluorescence. After the filtrations of water samples and purification of stool samples, the concentrates were evaluated microscopically for presence of parasites. Molecular analyses were performed by polymerase chain reaction (PCR) for DNA detection of *Giardia* spp., *Cryptosporidium parvum*, *C. hominis* and *Cyclospora cayetanensis*. Out of 26 water samples, 30.8% (8/26) had waterborne protozoa and *C. cayetanensis* was the most prevalent (15.5%). Out of the 47 stool samples, 23.4% (11/47) were infected with *C. cayetanensis* and *Giardia* spp. The results showed that backwash water samples from filters of the Water Treatment Station were contaminated with *C. cayetanensis*, *C. hominis* and *Giardia* spp., suggesting the contamination of water sources with human waste brought by sewage. These results show the importance of protozoa investigation in water and stool samples by laboratory methodologies principally in outbreaks causing acute diarrheal disease.

Keywords. Waterborne Diseases, Diarrhea, Protozoan Infections, *Giardia*, *Cryptosporidium*, *Cyclospora*.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi investigar um surto causado por protozoários, ocorrido em um município da região sul do Brasil. As investigações foram realizadas analisando 47 amostras de fezes frescas e 26 amostras de água por métodos parasitológicos, moleculares e de imunofluorescência direta. Após as filtrações das amostras de água e purificação das amostras de fezes, os concentrados foram avaliados microscopicamente a procura de parasitas. A seguir, foram analisadas, pela reação em cadeia da polimerase (PCR), a detecção de DNA de *Giardia* spp., *Cryptosporidium parvum*, *C. hominis* e *Cyclospora cayetanensis*. Das 26 amostras de água, 30,8% (8/26) apresentaram protozoários de veiculação hídrica, sendo que, *C. cayetanensis* foi o mais prevalente (15,5%). Das 47 amostras de fezes, 23,4% (11/47) estavam infectadas por *C. cayetanensis* e *Giardia* spp. Os resultados mostraram que as águas de retrolavagem dos filtros da Estação de Tratamento de Água estavam contaminadas com *C. cayetanensis*, *C. hominis* e *Giardia* spp. sugerindo a contaminação dos mananciais com dejetos humanos trazidos pelo esgoto. Estes resultados mostram a importância da investigação de protozoários em água e fezes por metodologias laboratoriais, principalmente em surtos que causam doença diarreica aguda.

Palavras-chave. Doenças Transmitidas pela Água, Diarreia, Infecções por Protozoários, *Giardia*, *Cryptosporidium*, *Cyclospora*.

INTRODUCTION

Diarrheal infections cause high health impact in low-income populations, especially in developing countries and children under five years old that are the most affected¹. All diarrheal diseases are classified as acute or persistent. However, those caused by bacteria, viruses and parasites cause severe diarrhea that are produced by sources of environmental, zoonotic or human contamination^{2,3}. The occurrence of the majority of diarrheal outbreaks worldwide is caused by transmission of these pathogens by water and food⁴⁻⁶.

In recent years, different factors have been related to the spread of emerging pathogens. These factors include the increase of pathogens contamination in drinking water and food; the human susceptibility to these pathogens; changes in treatment technology of drinking water; and globalization⁴. The documented outbreaks demonstrate that people of all ages can be infected. However, children, young and elderly people can develop more severe clinical symptoms⁵.

The sources of freshwater used by man, such as wells, rivers, streams and lakes suffer a continuous and increasing process of degradation due to the dumping of sewage, animal stools (wild and for production). In addition, the resulting waste from industrial activities cause contamination in public water supply^{7,8}.

Risk factors such as house place, age, ingestion of raw vegetables and quality of drinking water are associated to diarrhea caused by parasites transmitted via the fecal-oral route as infections caused by *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. and *Cyclospora cayetanensis*⁸⁻¹¹.

As Instituto Adolfo Lutz (IAL) is the “Laboratório Central de Saúde Pública” in São Paulo (LACEN/SP) normally is requested to confirm the laboratory diagnosis from other Brazilian laboratories. In 2019, the epidemiological surveillance from a municipality located in the southern region of Brazil requested technical/scientific support in order to investigate a wide-ranging acute diarrheal outbreak that persisted for 4 months. The clinical and epidemiological characteristics appointed to infectious causes involving multiple pathogens, including intestinal protozoa, which were transmitted by treated drinking water.

This article presents the results of the laboratory investigations on environmental and clinical samples carried out in IAL (LACEN/SP), which collaborate with the Brazilian Health Ministry for the etiological definition of an outbreak.

MATERIAL AND METHODS

Study characteristics

Between 2018 and 2019 a diarrheal outbreak occurred for around 4 months in Cascavel, PR, Brazil, causing 12,223 diarrhea cases. The Brazilian health authorities investigated the epidemiological and clinical characteristics of this acute diarrheal disease caused in the population during this outbreak.

The local sanitation company investigated the drinking water and confirmed the contamination by protozoa of genera *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in the springs. In addition, symptomatic individuals with diarrhea, living in this municipality, had positive parasitological tests for *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. These facts led the health authorities to request IAL to expand the research in the following items:

- I. Confirmation of diagnosis in environmental samples. Expansion of investigation analyzing other drinking water collections. Genotypic characterization of identified parasites as differentiation between *C. parvum* and *C. hominis*, to identify the probable infection source.
- II. Confirmation of parasitological diagnosis in clinical samples. Quality control on slides using specific stains, which confirmed the protozoa in the initial diagnosis and other protozoa species.

Environmental samples

The health authorities from the municipality sent to IAL 26 water samples packed in 20 L bottles, collected in “Water Treatment Station”. Water samples were collected at: i. raw water: untreated water collected in river surface (4 samples); ii. water from the internal washing of filters that were used to filter raw water from springs (5 samples); iii. treated water from the reservoir’s surface (4 samples); iv. drinking water from home taps (7 samples); v. drinking water from schools and public hospitals taps (3 samples); and v. water from springs and/or spouts (3 samples).

Clinical samples

At the same time, 47 frozen stool samples from individuals with diarrhea and living in the municipality were sent to IAL to confirm the diagnosis for intestinal coccidia. Previously, these individuals had positive parasitological diagnosis performed in local laboratories. They sent, also, for diagnosis confirmation, 8 slides containing stool smears from symptomatic individuals stained by fuchsin and 10 computed slide images analyzed by local laboratories that identified *Cryptosporidium* spp.

Preparation of environmental samples for analysis

Each water sample (20 L) was filtered, with the aid of a vacuum pump, in a system of hoses coupled in a closed container containing a membrane 142 mm-diameter, 0.22 μm -pores, under pressure of 0.7 kgf/cm². Then, the membrane containing the recovered from the filtration was removed from the apparatus, placed in a Petri dish to remove the retained material with the aid of a cell scraper. One part of this material was used for microscopic analysis of parasites and the other (200 μL) for DNA extraction⁹.

Preparation of clinical samples for analysis

Frozen fecal samples were inadequate for carrying out the complete protocol for microscopically investigation of intestinal and opportunistic parasites (recommendations of Health Ministry-CGLLAB Manual)¹². Thus, stool samples were concentrated and purified by flotation centrifuge in sucrose procedure¹³. About 15 g of each stool sample was diluted in distilled water (30 mL), filtered through gauze with 13 threads per cm² folded in four and centrifuged 3 times (2400 g for 10 min). After discarding the supernatant, the pellet was suspended in 15 mL of saturated sucrose solution (1200 g/mL) and centrifuged (500 g for 3 min). The supernatant (2 mL) was diluted 10 times in distilled water and centrifuged at 2400 g for 10 min. The sediment was suspended in 1 mL of distilled water and

the solution was used for microscopic examination after specific staining methodologies. An aliquot (200 μ L) reserved for DNA extraction.

Parasitological diagnosis

From the water and stool samples concentrated by the sucrose flotation centrifuge methodology, smears were performed on slides. Kinyoun stain was performed for investigation of intestinal coccidia oocysts with alcohol-acid resistant staining characteristics¹⁴. The investigation of evolutionary forms of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. was determined by direct immunofluorescence using a commercial Kit Merifluor[®] (Meridian Bioscience Inc., Cincinnati, Ohio). The images were observed in optical and immunofluorescence microscopies. The morphometric analyses and the revisions of slides sent by local laboratories were carried out by captured in a Canon A640 digital camera and treated by the AxioVision 4.8.2 program, Zeiss.

Molecular diagnosis

Aliquots of 200 μ L of prepared samples (water or stool) were digested for 12-18 hours at 56 °C with proteinase K (20 μ g) in 40 μ L of AL buffer (Qiagen), under agitation at 500 oscillations/min. Next, DNA extractions were performed using QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen[®]), following the manufacturer's protocol. The purity concentrations of the DNA samples were determined by O.D. ratio at 260 and 280 nm on a NanoDrop ND1000. DNA samples were diluted with ultrapure water to a concentration of 100 ng/ μ L for use in PCR.

For conventional PCR (cPCR) and semi-nested PCR (snPCR), amplifications were performed using GoTaq[®]Green Master Mix kit (Promega), which contain per reaction (12.5 μ L) one unit of Taq DNA polymerase, 10 mM Tris-HCl, pH 8.5, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂ and 200 mM of each deoxynucleotides triphosphates (dATP, dGTP, dCTP, dTTP). In each reaction were added 5 μ L of tested DNA and 10 pmoles of each primer in a final volume of 25 μ L. Amplifications were performed using a Veriti[®] Thermal Cycler (Applied Biosystems[®]).

For real-time PCR (qPCR), amplifications were performed in a final volume of 20 μ L per reaction. The tested DNA (3 μ L at a concentration up to 100 ng/ μ L) or the control DNA (5 ng/ μ L) were added to the solution containing 10 μ L of 2X TaqMan Universal PCR Master Mix and 1.25 μ L of primer set containing 18 μ M of each molecular marker and 5 μ M of the probe. The positive control and negative control (ultrapure water) were included in all reactions and amplifications were performed in the ABI 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) equipment.

The determination of *Giardia* spp. was performed by single-tube snPCR. Initially, 18 μ M of each primer were added to each reaction: GG-F (5'AAGTGCCTCAACGAGCAGCT3'), G7-F (5'AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGC3') and G759-R (5'GTCGTCTCGAAGATCCAGGGCGGCTC3')¹⁵⁻¹⁷. Amplifications were performed with a program consisting of 20 cycles (94 °C for 30 sec; 65 °C for 30 sec and 72 °C for 30 sec) for annealing (G7-F and G759-R). This was followed with an interval of 4 °C for 2 min. Then, 35 more cycles were added to the program (94 °C for 30 sec; 58 °C for 30 sec and 72 °C for 45 sec) for annealing the primers GG-F and G759-R¹⁵.

The detection of *Cryptosporidium* spp. was performed by cPCR using 18 μ M of each primer: CryIAL1F

(5'TACCTACGTATGTTGAAACTCCG3'), CryIAL2F (5'AGGATACGAAATATCAGGAAAGC3') and CryIAL3-R (5'TGTATATCCTGGTGGGCAGACC3'), which amplify a specific sequence of a gene that encodes an oocyst wall protein from *Cryptosporidium* spp.¹⁷. In each reaction was used 0.1 µL, 0.5 µL and 0.5 µL of CryIAL1F, CryIAL2F and CryIAL3R respectively. Amplifications were performed in an initial step consisting of 20 cycles (94 °C for 30 sec; 61 °C for 30 sec and 72 °C for 30 sec) for annealing the external molecular primers CryIAL1F and CryIAL3R. After the first step, the second step was followed with 35 cycles (94 °C for 30 sec; 56 °C for 30 sec and 72 °C for 45 sec) for annealing the primers CryIAL2F and CryIAL3R¹⁷.

The discrimination of the most common species in epidemic outbreaks, *C. parvum* and *C. homini*, was determined by qPCR, using 18 µM of each of the primer set. For *C. parvum*, the primers were JVAF (5'ATGACGGGTAACGGGGAAT3'), JVAR (5'CCAATTACAAAACCAAAAAGTCC3') and the FAM-labeled probe (5'ATTTATCTCTTCGTAGCGGCG3'), which amplifies a sequence from the 18S rRNA region of *C. parvum*. For *C. hominis*, the primers were JVAGF (5'ACTTTTTGTTTGTTTTACGCCG5'), JVAGR (5'AATGTGGTAGTTGCGGTTGAA3') and the probe labeled "FAM" (5'ATTTATTAATTTATCTCTTACTTCGT3')¹⁸.

Molecular identification of *C. cayetanensis* was performed using 18 µM of each of the primer: Cyclo250F (5'TAGTAACCGAACGGATCGCATT3'), Cyclo350R (5'AATGCCACGGTAGGGCAATA3') and the probe labeled with "FAM" Cyclo281 (5'CCGGCGATAGATCATTCAAGTTTCTGACC3')¹⁹. qPCR amplifications were performed in an initial cycle of 50 °C for 2 min, a cycle at 95 °C for 5 min and then 45 cycles at 95 °C for 30 sec and at 67 °C for 30 sec.

The amplified cPCR products were separated by electrophoresis in a horizontal electrophoretic system in agarose gel 1.2%, TBE buffer (45 mM Tris-Borate and 1 mM EDTA pH 8.0), containing 0.5 ethidium bromide g/mL. The molecular mass marker with multiple fragments of 100 bp was added in all gels. The runs were performed at 100 Volts for 1 h. Samples were visualized on a Gene Genius transilluminator (Gel Capture Pro Program, version 4.5.3) ultraviolet at a wavelength of 302 nm¹⁷.

RESULTS

Out of the 26 water samples analyzed by molecular and parasitological methods, 8 (30.8%) had waterborne protozoa. Of these, 1 was determined by direct immunofluorescence, 4 by PCR, 2 by parasitological diagnosis and 1 by both methods (parasitological and PCR). Among the positive samples, the most frequent protozoan was *C. cayetanensis* detected in 4 samples (15.5%). *C. hominis* was detected in 3 samples (11.5%). Only 1 (3.8%) water sample from backwash filters of the municipal treatment plant was positive for *Giardia* spp. **Table 1** shows, in detail, the results of each water sample studied.

The 47 frozen stool samples sent to IAL, the local laboratory determined that 34 were positive for *Cryptosporidium* spp., one for *Cyclospora cayetanensis* and 12 had non-pathogenic parasites. Likewise, in review of eight slides and 10 microphotographs, no structures suggestive of these intestinal coccidia were found. The single positive case for *C. cayetanensis*, determined in local laboratories, was also confirmed in IAL by the parasitological and molecular methods. The other non-pathogenic parasites found were not confirmed in IAL. **Figures 1A, 1B, 1C and 1D** show *C. cayetanensis* oocysts stained with Carbol-Fuchsin solution according to Kinyoun method isolated from a water sample and a stool sample, respectively.

Table 2 presents, in detail, the results of each stool sample. From the 47 stool samples, 11 (23.4%) were positive for protozoa. Of these, *Giardia* spp. was detected in 3 samples by direct immunofluorescence (**Figures 1E** and **1F**), 8 were positive for *C. cayetanensis*.

Regarding the age group, the 21 stool samples from individuals aged between 0 to 29 years old, 2 (9.5%) were positive for *C. cayetanensis* and 3 (14.3%) for *Giardia* spp. Out of the 20 individuals aged 30 to 59 years, 4 (20%) were positive for *C. cayetanensis*. The 6 stool samples from individuals aged over 60 years, 2 (33.3%) were positive for *C. cayetanensis*. Contrarily from water samples, in stool samples, *Cryptosporidium* spp. was not shown as suspected the local laboratory.

DISCUSSION AND CONCLUSION

According to the recommendations of the Brazilian Health Ministry, water quality intended for human consumption, both surface and underground, must have physical, chemical and biological

Table 1. Analyses on water samples collected in the diarrheal outbreak

Water collection points	Number of samples	Molecular and Microscopic Diagnosis					
		<i>Giardia</i> spp.		<i>Cryptosporidium hominis</i>		<i>Cyclospora cayetanensis</i>	
		Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos
River surface (Untreated)	04	04	0	03	01^a	02	02^b
Backwash (Untreated)	05	04	01^c	03	02^a	04	01^a
Reservoir surface Treated)	04	04	0	04	0	03	01^{a,b}
Home faucets	03	03	0	03	0	03	0
Public faucets from schools and hospitals	07	07	0	07	0	07	0
Fountains/spouts	03	03	0	03	0	03	0
Total	26	25	01^c	23	03^a	22	04^{a,b}

Neg (negative) or Pos (positive) diagnosis performed by molecular ^a, parasitological ^b or direct immunofluorescence methods ^c

Table 2. Analysis on stool samples collected from individuals with symptoms caused during the diarrheal outbreak

Stool samples/ Age group	Number of samples	Molecular and Microscopic Diagnosis					
		<i>Giardia</i> spp.		<i>Cryptosporidium</i> spp.		<i>Cyclospora cayetanensis</i>	
		Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos
0 to 29 years old	21	18	03^c	21	0	19	02^a
30 to 59 years old	20	20	0	20	0	16	04^{a,b}
Up to 60 years old	06	06	0	06	0	06	02^{a,b}
Total	47	44	03^c	47	0	41	08^{a,b}

Neg (negative) or Pos (positive) diagnosis performed by molecular ^a, parasitological ^b or direct immunofluorescence methods ^c

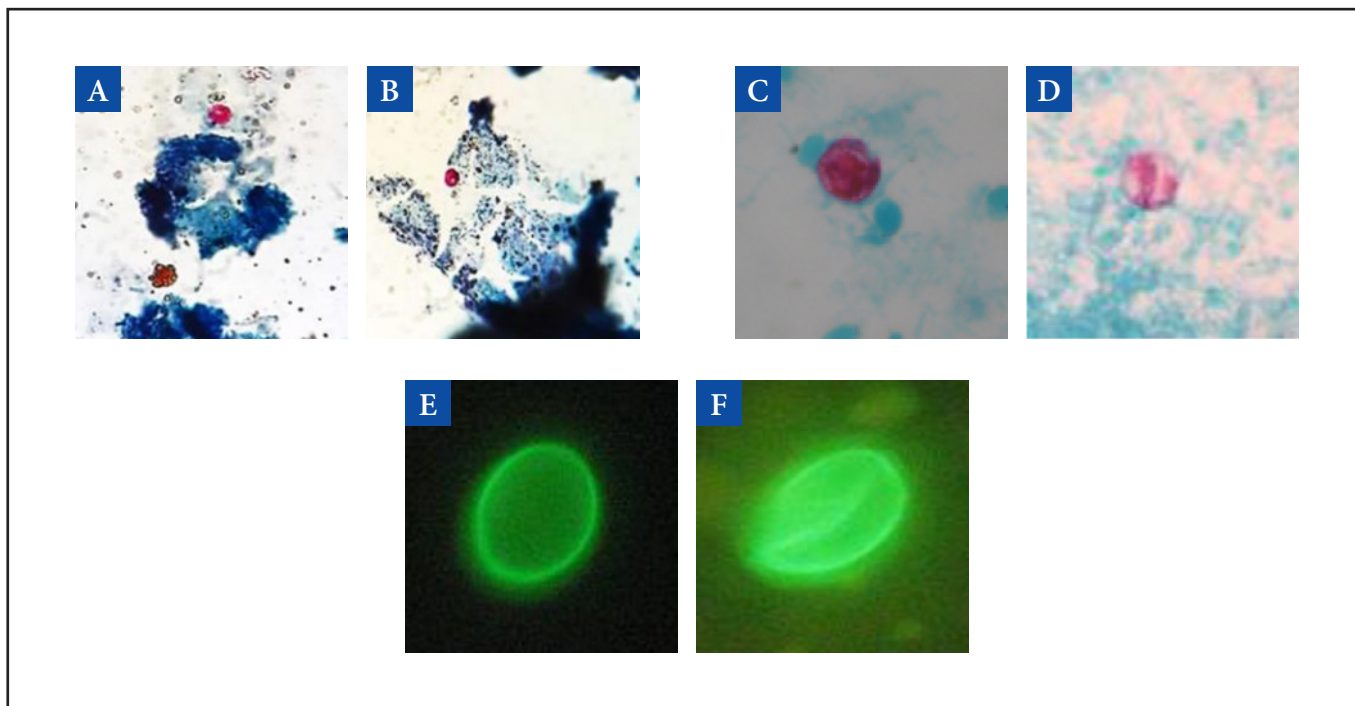


Figure 1. Microscopic images of *Cyclospora cayetanensis* oocysts isolated from water sample (A and B – 400X magnification) and from feces sample (C and D – 1000X magnification), stained with fuchsin (Kinyoun technique); cysts of *Giardia* spp. isolated from feces sample, stained by direct immunofluorescence (E and F – 1200X magnification)

characteristics in accordance with world quality standards²⁰⁻²². When these standards are not respected, serious health problems occur in populations, especially in the transmission of pathogenic protozoa, causing important morbidity and mortality rates²³⁻²⁵. The protozoa analyses in water bring a series of scientific and technological challenges, since the internationally recognized methodologies are highly complex and the matrices are complex^{26,27}. Brazil has one of the largest potential reservoirs of continental water, including surface and groundwater, but, the population growth, disorderly urbanization and industrial development have compromised water resources. Such overloads resulted in deficiencies in the public sanitation system, increasing the risk of waterborne diseases. The transmission of protozoa is favored by high rainfall, flooding and overflowing septic tanks. Such factors are allied to dairy, livestock, swine and poultry production activities, which cause a large waste volume^{28,29}.

These aggravating factors can be seen in the outbreak reported here. Samples collected in the backwash filters presented simultaneously the three researched protozoa denoting a concentration of 30.8% of pathogens during the water filtration process. Out of the stool samples analyzed, 33% contained protozoa^{28,29}.

Regarding the age group of those affected, according to registry data, it ranged from 10 months to 87 years old. The fact that most of the infected people were adults, led us to suspect that the local findings showing *Cryptosporidium* could be confused with *C. cayetanensis*, since this parasite affects a higher age group. Previous studies have also reported clinical cases of diarrhea at older ages, such as, around 13% of foreign adults were infected with *C. cayetanensis* in Indonesia, highlighting the migration capacity of this protozoan³⁰. In Brazil, the first reported outbreak caused by *C. cayetanensis* occurred during 1999 to 2000 in a city with around 10 thousand inhabitants (General Salgado, SP)³¹. At that time, 275 cases were

reported, with 66.6% positivity in the analyzed stool samples. Although water samples of the region were not analyzed, it was suggested that water was the source of contamination, due to the large number of cases and extensive dispersion of affected people. A similar case occurred in Antonina, PR city after identification of *C. cayetanensis* in stool samples. About 600 cases of diarrhea were reported and associated with the consumption of contaminated water, resulting from the distribution pipe rupture in the city. Although the protozoa species was not investigated in water, the evidence suggested contamination by water, due to the expressive number of affected people³². The protozoa detection in water samples is hampered due to the amount of sample collected for analysis, whether sample water is raw or filtered, independent of its turbidity³³⁻³⁵. However, in outbreaks, the monitoring of environmental samples is extremely important for the elucidation of the origin of the contamination and control measures by authorities³⁶.

Cryptosporidium spp., *Giardia* spp. and *C. cayetanensis* are a constant concern for water producers and the food industry, as these parasites are transmitted via the fecal-oral route and are responsible for different outbreaks of gastrointestinal diseases. Normally, these outbreaks are caused by the consumption of contaminated water, treated or not. Different factors contribute to the wide dispersion of these protozoa in the environment. The most important of them is the (oo) cysts resistance, which remains infective in surface water for more than six months at a temperature of 20 °C and after chlorination treatment³⁷.

The first suspect was that causative of this outbreak was *Cryptosporidium* spp., since new and relapses cases appeared. The second suspect was that the outbreak must have occurred through water transmission, since it was dispersed in different municipality neighborhoods, whose water source was common among those people affected. Thus, the water and stool samples of this locality were sent to IAL. Among these samples were included those of backwash water from treatment filters aiming to investigate protozoa that accidentally could have entered through the treatment system and affected the population. Exactly in these backwash products were found, simultaneously, positive samples for *C. cayetanensis*, *C. hominis* and *Giardia* spp., indicating the presence of these pathogens during the process of water treatment. *C. hominis* occurrence in these samples suggests the spring contamination with human waste brought by the sewage. Among samples of treated water and ready for consumption (collected after treatment) only *C. cayetanensis* was detected.

After a suspected outbreak, health authorities of the municipality formed a commission responsible for conducting the investigation. They requested from the “Sanitation Company” a plan to recover the financial damages incurred by the municipality during the outbreak, with the proposal of investments to invest in Health actions in the municipality. The amount may be corresponding to the loss and commitment to making advances in protozoa detection in water. According “Municipal Health Department”, the outbreak caused big financial loss for the municipality, since during the outbreak, 12,223 individuals with diarrhea were treated. On the other hand, a total of 12,189 patients were attended in 2017 and 13,689, in 2018. Thus, during the outbreak, individuals with diarrheal were attended three times more than patients attended in other periods. These financial values for care and treatments could have been applied to the municipal health network in general, where the population ended up being affected directly or indirectly by water contamination. IAL issued reports on all the analyses carried out, including the detailed steps of the methodologies and photomicrographs of the findings with images at different magnifications, also providing the local network of laboratories, reference material containing stained slides for study and comparison.

Finally, the protozoa investigation in water samples by laboratory methodologies is unusual in Brazil. The parasitological analysis includes complementary methodologies, such as staining, molecular analyses, differential diagnosis, adequate training and ability of professionals in order to evidence and differentiate the parasitic forms. In addition, they must distinguish these forms from artifacts and other structures. These factors cause high cost of these methodologies and the difficulties in collecting samples to be analyzed during the outbreak.

The introduction of such methodologies in the network of Public Health Laboratories can favor the quick elucidation of epidemic outbreaks. Thus, rapid actions could be determined to alternative measures of water supply for the population. The elucidation of this epidemic outbreak, showing multiple pathogens in the different matrices analyzed, denotes the importance of a multiple disciplinary approach and the interaction between the laboratories of the network in support of the differential diagnosis.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest.

FUNDING

The authors did not declare.

AUTHORS' CONTRIBUTION

The authors declare that all contributed equally to this work and approved the final version.

ACKNOWLEDGMENT

To Antônio Roberto de Souza for his contributions in the filtration stage of the environmental samples.

REFERÊNCIAS

1. Kirk MD, Pires SM, Black RE, Caipo M, Crump JA, Devleeschauwer B et al. World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 22 Foodborne Bacterial, Protozoal, and Viral Diseases, 2010: A Data Synthesis. *PLoS Med.* 2015;12(12):e1001921.
<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001921>
Erratum in: *PLoS Med.* 2015;12(12):e1001940.
<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001940>
2. Bandsma RHJ, Sadiq K, Bhutta ZA. Persistent diarrhoea: current knowledge and novel concepts. *Paediatr Int Child Health.* 2019;39(1):41-47.
<https://doi.org/10.1080/20469047.2018.1504412>
3. Pires SM, Fischer-Walker CL, Lanata CF, Devleeschauwer B, Hall AJ, Kirk MD et al. Aetiology-specific estimates of the global and regional incidence and mortality of diarrhoeal diseases commonly transmitted through food. *PLoS One.* 2015;10(12):e0142927.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142927>

4. Ramírez-Castillo FY, Loera-Muro A, Jacques M, Garneau P, Avelar-González FJ, Harel J et al. Waterborne pathogens: detection methods and challenges. Pathogens. 2015; 4(2): 307-34.
<https://doi.org/10.3390/pathogens4020307>
5. Behera B, Mirdha BR, Makharia GK, Bhatnagar S, Dattagupta S, Samantaray JC. Parasites in patients with malabsorption syndrome: a clinical study in children and adults. Dig Dis Sci. 2008;53(3):672-9.
<https://doi.org/10.1007/s10620-007-9927-9>
6. Center Control Diseases – CDC. Detecting and Investigating Waterborne Diseases and Outbreaks [Accessed on 2021 Jun 01]. Available from:
<https://www.cdc.gov/healthywater/surveillance/detecting-investigating.html>
7. Semenza, J.C. Cascading risks of waterborne diseases from climate change. Nat Immunol. 2020;21:484-7.
<https://doi.org/10.1038/s41590-020-0631-7>
8. Almeida JC, Martins FD, Ferreira Neto JM, Santos MM, Garcia JL, Navarro IT et al. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in a public water-treatment system, Paraná, Southern Brazil. Rev Bras Parasitol Vet. 2015;24(3):303-8.
<https://doi.org/10.1590/S1984-29612015051>
9. Nyachuba DG. Foodborne illness: is it on the rise? Nutr Rev. 2010;68(5):257-69.
<https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2010.00286.x>
10. Baldursson S, Karanis P. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks – an update 2004-2010. Water Res. 2011;45(20):6603-14.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.10.013>
11. Efstratiou A, Ongerth JE, Karanis P. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks – an update 2011-2016. Water Res. 2017;114:14-22.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.01.036>
12. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Laboratórios de Saúde Pública. Manual de diagnóstico dos agentes oportunistas: parasitos intestinais e *Pneumocystis jirovecii*. Brasília: Ministério da Saúde; 2012. [Accessed on 2021 Jun 01]. Available from:
http://www.ial.sp.gov.br/resources/editorinplace/ial/2016_3_11/manual_oport.pdf
13. Sheather AL. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a floatation technique. J Pathol Therap. 1923;36:266-75.

14. Rigo CR, Franco RM. Comparison between the modified Ziehl-Neelsen and Acid-Fast-Trichrome methods for fecal screening of *Cryptosporidium parvum* and *Isoospora belli*. Rev Soc Bras Med Trop. 2002;35:209-14.
<https://doi.org/10.1590/s0037-86822002000300002>
15. Mahbubani MH, Bej AK, Perlin MH, Schaefer FW 3rd, Jakubowski W, Atlas RM. Differentiation of *Giardia duodenalis* from other *Giardia* spp. by using polymerase chain reaction and gene probes. J Clin Microbiol. 1992;30:74-8.
<https://doi.org/10.1128/jcm.30.1.74-78.1992>
16. Cacciò SM, Ryan U. Molecular epidemiology of giardiasis. Mol Biochem Parasitol. 2008;160(2):75-80.
<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2008.04.006>
17. Marciano MAM. Pesquisa de *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., *Toxoplasma gondii* e *Cyclospora cayetanensis* em água para consumo humano. [tese de doutorado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2019.
18. Jothikumar N, da Silva AJ, Moura I, Qvarnstrom Y, Hill VR. Detection and differentiation of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* by dual TaqMan assays. J Med Microbiol. 2008;57(Pt9):1099-105.
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.2008/001461-0>
19. Murphy HR, Lee S, da Silva AJ. Evaluation of an improved U.S. food and drug administration method for the detection of *Cyclospora cayetanensis* in produce using real-time PCR. J Food Prot. 2017;80(7):1133-44.
<https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-492>
20. Ministério da Saúde (BR). Portaria GM/MS nº 888, de 4 de maio de 2021. Altera o Anexo XX da Portaria de Consolidação GM/MS nº 5, de 28 de setembro de 2017, para dispor sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 07 mai. 2021. Seção 1(85):126-36.
21. Agência Nacional de Águas (BR). Atlas águas: segurança hídrica do abastecimento urbano. Brasília: ANA; 2021. [Accessed on 2021 Jun 01]. Available from:
<https://portal1.snirh.gov.br/ana/apps/storymaps/stories/1d27ae7adb7f4baeb224d5893cc21730>
22. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual Integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2010. [Accessed on 2021 Jun 01]. Available from:
<http://vigilancia.saude.mg.gov.br/index.php/download/manual-integrado-de-vigilancia-prevencao-e-controle-de-doencas-transmitidas-por-alimentos/?wpdmdl=6996>

23. Pandey PK, Kass PH, Soupir ML, Biswas S, Singh VP. Contamination of water resources by pathogenic bacteria. AMB Express. 2014; 4:1-16,e51.
<https://doi.org/10.1186/s13568-014-0051-x>
24. Borja PC. Política pública de saneamento básico: uma análise da recente experiência brasileira. Saúde Soc. 2014;23(2):432-47.
<https://doi.org/10.1590/S0104-12902014000200007>
25. Young I, Smith BA, Fazil A. A systematic review and meta-analysis of the effects of extreme weather events and other weather-related variables on *Cryptosporidium* and *Giardia* in fresh surface waters. J Water Health. 2015;13(1):1-17.
<https://doi.org/10.2166/wh.2014.079>
26. Franco RM, Rocha-Eberhardt R, Cantusio Neto R. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw water from the Atibaia river, Campinas, Brazil. Rev Inst Med Trop S Paulo. 2001;43(2):109-11.
<https://doi.org/10.1590/s0036-46652001000200011>
27. Fayer R, Morgan U, Upton SJ. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. Int J Parasitol. 2000;30(12-13):1305-22.
[https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(00\)00135-1](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(00)00135-1)
28. Franco RMB. Protozoários de veiculação hídrica: relevância em saúde pública. Rev Panam Infectol. 2007;9(4):36-43.
29. Teixeira JC, Oliveira GS, Viali AM, Muniz SS. Study of the impact of deficiencies of sanitation on public health in Brazil from 2001 to 2009. Eng Sanit Ambient. 2014;19(1) 87-96.
<https://doi.org/10.1590/S1413-41522014000100010>
30. Fryauff DJ, Krippner R, Prodjodipuro P, Ewald C, Kawengian S, Pegelow K et al. *Cyclospora cayetanensis* among expatriate and indigenous populations of West Java, Indonesia. Emerg Infect Dis. 1999;5(4):585-8.
<https://doi.org/10.3201/eid0504.990426>
31. Zini RM, Santos CC, Almeida IA, Peresi JT, Marques CC. Atuação do laboratório de Saúde Pública na elucidação do surto de diarreia causado por *Cyclospora cayetanensis* no município de General Salgado, SP. Rev Inst Adolfo Lutz. 2004;63(1):116-21. [Accessed on 2021 Jun 01]. Available from:
<https://periodicos.saude.sp.gov.br/RIAL/article/view/34819>
32. Moura JE, Penaforte C, Kerti R, Daufenbach LZ, Camargo NJ, Trevisan R et al. Surto de doença diarreica aguda por *Cyclospora cayetanensis*, Antonina, Paraná. Bol Eletr Epidemiol. 2002;3:3-5.

33. Atherholt TB, Lechevallier MW, Norton WD, Rosen JS. Effect of rainfall on *Giardia* and Crypto. J Am Water Works Assoc. 1998;90(9):66-80.
<https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.1998.tb08499.x>
34. Fregonesi BM, Sampaio CF, Ragazzi MF, Tonani KA, Segura-Muñoz SI. *Cryptosporidium* e *Giardia*: desafios em águas de abastecimento público. Mundo Saúde. 2012; 36(4):602-9.
35. Meirelles MV. *Cryptosporidium* infection in Brazil: implications for veterinary medicine and public health. Rev Bras Parasitol Vet. 2010;19:197-204.
<https://doi.org/10.1590/s1984-29612010000400002>
36. Júlio C, Sá C, Ferreira I, Martins S, Oleastro M, Angelo H et al. Waterborne transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium* river beaches in Southern Europe (Portugal). J Water Health. 2012;10:484-96.
<https://doi.org/10.2166/wh.2012.030>
37. Kumar T, Abd Majid MA, Onichandran S, Jaturas N, Andiappan H, Salibay CC et al. Presence of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in water samples from Southeast Asia: towards an integrated water detection system. Infect Dis Poverty. 2016;5:3.
<https://doi.org/10.1186/s40249-016-0095-z>



Hospital infection control and occupational medicine services in the face of the COVID-19 pandemic in occupational health

Serviços de controle de infecção hospitalar e de medicina do trabalho no enfrentamento à pandemia de COVID-19 na saúde ocupacional

Angela Aparecida Silva Vieira¹ , Suelaine Antônia de Carvalho¹ , Angela de Souza Floriano² , Gabriela Miranda de Oliveira Castro¹ , Aleida Nazareth Soares^{3,4} , Adelino de Melo Freire Júnior¹ , Amanda Damasceno de Souza^{4*} 

¹ Hospital Felício Rocho, Belo Horizonte, MG, Brazil.

² Hospital Madre Teresa, Belo Horizonte, MG, Brazil.

³ Faculdade Santa Casa BH, Belo Horizonte, MG, Brazil.

⁴ Programa de Pós-Graduação em Sistemas de Informação e Gestão do Conhecimento (PPGSIGC), Universidade FUMEC, Belo Horizonte, MG, Brazil.

* Corresponding author/Autor de correspondência: amanda.dsouza@fumec.br

Received/Recebido: 04.07.2022 - Accepted/Aceito: 05.11.2022

ABSTRACT

In this article, the actions developed by the Hospital Infection Control Service (HICS) and Occupational Medicine (OM) to face the COVID-19 pandemic and track cases of infection among employees of a large hospital in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Training actions, guidelines on how to collect a swab sample, Code 19 (COVID-19) simulation, dressing/undressing, hand hygiene, the definition of flows, and the quantification of cases infected by COVID-19 among employees in care areas were highlighted. The engagement of HICS and OM in the prevention and promotion of health were fundamental to facing the pandemic. It is estimated that SARS-CoV-2 infection rates among staff at the study hospital were similar to those at other hospitals. The experience report is important for expanding knowledge about action planning in the context of a large hospital.

Keywords. COVID-19, Infection Control, Occupational Medicine, Occupational Health.

RESUMO

Neste artigo, são relatadas as ações desenvolvidas pelo Serviço de Controle de Infecção Hospitalar (SCIH) e Medicina do Trabalho (MT) para o enfrentamento da pandemia de COVID-19 e rastreamento dos casos de infecção entre funcionários de um hospital de grande porte de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Destacaram-se as ações de treinamentos, orientações de como coletar amostra de *swab*, simulação Código 19 (COVID-19), paramentação/desparamentação, higiene das mãos, definição de fluxos e quantificação dos casos infectados por COVID-19 entre funcionários de áreas assistenciais. O engajamento do SCIH e da MT na prevenção e promoção da saúde foi fundamental no enfrentamento da pandemia. Estima-se que os índices de infecção pelo SARS-CoV-2 entre os funcionários do hospital em estudo foram similares aos de outros hospitais. O relato de experiência é importante para a ampliação do conhecimento sobre o planejamento de ações no contexto de um hospital de grande porte.

Palavras-chave. COVID-19, Controle de Infecção, Medicina do Trabalho, Saúde do Trabalhador.

INTRODUCTION

With the emergence, in the city of Wuhan, Hubei Province, China, and the subsequent spread of the Coronavirus Disease (COVID-19), caused by SARS-CoV-2, and the declaration of a pandemic by the World Health Organization (WHO) on March 11, 2020, health workers had to prepare to face the disease^{1,2}. Actions were promoted in the hospitals environments to minimize the impacts of the pandemic and continue to provide safe and quality care. Since the first case report in Wuhan, cases have been reported on every continent with the exception of Antarctica. The reported case count underestimates the total number of COVID-19 cases, as only a fraction of acute infections are diagnosed and reported. The main form of transmission is from person to person. To reduce the risk of community spread, it is advised to wear a mask, wash hands diligently, practice respiratory etiquette (e.g., covering the face when coughing), and practice social or physical distancing when avoiding crowds and close contact with sick individuals³.

Worldwide, by the end of January 2022, more than 358 million confirmed cases, 5,617,767 deaths, and 9,850,294,423 vaccinated people had been reported⁴. Brazil registered the first case in Latin America on February 26, 2020: a man who had returned from a trip to Lombardy, Italy⁵. With the proliferation of contamination by COVID-19, Brazil has one of the highest rates of contagion of the disease in the world, even after following the WHO recommendations and scientific evidence published in 2020⁶. However, it is worth noticing that the country has distinct and peculiar characteristics, including the population structure, which is mainly made up of young people and adults. The most prevalent comorbidities in the Brazilian population are diabetes, hypertension, HIV, tuberculosis, and obesity, among others⁷. As of November 23, 2021, Brazil had 22,019,870 new cases and 612,782 deaths due to COVID-19⁸.

Vaccines to prevent SARS-CoV-2 infection are considered the most promising approach to containing the pandemic⁹. The National Health Surveillance Agency (Anvisa) authorized, temporarily, the emergency use of the CoronaVac vaccine (developed by the pharmaceutical company Sinovac in partnership with the Butantan Institute) and Janssen (developed by Johnson & Johnson) and, now with definitive registry, the Covishield vaccine (produced by the pharmaceutical Serum Institute of India, in partnership with AstraZeneca/the University of Oxford/Fiocruz). In February 2021, the Pfizer/BioNTech vaccine received sanitary registration from Anvisa^{10,11}.

According to Souza¹², one of the main problems faced during the pandemic refers to the relevant rate of health workers infected or killed by COVID-19. It is estimated that in countries with the most cases of COVID-19 in 2020, 4% to 12% of confirmed cases of the disease will be among healthcare workers. Factors such as working conditions, qualification, better-structured health systems, policies, programs, and protocols that allowed the exercise of protagonism in patient care, Personal Protective Equipment (PPE) and hygiene measures were essential to face the pandemic. Worldwide, thousands of workers have been infected with COVID-19 or have died from it. Discussing the actions taken by health professionals directly involved in patient care as well as by the sectors involved in organizing working conditions and infection control in the hospital environments crucial in this context¹³.

This study is justified by the need to produce and disseminate knowledge capable of promoting individual health through collective measures against COVID-19. Thus, the experience report has an important role in the consolidation of practices, activities, and scientific knowledge about the work of health professionals in the hospital context, adding knowledge both to the nursing area and to the health area in general.

The objective of the study was to report the actions developed by the Hospital Infection Control Service (HICS) and by Occupational Medicine (OM) to face the COVID-19 pandemic and track cases of infection among employees of a large hospital.

MATERIAL AND METHODS

The study was built based on the actions carried out by the HICS and the OM of a large hospital in Belo Horizonte, showing the experience of health teams from January 2020 to June 2021. The research was approved by the Research Ethics Committee from the Felício Rocho Hospital under the number CAAE: 50447421.0.0000.5125. The sources of information analyzed in the study were: spreadsheets from the TM service of the hospital system, MV-EPR (Magnus and Vandrecic – Electronic Patient Record), and from the indicators' portal with the purpose of tracing the number of employees hired by the regime of the Consolidation of Labor Laws (CLL) in assistance areas diagnosed with COVID-19. The variables analyzed were: sector of activity, position, infected cases and performed tests. Data from the actions taken to face the COVID-19 pandemic by the HICS and OT were collected from minutes, communications, attendance lists in training, manuals/protocols, videos, information from the quality portal, and Excel spreadsheets with infection data by COVID-19 among employees.

The HSIC was responsible for the technical evaluation of the necessary implementations, such as training, PPE, isolation areas, care flows, and notification of suspected and positive cases to public bodies. OM was responsible for evaluating positive cases among CLL employees and clinical staff. Employees and clinical staff who had a suspected case of COVID-19 were instructed to establish isolation and be tested at the institution's Emergency Department. The management of positive cases was conducted by the OM team, which made contact via telephone to apply a questionnaire and identify possible positive cases among the other employees in the sector.

In this research, only employees hired under the CLL regime of the institution were included. Outsourced employees were screened at the institution's entrance gates, and in case they had flu-like symptoms, they had to follow the flow established by their home company and seek medical attention.

RESULTS

Felício Rocho Hospital (FRH) is maintained by the Felice Rosso Foundation, created by Nicola Felice Rosso, an Italian immigrant who, in 1937, by means of a public deed, donated part of his assets to the creation of a foundation with the objective of providing hospitals in Belo Horizonte, Minas Gerais. From the laying of the foundation stone of the hospital building in 1937 until its inauguration in 1952, 15 years of struggles and efforts were passed by its founders, Américo Gasparini and several friends of Nicola Felice Rosso, who died in 1937 without seeing his wish come true, in the construction of the FRH¹⁴. Since its opening, the hospital has had a clinical staff formed by the best and most competent professionals in the city. It became a national reference in several specialties of medicine¹⁵. The 12 specialties offered in 1952 became the current Clinics, Services and Specialties.

The FRH responds to any highly complex clinical and surgical emergencies, fulfilling its mission of "taking care of people seeking quality of life"¹⁶. Currently, it has an extensive clinical staff that works in

more than 35 medical specialties¹⁴. It has 351 beds, distributed in apartments and wards, with 60 beds for adults in the Intensive Care Unit (ICU). During the COVID-19 pandemic, the number of beds dedicated to infected patients varied, over the months, according to demand. On average, 30 ICU beds and 40 ward beds were allocated to patients with COVID-19.

In the face of the COVID-19 pandemic, the HICS and the OM of the FRH has played an important role in staff training and protection, as well as taking actions to ensure patient continuity of care.

Hospital's Service of Infection Control – HICS

The year 2020 was marked by the emergence of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), which required behavioral changes in all aspects of life, society, and no differently, in the corporate environment.

On January 23, 2020, FRH received the first suspected case of COVID-19. A young man who had just arrived from Wuhan with a symptomatic, non-respiratory condition was evaluated and sent home in accordance with the guidelines of the epidemiology team of the Minas Gerais state health department. This was a critical situation since the hospital's senior management and multidisciplinary employees convened the FRH Crisis Committee (CC) to prepare for the new scenario. Given the context, the effective and proactive action of the HICS was essential.

According to the Ordinance No. 1998 from Law No. 9,431 of 1997 of the Ministry of Health, the HICS is in charge of keeping track of the occurrence of infectious adverse events and based on that, establishing epidemiological data that aid in the development of strategies to prevent these events and in the management of clinical cases. The HICS^{17,18} is required to take the following actions, among others:

- a. Management of necessary precautions for patients diagnosed with infectious diseases;
- b. Elaboration and systematic review of protocols for the prevention and treatment of infectious diseases;
- c. Participation in the standardization of medical and hospital materials and products;
- d. Coordination of educational campaigns and training for assistance and support areas;
- e. Systematic dissemination of guidelines in accordance with the updates to the technical notes and legislation.

The HICS team, made up of 7 infectious disease specialists, 4 nurses, 2 nursing technicians, and a clinical pharmacist with strong experience in infection control, collaborated with the hospital's other departments to ensure infection surveillance and management.

Actions carried out by the HICS of the FRH in the face of the COVID-19 pandemic

In view of the worldwide news about COVID-19 and its spread across the continents, the Anvisa guidelines published through the Technical Note GVIMS/GGTES/ANVISA nº 04/2020 on January 30, 2020, and the publications of other municipal health bodies, state and federal, the HICS began its specific actions to face this new and uncertain scenario in the world history. Documents and resolutions were analyzed in order to understand the information available until then and promoted safe care for working professionals and patients treated in the service¹⁹.

Thus, on February 6, 2020, the first of many meetings established between the HICS and sector leaders was held to plan actions linked to the adaptation of physical structures, service flows, availability/

planning for the acquisition of inputs, and dissemination of information for health professionals and clients, among other efforts, instituting the currently CC.

The meetings of the CC group took place periodically and recurrently throughout the year 2020 until June 2021. The meetings, initially in person, began to be held through videoconferencing, with the presentation of epidemiological data related to the institution and discussion of the needs imposed by the new reality in all sectors of the hospital. Subcommittees responsible for specific areas, such as training, standardization, and care protocols, among others, were organized. The CC allowed the necessary definitions to face the pandemic to be carried out in a collaborative and agile way, in addition to facilitating the transmission of information to other employees, doctors, patients, and companions.

Regarding the hospital’s physical layout, it was necessary to modify the spaces so that patients with COVID-19 who were either suspected or confirmed did not share the waiting area, offices, inpatient beds, or any other areas with other patients receiving care there. Assistance to the first suspected cases began in mid-February 2020, with the support of the Center for Strategic Information on Health Surveillance^{20,21}. One of the biggest challenges faced by the service was obtaining total confidence from the care team regarding the use of PPE since, initially, there were several changes, supported by health agencies, in the standardization of these supplies, which possibly aggravated feelings of anguish, anxiety, and insecurity in those professionals involved in the process. In this sense, in order to promote safe care and obtain greater adherence to the protocols established by the HICS, the Training Committee (TC) was created to train professionals according to the activities listed in **Table 1**. This committee had professional support from different sectors and was only active at the beginning of the pandemic. The accounting for training sessions was carried out by signing attendance lists. The trainings were carried out online and also *in loco*, in the assistance and administrative areas.

Table 1. On-site training conducted by HICS

Trainings	Target Audience	Nº of trained professionals
Training related to medical record document	Nurses	21
Guidelines on how to collect a <i>swab</i> sample	Nurses	27
Simulation Code 19 (COVID-19)	Professionals (doctors, residents, speech therapists, physiotherapists, social workers, psychologists)	27
Dressing/undressing and hand hygiene	Nurses	1181
Total		1229

Source: HICS/HFR, 2021

Health professionals were trained in the proper and safe use of PPE during the care of suspected and/or confirmed cases of SARS-CoV-2 infection, mask sealing tests, dressing and undressing, in addition to respiratory etiquette, hands hygiene, nasal and oropharynx swab collection, and environmental hygiene (**Table 1**). Actions were taken to ensure the supply of PPE in the institution such as *in-house* production

of masks and coats, purchases in large quantities, and optimization of proper use in relation to protocols and training. Due to these contingency actions carried out by the HICS, there was no lack of input in the institution to face the pandemic.

Reinforcing on-site training, educational and informative videos were released in the assistance sectors for patients with COVID-19 and announcements of standardization were instituted according to Anvisa's guidelines. Regarding the patient care routine, the care team was outfitted with a coat, a N95 mask, a pair of gloves, and a face shield; and the care was segmented into isolated areas within the Emergency Room (ER), inpatient unit and ICUs. Exclusive nursing professionals were dedicated to the areas of COVID-19 in the institution. The medical team, with exclusive professionals for COVID-19, was reserved for the ER and ICU only. In the COVID-19 inpatient units, medical staff was not exclusive.

In relation to **Table 1**, approximately 1256 employees and clinical staff were trained *in loco* in 2020. **Table 2** describes when the actions were created and implemented with the CC to face the COVID-19 pandemic. These actions continued to be applied throughout the pandemic.

Table 2. Actions taken by SCIH together with the Crisis Committee to face the COVID-19 pandemic in 2020

Month	Action
February	Definition of care flow and clinical management of COVID-19 cases
February	Definition of exclusive physical areas for the management of patients with suspected or confirmed COVID-19
February	Uptade on the flow of care in accordance with countries that have defined whether a case is suspected or confirmed, according to OMS.
March	Suspension of face-to-face meetings in favor of virtual meetings
March	Setting up standards and procedures for collecting examinations from employees suspected of having COVID-19.
March	Preparation and distribution a recommendation pamphlet for patients and companions in the event of a COVID-19 hospitalization.
March	Preparation and dissemination of posters with guidelines on the correct use of PPE according to each professional category
March	Expansion of the hygiene professional personnel to maximize environmental cleaning
March	Professionals were limited during the linical rounds
March	Suspension of appointments, exams and elective procedures
March	Limitation of the flow of professionals in areas intended for patients with COVID-19
March	Limitation and suspension of visits
March	Mandatory use of mask for companions
March	Screening of signs and symptoms at the ordinances
March	Definition of a cleaning routine for the environments dedicated to the care of a suspected or confirmed case of COVID-19

Continues on the next page

Continuation

Month	Action
March	Installation of additional gel alcohol dispenser points on hospital premises
March	Flow definition for handling the bodies of patients with suspected or confirmed COVID-19
April	Temporary suspension of interns and professionals from the risk group
April	Definition and guidance on the use of N95 masks for all professionals who provided direct patient care
April	Definition and guidance on the use of fabric masks for all professionals who did not provide direct patient care
April	Definition of routines for transporting patients with COVID-19 and for the use of elevators
April	Readjustment of the physical structure and logistics of care for non-COVID-19 patients
May	Return of interns to face-to-face work and gradual return to elective care
June	Elaboration of institutional video on dressing and undressing in COVID-19 areas
July	Implementation of the self-declaration practice by professionals about the absence of COVID-19 symptoms

Source: HICS/HFR (2021)

Note: The first internal message concerning COVID was sent on January 28, 2020

The Occupational Medicine service (OM)

OM works specifically to promote and preserve workers' health by preventing work-related accidents and is part of the Specialized Services in Safety Engineering (SSSE) and Occupational Medicine. It is up to the occupational physician to assess and detect adverse conditions in the workplace, or their absence. OM is the result of humanizing work process. The specialty appears as a branch of Labor Law, whose concern is to offer more dignified working conditions for workers and, with that, guarantee their health and physical and psychological integrity. Therefore, the objective of OM in the first place is to prevent accidents and occupational diseases. On the other hand, it also assumes a commitment to life quality and maintenance of workers' health so that the routine activities of these professionals do not represent any type of damage to their mental and physical health. The FRH OM team was composed of 2 occupational physicians, 1 nurse, 2 nursing technicians, and 3 nursing students.

Occupational Medicine interventions at Felício Rocho Hospital in response to the COVID-19 pandemic

On March 26, 2020, the first case of COVID-19 infection among hospital employees was registered at the OM service. Since then, a routine of continuous monitoring of all symptomatic and asymptomatic collaborators who are considered risk contacts in a confirmed case has been implemented. Conducts were defined for employees with suspected or confirmed COVID-19, as well as guidelines for the evaluation and diagnosis of COVID-19 in employees with HICS support. The conducts relate to:

- 1) Medical Certificate – MCT; certificate of a suspected or confirmed case must be forwarded to the MT service. The confirmed case must respect the isolation and validity of the certificate;
- 2) Declaration of cohabitation: required only for employees who have a family member who is suspected or detected to have COVID-19, according to Ordinance No. 454 of March 20, 2020, and Joint Ordinance No. 20 of June 18, 2020.
- 3) Diagnostic method: a laboratory test used in the institution for confirmation of diagnosis; during the critical period, 2020-2021, it was only RT-PCR (Reverse Transcription followed by Real-Time Polymerase Chain Reaction). All employees with a suspected case of COVID-19, that is, with the presence of influenza syndrome, performed the RT-PCR test; results were confirmed within 24 hours. In late 2021, OM began to receive other types of tests for COVID-19;
- 4) Symptomatic employees: symptomatic employees were those who had any flu-like symptoms defined by the HICS medical committee (fever, headache, dry cough, tiredness, sore throat, diarrhea, loss of taste or smell, or difficulty breathing), and should be referred immediately to the FRH's COVID-19 ER or reference emergency care unit for medical care;
 - 4.1) Collaborator with a DETECTED test result: stipulated maximum time for contact with the OM team;
 - 4.2) Employee with an UNDETECTED test result: in the case of a current medical certificate, the employee will be reassessed by the OM service.
- 5) Asymptomatic employees with home contact: two strategies were defined:
 - 5.1) Cohabitation with a DETECTED test result: elaboration and implementation of an internal protocol that establishes the flow and determines the guidelines for the removal of employees due to home contact, suspicion, or confirmation of COVID-19. The systemic document was published on the MV Quality system and disseminated through the internal communication channel (intranet), making it available to all employees.

A team of nurses and nursing technicians was mobilized in a reserved room to monitor test results in real time.

All employees with medical certificates and a diagnosis related to suspected contamination by COVID-19 had their data recorded in a follow-up worksheet entitled COVID-19 ATTESTS, shared among the OM team, in order to facilitate the monitoring of detected cases, ensure isolation, and avoid contamination of other employees. All employees with a test result for COVID-19 were contacted within a maximum period of 24 hours to answer a questionnaire, whose most important points were: contacts at risk of transmission in the 48 hours prior to the onset of symptoms, use or not of the protective measures in the period; date of onset of symptoms; and date of the last day worked.

When identifying contacts at risk of transmission, all were contacted within 24 hours, oriented, and removed (if necessary) after classification of the risk of contamination. Employees had a team of psychologists (with the presence of the occupational psychologist) in order to welcome and take care of the mental health of interested employees.
 - 5.2) Cohabitant with UNDETECTED test: for employees with undetected RT-PCR test results for COVID-19, with current medical certificate, an occupational medical assessment is carried out to verify the possibility of early return of the employee in order to reduce the impacts in patient care.

In 2020, a total of 2617 RT-PCR tests were performed, with 2,096 having undetected results and 521 having detected results for COVID-19. In 2021, until June, 1,567 RT-PCR tests were performed, 1,118 with undetected results, and 391 with detected results for COVID-19. OM's actions were daily and *in loco*; the training videos were broadcast on the institution's monitors uninterruptedly. The OM team carried out daily inspections of the prevention measures, but there was no record of the quantification of these actions. Thus, there was continuity in the sending of communications through the institution's communication channels throughout the COVID-19 pandemic.

Weekly meetings were held with managers to present the numbers of employees on leave due to COVID-19, with an alert for precautions and the established flow.

OM produced an institutional video, with the presence of employees, warning about preventive measures against COVID-19. The OM team released guidelines on preventive measures to be adopted in all sectors of the institution. In addition, with the support of general management, customer relationship management, and nursing management, the vaccination campaign against COVID-19 was carried out from January 20 to February 26, 2021, which involved employees, physicians, and collaborators, resulting in the vaccination of 3,600 people.

Quantitative breakdown of COVID-19 infections among hospital staff who work in the support sectors

Right at the beginning of the pandemic, actions were taken to contain COVID-19 and a greater number of these actions were observed in March 2020 (Figure 1).

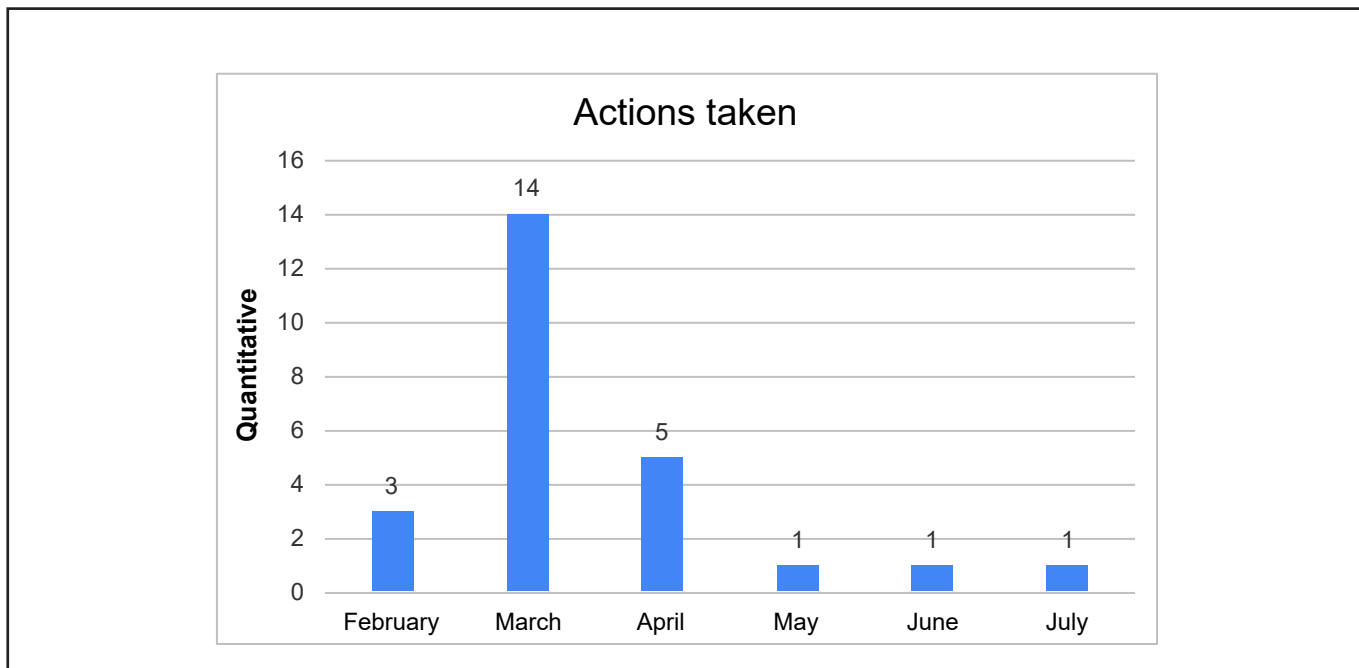


Figure 1. Number of actions carried out by the HICS in 2020
Source: Research data (2021)

During the study period, 403 employees were infected. The distribution of infected people by sector according to the number of employees is shown in Table 3. The percentage of infected people ranged from

21% to 34%, with the lowest percentage in the clinical analysis laboratory and the highest in medicine, diagnostic imaging, and the inpatient unit.

Evaluating the evolution of the number of infected, it is observed that peaks occurred in June and July 2020 and in December 2020 and January 2021. (Figure 2).

Table 3. Relationship between the number of infected people per sector and the number of employees

Sector	Infected (n)	Employees (mean)	%
Medicine and Diagnostic Imaging	46	135	34%
General Intensive Care Center	83	273	30%
Hospitality	65	223	29%
General emergency care	37	130	28%
Clinical Laboratory	14	66	21%
Pediatric emergency room	8	24	33%
Inpatient unit	150	442	34%

Note: Data analyzed only among employees admitted according to the CLL system (Consolidated Labor Laws)

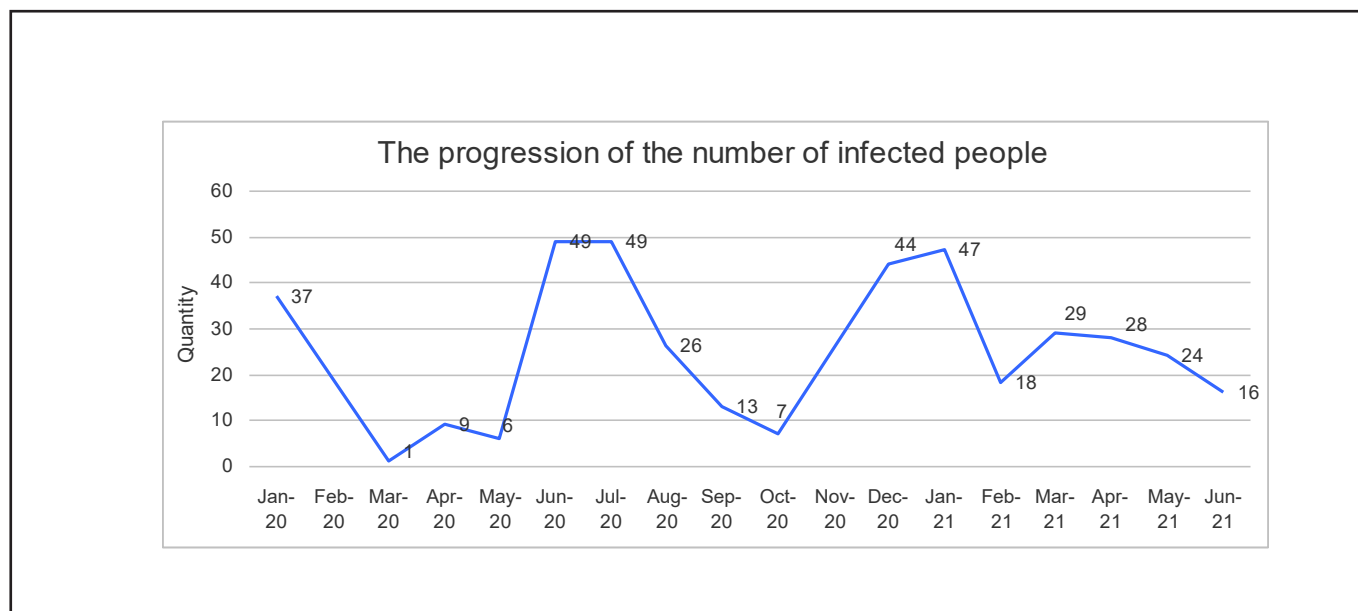


Figure 2. Evolution of the number of infected people during the research period
Source: Research data (2021)

DISCUSSION

The performance of the HICS in the context of COVID-19 contributed in several aspects to the sedimentation of the objectives of the service and also brought lessons that were assimilated and instituted as work practices. Creating collaborative and interdisciplinary work processes was an

extremely useful learning experience. This understanding has been disseminated in other actions of the service, such as meetings, audits, and validation of flows. Another important aspect was the involvement of senior management and the engagement of professionals from the most diverse areas, which promoted a work structure based on roles and responsibilities, leading to the achievement of objectives. OM's performance in the context of COVID-19 reaffirms the importance of working with prevention and health promotion with all health workers at the FRH, following the recommendations and care established by the bodies responsible for establishing guidelines in the face of the pandemic, such as the Ministry of Health and the WHO. SARS-CoV-2 infection rates among FRH staff were comparable to infection rates among healthcare professionals²². There were no deaths caused by COVID-19 among hospital staff. Four of the infected individuals required intubation and admission to the ICU. All these patients recovered.

According to the Ministry of Health, in Brazil, until June 28, 2021, 443,962 cases of influenza-like syndrome suspected of COVID-19 in health professionals were reported in the e-SUS, among which 120,240 (27.1 %) were confirmed. Among the health professions with the highest number of confirmed cases of COVID-19, nursing technicians/assistants (35,587; 29.6%), nurses (20,217; 16.8%), physicians (12,745; 10.6%), community health agents (6,353; 5.3%) and pharmacists (6,339; 5.3%)²². After June 2021, the actions of HICS and OM continued to be carried out at the institution. The number of severe cases among employees and clinical staff was different in the period before and after vaccination. There were only three significant instances among the employees, and there were no reports of major cases following immunization.

The FRH provided care to patients with COVID-19 cases in the emergency room and also received transfers from several cities in Minas Gerais. All patients with clinical suspicion for COVID-19 were tested and kept isolated until the diagnosis was confirmed. Thus, the actions of HICS and OM were important for the protection of both patients and staff. All COVID-19 frontline personnel were equipped and trained to assist both in a safe and effective manner.

CONCLUSION

The current study is significant in terms of extending information regarding preparing in the case of a pandemic like COVID-19 in the setting of a big hospital. Reporting on information and experiences acquired is critical for the creation of strategies to prevent COVID-19 contamination of staff in HFR and other institutions. For the nursing community, the report describes the important role played by the HICS and MT teams in facing the COVID-19 pandemic, which reinvented itself to provide better care to patients.

The HICS and the OM have competent staff who are willing to help, which has led in the establishment of various pandemic-fighting initiatives. Contamination rates among employees of healthcare areas in the HFR were low due to the actions implemented by HICS and OM that positively influenced the avoidance of contamination by COVID-19 in this hospital.

Among the lessons learnt, the need of communal learning in confronting the difficulties posed by the pandemic shines out in a situation of enormous uncertainty, fear, and grief. Positive legacy competencies include resilience, flexibility, empathy, and transdisciplinary performance.

The epidemic enforced the necessity for physical distancing as a safety measure, which is now advocated globally; ironically, we are experiencing a unique synergy and harmony, maybe as a result of meditation on the significance of communal building.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest.

FUNDING

The authors did not declare.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors did not declare.

AUTHORS' CONTRIBUTION

Design and planning, analysis and interpretation of data; drafting and critical review of the content: Angela Aparecida Silva Vieira, Suelaine Antônia de Carvalho, Angela de Souza Floriano, Gabriela Miranda de Oliveira Castro e Amanda Damasceno de Souza. Design, analysis and interpretation of data; critical review of content: Aleida Nazareth Soares. Design and critical review of content: Adelino de Melo Freire Júnior. All authors read and approved the final version of the manuscript.

REFERENCES

1. Wei XS, Wang XR, Zhang JC, Yang WB, Ma WL, Yang BH et al. A cluster of health care workers with COVID-19 pneumonia caused by SARS-CoV-2. *J Microbiol Immunol Infect*. 2021;54(1):54-60.
<https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.04.013>
2. McMichael TM, Currie DW, Clark S, Pogosjans S, Kay M, Schwartz NG et al. Public Health – Seattle and King County, Evergreen Health, and CDC COVID-19 Investigation Team. Epidemiology of Covid-19 in a Long-Term Care Facility in King County, Washington. *N Engl J Med*. 2020;382(21):2005-11.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa2005412>
3. Mcintosh K. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): Clinical features. [Internet]. UpToDate. Philadelphia: Wolters Kluwer Health;c2020. [Accessed on 2020 Nov 16]. Available from:
<https://www.uptodate.com/contents/coronavirus-disease-2019-covid-19-clinical-features>
4. Johns Hopkins University & Medicine. The Johns Hopkins Coronavirus Resource Center (CRC). COVID-19 Dashboard by the Center for Systems Science and Engineering (CSSE) at Johns Hopkins University (JHU). [Internet]. Baltimore, MD: JHU; c2021. [Accessed on 2022 Jan 26]. Available from:
<https://coronavirus.jhu.edu/map.html>

5. Aquino EML, Silveira IH, Pescarini JM, Aquino R, Souza-Filho JA, Rocha AS et al. Social distancing measures to control the COVID-19 pandemic: potential impacts and challenges in Brazil. *Cien Saude Colet*. 2020;25(suppl 1):2423-46.
<https://doi.org/10.1590/1413-81232020256.1.10502020>
6. Candido DS, Claro IM, de Jesus JG, Souza WM, Moreira FRR, Dellicour S et al. Evolution and epidemic spread of SARS-CoV-2 in Brazil. *Science*. 2020;369(6508):1255-60.
<https://doi.org/10.1126/science.abd2161>
7. Croda J, Oliveira WK, Frutuoso RL, Mandetta LH, Baia-da-Silva DC, Brito-Sousa JD et al. COVID-19 in Brazil: advantages of a socialized unified health system and preparation to contain cases. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2020;53:e20200167.
<https://doi.org/10.1590/0037-8682-0167-2020>
8. Ministério da Saúde (BR). COVID19: Painel Coronavírus. Atualizado em: 22/11/2021 19:50. [Internet]. Brasília, DF: MS; 2021. [Accessed on 2021 Nov 16]. Available from:
<https://covid.saude.gov.br/>
9. Mcintosh K. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): Epidemiology, virology, and prevention. [Internet]. UpToDate. Philadelphia: Wolters Kluwer Health; c2020. [Accessed on 2021 Nov 16]. Available from:
<https://www.uptodate.com/contents/coronavirus-disease-2019-covid-19-epidemiology-virology-and-prevention>
10. Souza AD, Fernandes MR, Freire Junior AM. Atuação do Bibliotecário Clínico em tempos de pandemia da COVID-19. *Rev. Bras Bibl Doc*. 2021;17:1-20. Available from:
<http://hdl.handle.net/20.500.11959/brapci/158420>
11. Ministério da Saúde (BR). Sistema Único de Saúde. Vacinação. [Internet]. Brasília: MS; 2022. [Accessed on 2022 Nov 05]. Available from:
<https://www.gov.br/saude/pt-br/coronavirus/vacinas/plano-nacional-de-operacionalizacao-da-vacina-contra-a-covid-19>
12. Souza DO. A saúde dos trabalhadores e a pandemia de COVID-19: da revisão à crítica. *Vigil Sanit Debate*. 2020;8(3):125-31.
<https://doi.org/10.22239/2317-269X.01627>
13. Jackson Filho JM, Assunção AA, Algranti E, Garcia EG, Saito CA, Maeno M. A saúde do trabalhador e o enfrentamento da COVID-19. *Rev Bras Saúde Ocup*. 2020;45:e14.
<https://doi.org/10.1590/2317-6369ED0000120>

14. Resende MÂF, Martins LL, Gouveia MLC. Memorial: Fundação Felice Rosso: 75 anos de Benemerência, 60 anos de Medicina. Belo Horizonte: Logos; 2012. 323p.
15. Souza AD. A Biblioteca do Centro de Estudos do Hospital Felício Rocho: um olhar para a atuação do bibliotecário clínico. Ci Inf Rev. 2020;7(3):134-52.
<https://doi.org/10.28998/cirev.2020v7n3h>
16. Hospital Felício Rocho. Quem somos. [Internet]. Belo Horizonte; 2022. [Accessed on 2022 Fev 25]. Available from:
<https://www.feliciorocho.org.br/>
17. Ministério da Saúde (BR). Portaria nº 2616, de 12 de maio de 1998. Programa de Controle de Infecção Hospitalar. [Internet]. [Accessed on 2021 Nov 04]. Available from:
https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/1998/prt2616_12_05_1998.html
18. Presidência da República (BR). Lei nº 9.431, de 6 de janeiro de 1997. Dispõe sobre a obrigatoriedade da manutenção de programa de controle de infecções hospitalares pelos hospitais do País. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]. Brasília, DF, 07 jan 1997. Seção 1(266):1.
19. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Nota Técnica GVIMS/GGTES/ANVISA nº 04/2020. Orientações para serviços de saúde: medidas de prevenção e controle que devem ser adotadas durante a assistência aos casos suspeitos ou confirmados de infecção pelo novo coronavírus (SARS-CoV-2). Brasília; 2021. [Accessed on 2021 Nov 04] Available from:
https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/notas-tecnicas/nota-tecnica-gvims_ggtes_anvisa-04_2020-25-02-para-o-site.pdf
20. Superintendência de Vigilância Epidemiológica. Subsecretaria de Vigilância em Saúde. Portal da Vigilância em Saúde. Belo Horizonte: SES; 2021. [Accessed on 2021 Nov 25]. Available from:
<http://vigilancia.saude.mg.gov.br/>
21. Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais (MG). Home Page. Belo Horizonte: SES; 2021. [Accessed on 2021 Nov 25]. Available from:
<https://www.saude.mg.gov.br/>
22. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Doença pelo Novo Coronavírus – COVID-19 Boletim Epidemiológico Especial; 2021:69. [Accessed on 2021 Nov 25]. Available from:
https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/covid-19/2021/69_boletim_epidemiologico_covid_2junho.pdf





Desafios e soluções na gestão do Núcleo de Inovação Tecnológica do Instituto Adolfo Lutz (NIT-IAL)

Challenges and solutions in the management in the Technological Innovation Center of the Adolfo Lutz Institute, NIT-IAL

Eloane Cristina de Paiva Silva^{1*}, Denise Hage Russo² 

¹ Assistência da Diretoria Geral do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil.

² Laboratório de Biologia Molecular e Imunoensaio em Alimentos, Centro de Alimentos, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil.

*Autor de correspondência/Corresponding author: eloane.paiva@ial.sp.gov.br

Recebido/Received: 22.12.2021 - Aceito/Accepted: 08.06.2022

RESUMO

O Núcleo de Inovação Tecnológica do Instituto Adolfo Lutz (NIT-IAL), foi criado em dezembro de 2013 com o objetivo de estimular a inovação dentro do instituto, bem como administrar a propriedade intelectual gerada na instituição e providenciar meios para promover a transferência de conhecimento científico, tecnológico e cultural ao setor produtivo público e privado. Após o mapeamento das áreas técnicas, foram identificados obstáculos não previstos na Lei de Inovação, os quais o NIT-IAL conseguiu superar, permitindo parcerias técnico-científicas com instituições públicas e privadas, e gerenciamento dos recursos financeiros.

Palavras chaves. Inovação Tecnológica, Parcerias Público-Privadas, Legislação em Ciência e Tecnologia, Gestão de Ciência, Tecnologia e Inovação em Saúde.

ABSTRACT

The Technological Innovation Center of the Adolfo Lutz Institute (NIT-IAL) was created in December 2013 with the objective of stimulating innovation within the IAL, as well as managing the intellectual property generated at the institute and providing means to promote the transfer of scientific, technological and cultural knowledge to the public and private productive sector. After mapping the technical areas, situations not covered by the Innovation Law were identified. The NIT-IAL managed to overcome these challenges and allowing technical-scientific partnerships with public and private institutions and financial resources management.

Keywords. Technological Innovation, Public-Private Sector Partnerships, Science and Technology Legislation, Health Sciences, Technology, and Innovation Management.

Este texto visa mostrar a necessidade e a importância dos Núcleos de Inovação Tecnológica (NITs) de instituições de administração direta e de sua atuação conjunta com a Consultoria Jurídica da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (SES-SP), na busca de soluções para situações conflitantes que possam impedir a evolução das parcerias geradoras de projetos inovadores em Saúde Pública.

Com a Lei nº 10.973 (Lei de Inovação)¹, promulgada em 2004, foi criado, nas Instituições Científicas e Tecnológicas (ICTs), o Núcleo de Inovação Tecnológica (NIT), próprio ou em associação com outra ICT, com a responsabilidade de gerir sua política de inovação. Além disso, o Decreto nº 56.569, de 22 de dezembro de 2010², criou o NIT em cada um dos 21 institutos de pesquisa integrantes da administração direta do Estado de São Paulo. Sete destes institutos encontram-se no âmbito da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, entre os quais, o Instituto Adolfo Lutz (IAL).

O NIT tem como uma de suas atribuições, a gestão da política de inovação institucional. Assim, com base na missão e respeitando a legislação vigente, foi criado, em dezembro de 2013, pela Portaria nº 23, de 6 de dezembro de 2013³, o Núcleo de Inovação Tecnológica do Instituto Adolfo Lutz (NIT-IAL), já reestruturado pelas Portarias nº 17, de 8 de julho de 2015⁴, e nº 3, de 20 de abril de 2021⁵.

O NIT-IAL, ao ser instituído, tinha como principais objetivos estimular a inovação dentro do IAL, bem como administrar a propriedade intelectual gerada no instituto e providenciar meios para promover a transferência de conhecimento científico, tecnológico e cultural ao setor produtivo público e privado. Esses objetivos estavam e estão de acordo com as leis estadual e federal que têm como motivação tornar a inovação tecnológica um componente estratégico de economia e desenvolvimento, a fim de promover equidade entre as camadas sociais. O NIT-IAL foi estruturado para orientar e oferecer suporte aos profissionais desta instituição, do desenvolvimento do projeto à busca de parceiros, transferência e licenciamento de tecnologia e formalização de contratos, visando a concretização de projetos com potencial inovador e sempre em prol da saúde pública. Além disso, o NIT-IAL planejou: (i) interagir e colaborar com a estrutura da Coordenadoria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos de Saúde (CCTIES) da SES-SP; (ii) dar suporte à Coordenadoria de Controle de Doenças da SES-SP e aos respectivos Centros de Vigilância Epidemiológica e Sanitária; e (iii) promover maior interação entre essas instâncias, estabelecendo processos cooperativos que envolvam outros agentes do Estado e da Federação, em especial do setor produtivo.

Coral et al⁶ definem a inovação como: “um processo que perpassa toda a organização e, por isso, a integração e o trabalho conjunto de áreas distintas são fundamentais para o sucesso de um sistema de gestão voltado ao desenvolvimento de novos desenvolvimentos. Portanto, o primeiro passo para implementar um processo de gestão da inovação na empresa é estabelecer uma estrutura organizacional adequada. Para tal, é importante que a empresa tenha claro quais são as principais variáveis que afetam seu potencial inovador.”

Acrescentando que a inovação em instituições de serviço público pode ser tratada, segundo Emmendoerfer⁷, como “uma ideia (nova, melhorada ou renovada) e sistematizada para o contexto de sua aplicação, com o intuito de solucionar um problema de interesse público, cujo protagonismo é exercido, pelo menos inicialmente, por pessoas que demonstram comportamentos empreendedores na administração pública”. Assim, considerando que o IAL atua em áreas heterogêneas voltadas ao atendimento das demandas das vigilâncias epidemiológicas, sanitárias e ambientais, era imperativo que o NIT-IAL conhecesse todas as áreas e linhas de pesquisa. Portanto, era necessário um mapeamento detalhado da instituição. Para isso, foram planejadas visitas técnicas com o objetivo principal de identificar projetos, produtos, processos e perfil profissional inovadores para a reestruturação do portfólio de tecnologias do IAL e possível integração

de novos membros ao NIT-IAL. Além disso, o processo de disseminação da cultura de inovação no instituto foi iniciado com esclarecimentos de conceitos e dúvidas que envolviam e envolvem o processo de inovação tecnológica e transferência de tecnologia. No período de agosto a dezembro de 2015, foram visitados: os dez Centros Técnicos do IAL Central: Alimentos, Bacteriologia, Contaminantes, Imunologia, Interdisciplinares, Material de Referência, Medicamentos, Parasitologia, Patologia, Virologia; os doze Centros de Laboratórios Regionais (CLRs): Araçatuba, Bauru, Campinas, Marília, Presidente Prudente, Ribeirão Preto, Rio Claro, Santo André, Santos, São José do Rio Preto, Sorocaba, Taubaté; além do Museu do IAL (MUSIAL).

A dinâmica da visita foi estabelecida em quatro etapas: reunião com a diretoria dos Centros Técnicos e dos CLRs; reunião geral com todo o corpo funcional, independentemente de cargo e/ou função; visita aos laboratórios; e reuniões individuais com potenciais inovadores, que proporcionaram ao NIT-IAL adotar quatro pontos determinantes para a implantação da cultura de inovação:

1. Identificar o conhecimento necessário para o mapeamento das tecnologias produzidas e do potencial de inovação dos Centros Técnicos do IAL Central e dos CLRs;
2. Identificar profissionais com perfil empreendedor/inovador;
3. Estabelecer relação de confiança com diretores e funcionários (inventores em potencial) dos CLRs, o que contribuiu de maneira substancial no processo de inovação tecnológica e transferência de tecnologia no IAL;
4. Identificar e solucionar entraves administrativos e jurídicos que impediam a aplicação de contratos e parcerias com empresas privadas e universidades.

O NIT-IAL deu início a treinamentos e cursos visando implementar a cultura de inovação já instalada entre os profissionais da instituição. Foram realizados então o I Workshop de Inovação Tecnológica do Instituto Adolfo Lutz e, periodicamente, Seminários em Ciência, Tecnologia e Inovação do IAL, abertos a todos os seus profissionais. Esses eventos promoveram ainda mais a conscientização institucional da viabilidade legal de promover parcerias técnico-científicas e repasse de tecnologias e conhecimentos, obtendo reconhecimento da comunidade científica brasileira e internacional, além de ganhos financeiros com a possibilidade de registro de patentes.

O NIT-IAL alcançou seu objetivo e promoveu a ascensão do IAL junto à Secretaria de Estado da Saúde como uma de suas instituições com maior amadurecimento em relação às ações de inovação, o que permitiu que o IAL fosse convidado a participar do projeto *SP-UK: São Paulo Open Innovation in Health*. Esse projeto, fruto da cooperação entre o Governo do Estado de São Paulo e o Governo do Reino Unido, teve o objetivo de acelerar a incorporação de resultados de pesquisa científica a produtos e serviços que pudessem contribuir para a melhoria da saúde da população e resultou no Guia de Inovação Aberta. Essa parceria, adotando a tendência da Inovação Aberta, permitiria aos institutos de pesquisa da SES-SP ampliar possibilidades de internacionalização e estabelecer outras parcerias, o que contribuiu para a troca de conhecimento, novas perspectivas de desenvolvimento e a possibilidade de promover negócios⁸.

O Programa de Aceleração foi idealizado a partir da necessidade de desenvolver e testar um modelo que pudesse ser replicado a todos os grupos de pesquisa do IAL e a outros institutos de pesquisa do Estado de São Paulo, ou seja, para possibilitar que grupos de pesquisadores do IAL pudessem trabalhar de forma mais aberta, realizando parcerias e interações com diferentes setores da sociedade para acelerar tanto a transferência de tecnologias para empresas e outras instituições, quanto a sua utilização por elas, assim como a apropriação dos resultados das pesquisas pela sociedade. Dessa forma, foram selecionados grupos

de pesquisadores do IAL que apresentavam nível de maturidade avançado e que haviam desenvolvido tecnologias alinhadas aos objetivos estratégicos do instituto.

As parcerias começaram a acontecer entre o IAL e empresas privadas, e o NIT-IAL deparou-se com o principal entrave frequentemente citado nas visitas técnicas, reuniões e seminários: o gerenciamento de verbas, patrocínios e financiamentos que seriam gerados com parcerias e contratos.

O NIT-IAL realizou, então, um estudo crítico sobre a legislação vigente e percebeu que teria dificuldade de promover parcerias entre o pesquisador mentor e responsável pelo projeto de pesquisa, e empresas privadas e patrocinadoras, pois legalmente não seria possível o gerenciamento e a utilização dos recursos financeiros, uma vez que seriam creditados no Fundo Especial de Despesa do Instituto Adolfo Lutz (FEDIAL), e não em conta específica em nome do pesquisador coordenador do projeto.

As contas do FEDIAL têm por finalidade vincular determinadas receitas às unidades de despesa definidas nos Sistemas de Administração Financeira e Orçamentária, da Administração Centralizada ou Direta; e são consideradas como contas gráficas, de caráter financeiro, vinculadas às unidades de despesa, conforme Decreto-Lei Complementar nº 16, de 2 de abril de 1970⁹.

Apesar de a Emenda Constitucional nº 85, de 26 de fevereiro de 2015¹⁰, ter adicionado dispositivos na Constituição Federal atualizando o tratamento das atividades de ciência, tecnologia e inovação; de a Lei nº 13.243, de 11 de janeiro de 2016¹¹, ter aprimorado as medidas de incentivo à inovação e à pesquisa científica e tecnológica; e de o Novo Marco Legal ter alterado nove leis (Lei de Inovação, Lei das Fundações de Apoio, Lei de Licitações, Regime Diferenciado de Contratações Públicas, Lei do Magistério Federal, Lei do Estrangeiro, Lei de Importações de Bens para Pesquisa, Lei de Isenções de Importações e Lei das Contratações Temporárias), esse entrave persistia. Ou seja, os recursos creditados na conta FEDIAL-IAL ficam disponíveis para uso da instituição como um todo, não ficando, portanto, integralmente à disposição do pesquisador-coordenador do projeto de pesquisa ou do NIT-IAL para gerenciamento da sua utilização.

Após consulta à Consultoria Jurídica da Secretaria de Estado da Saúde s.m.j. (salvo melhor juízo) em junho de 2017, o NIT-IAL foi orientado a buscar informações junto à Secretaria da Fazenda sobre a possibilidade de abertura de conta corrente específica para gerenciar recursos provenientes de projetos de parceria com empresas.

A criação da Fonte de Recursos no Fundo Especial de Despesas teve seu início em consequência das ações realizadas entre o NIT-IAL, a Assistência da Diretoria-Geral e o Centro de Orçamento e Finanças-IAL e, em 27 de setembro de 2017, foi publicada pela Secretaria da Fazenda, por meio da Portaria CAF-G 00024-2017¹², a Fonte de Recursos e o Código de Receita-NIT.

Seguindo todos os processos administrativos legalmente estabelecidos, a prestação de contas dos projetos com crédito ocorre, desde então, entre o pesquisador responsável, com apoio do NIT-IAL, a empresa parceira e os Centros de Administração, de Recursos Humanos e de Orçamento e Finanças do IAL.

Assim, o IAL foi pioneiro na criação da Fonte de Recursos no Fundo Especial de Despesas, estabelecendo o primeiro contrato de parceria entre o Centro de Virologia-IAL e uma empresa multinacional.

Em 2018, foi sancionado o Decreto nº 9.283, de 7 de fevereiro¹³, pela Presidência da República para atender dispositivos da Lei nº 13.243 que necessitavam de regulamentação, o que contribuiu para a minimização das dificuldades administrativas legais, ou ao menos, a busca de soluções jurídicas para elas.

Cabe salientar que a concretização de projetos científicos com potencial inovador em parceria com

instituições privadas era um processo árduo em consequência da falta de legislação pertinente. A união de competências entre Consultoria Jurídica da Secretaria de Estado da Saúde e NIT-IAL foi fundamental na elucidação do problema.

O NIT-IAL foi, portanto, precursor na identificação e solução do principal obstáculo das instituições públicas subordinadas à administração direta e sem fundação no estabelecimento de parcerias técnico-científicas com potencial de inovação, exercendo o gerenciamento dos recursos financeiros. Porém, muito deve ser feito ainda em inovação e pesquisa científica e tecnológica junto às esferas legais, para que se atinja a autonomia tecnológica e o desenvolvimento do sistema produtivo nacional e regional.

REFERÊNCIAS

1. Presidência da República (BR). Secretaria Geral. Lei nº 10.973, de 2 de dezembro de 2004. Dispõe sobre incentivos à inovação e à pesquisa científica e tecnológica no ambiente produtivo e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 3 dez 2004. Seção 1(232):2-4.
2. São Paulo. Decreto nº 56.569, de 22 de dezembro de 2010. Cria os Núcleos de Inovação Tecnológica – NITs, no âmbito das Instituições Científicas e Tecnológicas do Estado de São Paulo – ICTESPs, das Secretarias de Estado que especifica e dá providências correlatas. Diário Oficial do Estado. São Paulo, SP, 22 dez 2010. Seção1(242):4-5.
3. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo). Portaria nº 23, de 6 de dezembro de 2013. Cria no âmbito deste Instituto o Núcleo de Inovação Tecnológica – NIT. Diário Oficial do Estado. São Paulo, SP, 07 dez 2013. Seção 1(231):56. Disponível em:
https://ses.sp.bvs.br/wp-content/uploads/2021/06/E_PT-IAL-23_061213.pdf
4. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo). Portaria nº 17, de 8 de julho de 2015. Nova designação para membros do Núcleo de Inovação Tecnológica do Instituto Adolfo Lutz. Diário Oficial do Estado. São Paulo, SP, 28 jul 2015. Seção 1(137):55. Disponível em:
https://ses.sp.bvs.br/wp-content/uploads/2021/06/E_PT-IAL-17_080715.pdf
5. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo). Portaria nº 3, de 20 de abril de 2021. Nova designação para membros do Núcleo de Inovação Tecnológica do Instituto Adolfo Lutz. Diário Oficial do Estado. São Paulo, SP, 22 abr 2021. Seção 1(75):38. Disponível em:
https://ses.sp.bvs.br/wp-content/uploads/2021/04/E_PT-IAL-3_200421.pdf
6. Coral E, Ogliari A, Abreu AF. Gestão integrada da inovação: estratégia, organização e desenvolvimento de produtos. 1.ed. São Paulo: Atlas; 2008.
7. Emmendoerfer ML. Inovação e empreendedorismo no setor público. Brasília: Enap; 2019. Disponível em:
<http://repositorio.enap.gov.br/handle/1/4282>

8. Governo do Estado de São Paulo. Projeto São Paulo: inovação aberta em saúde – SPUK. Disponível em: <https://ses.sp.bvs.br/vhl/spuk-sao-paulo-inovacao-aberta-em-saude/>
9. São Paulo. Decreto – Lei Complementar nº 16, de 2 de abril de 1970. Dispõe sobre a instituição e o funcionamento de fundos especiais, na Administração. Diário Oficial do Estado. São Paulo, SP, 3 abr 1970. Disponível em: <https://www.al.sp.gov.br/repositorio/legislacao/decreto.lei.complementar/1970/decreto.lei.complementar-16-02.04.1970.html>
10. Congresso Nacional (BR). Emenda Constitucional nº 85, de 26 de fevereiro de 2015. Altera e adiciona dispositivos na Constituição Federal para atualizar o tratamento das atividades de ciência, tecnologia e inovação. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 3 mar 2015. Seção 1(41):5.
11. Presidência da República (BR). Secretaria Geral. Lei nº 13.243, de 11 de janeiro de 2016. Dispõe sobre estímulos ao desenvolvimento científico, à pesquisa, à capacitação científica e tecnológica e à inovação e altera a Lei nº 10.973, de 2 de dezembro de 2004..., nos termos da Emenda Constitucional nº 85, de 26 de fevereiro de 2015. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 12 jan 2016. Seção 1(7):1-5.
12. São Paulo. Poder Executivo. Coordenadoria da Administração Financeira. Portaria CAF-G 00024, de 27 de dezembro de 2017. Altera dispositivo da Portaria Conjunta CAF-CCECO-CPA 1, de 11 de janeiro de 2017. Diário Oficial do Estado. São Paulo, SP, 3 out 2017. Seção 1(186):28.
13. Presidência da República (BR). Secretaria Geral. Decreto nº 9.283, de 07 de fevereiro de 2018. Regulamenta a Lei nº 10.973, de 2 de dezembro de 2004., e altera o Decreto nº 6.759, de 5 de fevereiro de 2009, para estabelecer medidas de incentivo à inovação e à pesquisa científica e tecnológica no ambiente produtivo, com vistas à capacitação tecnológica, ao alcance da autonomia tecnológica e ao desenvolvimento do sistema produtivo nacional e regional. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 8 fev 2018. Seção 1(28):10-20.



AGRADECIMENTOS

O Corpo Editorial agradece a todos os relatores abaixo relacionados que, com seu trabalho voluntário e anônimo ao longo de 2022, contribuíram para o bom andamento das atividades e elevação do nível dos artigos publicados pela Revista

- **Adele Caterino de Araujo** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Imunologia. São Paulo, SP
- **Alessandra Lucchesi de Menezes Xavier Franco** Secretaria de Estado da Saúde Programa de Pós-Graduação da Coordenadoria de Controle de Doenças, Centro de Vigilância Epidemiológica, Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. São Paulo, SP
- **Alexandre Dias Tavares Costa** Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Carlos Chagas. Curitiba, PR
- **Ana Cristina Simões Rosa** Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Estudo da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana. Rio de Janeiro, RJ
- **Ana Elisa Fusaro Bortoloto** Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo, SP
- **Anapátricia Morales Vilha** Universidade Federal do ABC, Centro de Engenharia, Modelagem e Ciências Sociais Aplicadas. São Bernardo do Campo, SP
- **Cyro Alves de Brito** Instituto Adolfo Lutz, Divisão Técnica de Biologia Médica, Centro de Imunologia. São Paulo, SP
- **Edward José de Oliveira** Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas René Rachou. Belo Horizonte, MG
- **Endler Marcel Borges de Souza** Fundação Universidade Regional de Blumenau, Departamento de Química. Blumenau, SC
- **Fabiana Martins de Paula** Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo, SP
- **Geni Rodrigues Sampaio** Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Nutrição. São Paulo, SP
- **Gina Maria Bueno Quirino Cardozo** Instituto de Tecnologia de Alimentos, Secretaria de Agricultura e Abastecimento, Unidade Laboratorial de Referência de Análises Físicas Sensoriais e Estatística. Campinas, SP
- **Henrique Carlos Marinho Pereira da Silva** Instituto de Tecnologia de Pernambuco, Laboratório de Contaminantes Químicos e Biológicos. Recife, PE
- **Jacqueline Tanury Macruz Peresi** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Laboratórios Regionais, Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas. São José do Rio Preto, SP
- **Janine Passos Lima da Silva** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Agroindústria de Alimentos. Rio de Janeiro, RJ
- **Jerusa de Souza Andrade** Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Departamento de Tecnologia de Alimentos. Manaus, AM
- **Jessica Luana Chechi** Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. São Paulo, SP
- **João Paulo Zen Siqueira** Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Laboratório de Microbiologia. São José do Rio Preto, SP
- **Josué de Moraes** Universidade de Guarulhos, Núcleo de Pesquisa em Doenças Negligenciadas. Guarulhos, SP
- **Jussara Carvalho de Moura Della Torre** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Alimentos, Núcleo de Química Física e Sensorial. São Paulo, SP

- **Lidiane Nunes Barbosa** Universidade Paranaense, Unipar Umuarama. Umuarama, PR
- **Luciano Bertollo Rusciolelli** Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano, IF Baiano - Campus Uruçuca. Uruçuca, BA
- **Marcelo Elias Fraga** Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Veterinária, Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária. Seropédica, RJ
- **Márcia Elena Zanuto** Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar de Saúde. Vitória da Conquista, BA
- **Márcia Nogueira Dimov** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Alimentos, Núcleo de Morfologia e Microscopia. São Paulo, SP
- **Marcone Augusto Leal de Oliveira** Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química. Juiz de Fora, MG
- **Marcos Ereno Auler** Universidade Estadual do Centro-Oeste, Centro de Ciências da Saúde. Guarapuava, PR
- **Maria Cristina Zborowski de Paula** Centro Universitário Filadélfia, Curso de Pós-graduação em Armazenamento de Grãos e a Segurança Alimentar. Londrina, PR
- **Marília Gonçalves Cattelan** Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto. São José do Rio Preto, SP
- **Paula Helena Ortiz Lima** Secretaria de Desenvolvimento Econômico do Estado de São Paulo, Coordenadoria de Ciência, Tecnologia e Inovação. São Paulo, SP
- **Roberto Christ Vianna Santos** Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS
- **Robson Alves da Silva** Instituto Federal do Piauí, Instituto Federal do Piauí - Campus Teresina Central. Teresina, PI
- **Roseli Santos de Freitas** Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Instituto de Medicina Tropical, Laboratório de Micologia Médica. São Paulo, SP
- **Tatiana Saldanha** Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Tecnologia. Seropédica, RJ
- **Tatiane Assone dos Santos** Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Instituto de Medicina Tropical. São Paulo, SP
- **Terezinha Inez Estivalet Svidzinski** Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Análise Clínicas. Maringá, PR
- **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**
- **Leonardo José Tadeu Araújo** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Patologia, Núcleo de Patologia Quantitativa. São Paulo, SP



SECRETARIA
DA SAÚDE

