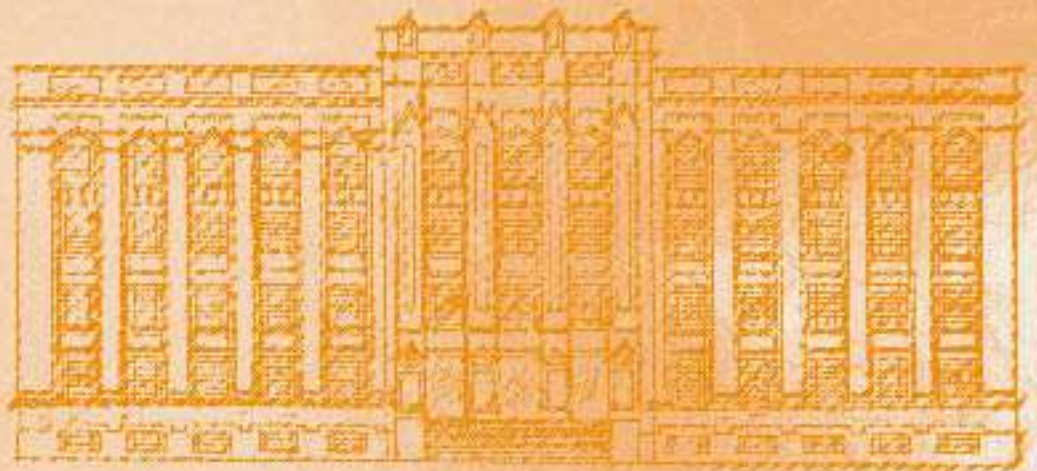


REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

ISSN: 1983-3814 (on-line)
RIALA6



Volume 82 número único, 2023



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

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Volume 82, 2023

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
Paula Ordonhez Rigato
Rosemeire Cobo Zanella Ramos
Ruth Estela Gravato Rowlands

Editor Adjunto

Adriana Bugno

Núcleo de Acervo

Rocely Aparecida Bueno Moita

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
2023, 82

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;

Diretórios:
DIADORIM (Diretório de políticas editoriais das revistas científicas brasileira)
Miguilim (Diretório de Revistas Científicas Eletrônicas Brasileiras)
ROAD (Directory of Open Access Scholarly Resources)

Acesso *on-line* / *online 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/>

Contato:

Endereço / *Address*
Núcleo de Acervo
Av. Dr. Arnaldo, 355, 01246-000 São Paulo/ SP – Brasil
Tel.: 11 3068-2867/2869
E-mail: rial@saude.sp.gov.br

EDITORIAL

Homenagem ao Dr. Pedro Luiz Silva Pinto: um exigente guardião da ciência

Com profunda admiração e respeito, dedicamos este texto ao Dr. Pedro Luiz Silva Pinto, que após a publicação de sua aposentadoria em janeiro de 2023, encerrou sua magnífica colaboração, ofertada durante todos os períodos em que exerceu a função de Editor Chefe da RIAL.

Sua trajetória exemplar, marcada por uma rigorosa postura científica e um compromisso inabalável com a excelência, deixa um legado indelével na área da saúde pública.

A extensa produção científica do Dr. Pedro, publicada nos melhores periódicos da área, é um marco na Parasitologia brasileira. Seus estudos pioneiros sobre diversas doenças parasitárias, contribuíram significativamente para o aprimoramento do diagnóstico, tratamento e controle desses agravos. Sua busca incessante pela qualidade e pelo rigor científico fizeram seus alunos, que hoje são profissionais renomados na área, reconhecerem o valor de sua orientação, que os moldou para serem cientistas meticolosos e dedicados.

Como guardião da ciência e gestão criteriosa, sua liderança firme e seu compromisso com a qualidade editorial, transformaram a RIAL em um veículo de referência para a divulgação de pesquisas científicas, na elevação do padrão do periódico, onde a difusão do conhecimento por meio da editoração científica é uma área de extrema relevância e de constante transformação, impondo novos desafios e renovações constantes.

Em sua gestão como Editor Chefe, não mediu esforços para promover a RIAL e torná-la uma publicação totalmente eletrônica. Desde 2018, contribuiu ativamente para a adoção do sistema OJS (Open Journal System), ferramenta que permite a gestão de todo o processo de submissão, fluxo de trabalho editorial e publicação de artigos e edições *on-line*. Sua dedicação e persistência para a inserção da RIAL neste sistema, contribuiu para a implantação do Portal de Revistas Científicas da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, onde atualmente exerce atividades como consultor deste Portal.

A Revista do Instituto Adolfo Lutz se sente honrada em ter feito parte da brilhante trajetória do Dr. Pedro e em poder prestar esta justa homenagem a este grande pesquisador.

Agradecemos profundamente ao Dr. Pedro por suas inestimáveis contribuições, empenho, dedicação, visão de futuro e desejamos que seu legado seja comemorado em vida e eternamente preservado!

Com toda nossa profunda admiração e eterno respeito.

Equipe Editorial da Revista do Instituto Adolfo Lutz

. EDITORIAL

. ARTIGO DE REVISÃO/REVIEW ARTICLE

e39255 Falsificações por troca de espécies de peixes: uma revisão sistemática das espécies mais comumente substituídas

Fish mislabeling: a systematic review of the most commonly mislabeled species

Carolina Laipelt Matias, Andrea Troller Pinto, Juliana Querino Goulart

. ARTIGO ORIGINAL/ORIGINAL ARTICLE

e39195 Performance of the tetra-primer PCR technique compared to PCR-RFLP in the search for rs12979860 (C/T) and rs8099917 (T/G) single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *IFNL4* gene

Desempenho da técnica tetra-primer PCR em relação a PCR-RFLP na pesquisa de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) rs12979860 (C/T) e rs8099917 (T/G) no gene *IFNL4*

Ellen Hochleitner de Souza Kindermann, Karoline Rodrigues Campos, Adele Caterino-de-Araujo

e38777 Estratégias para recuperação de xilooligosacarídeos do licor de resíduos de eucalipto para avaliação do seu efeito estimulante em *Staphylococcus xylosus*

Strategies for xylooligosaccharides recovery from eucalyptus waste liquor to evaluate their stimulatory effect on *Staphylococcus xylosus*

Mariana Gomes Moreira, Jenniffer Andrea Tamayo Peña, Telma Teixeira Franco

e38222 New occurrence of lepidopterism by *Hylesia nigricans* (Berg, 1875) (Lepidoptera: Saturniidae) in Rio Grande do Sul, Brazil

Nova ocorrência de lepidopterismo por *Hylesia nigricans* (Berg, 1875) (Lepidoptera: Saturniidae) no Rio Grande do Sul, Brasil

Diego Dutra Silveira, Marco Antônio Barreto de Almeida, Edmilson dos Santos, Rosângela Brito, Wilson Sampaio de Azevedo Filho, Jáder da Cruz Cardoso

e39114 Associação entre estado nutricional, indicadores socioeconômicos e quesito raça/cor em gestantes do Recôncavo da Bahia, Brasil

Association between nutritional status, socioeconomic indicators and race/color question in pregnant women in the Recôncavo of Bahia, Brazil

Larissa Ferreira de Oliveira, Clotilde Assis Oliveira, Jerusa da Mota Santana, Renata de Oliveira Campos

e39163 Caracterização morfológica e morfométrica de estágios larvares de *Strongyloides* spp., ancilostomídeos e *Angiostrongylus* spp.: subsídios para identificação em amostras ambientais

Morphological and morphometric characterization of larval stages of *Strongyloides* spp., hookworms and *Angiostrongylus* spp.: subsidies for identification in environmental samples

Laís Fernanda de Pauli-Yamada, Pedro Luiz Silva Pinto

e39152 Impacto na qualidade de antissépticos e desinfetantes com álcool 70% (p/p) utilizados no enfrentamento da pandemia provocada pelo SARS-CoV-2

Impacts on the quality of antiseptic and disinfectant products with 70% alcohol (w/w) used in the SARS-CoV-2 pandemic

Fernanda Fernandes Farias, Helena Miyoco Yano, Valéria Adriana Pereira Martins, Luz Marina Trujillo, Ellen Gameiro Hilinski, Kátia Cristina da Silva Rodrigues, Adriana Aparecida Buzzo Almodovar, Maria Cristina Santa Bárbara

e39184 Irregularidades registradas durante inspeções sanitárias em restaurantes e similares

Irregularities recorded during sanitary inspections in restaurants and similar

Patrícia Vitorio Olmedo, Caroline Opolski Medeiros, Sila Mary Rodrigues Ferreira, Lize Stangarlin-Fiori

e39242 Factors interfering with the production of *Histoplasma capsulatum* antigens

Fatores que interferem na produção de antígenos de *Histoplasma capsulatum*

Roseli Santos de Freitas-Xavier, Isabel Alves Feitosa Maciel, Vera Lúcia Teixeira de Freitas, Adriana Pardini Vicentini

e39695 Panorama da qualidade biológica da água destinada ao tratamento dialítico em pacientes sob cuidados críticos em Unidades de Terapia Intensiva

Overview of the biological quality of water intended for dialysis treatment in patients under critical care in Intensive Care Units

Adriana Aparecida Buzzo Almodovar, Ellen Gameiro Hilinski, Márcia Liane Buzzo

. COMUNICAÇÃO BREVE/BRIEF COMMUNICATION

e39330 Avaliação da rotulagem de cosméticos clareadores de pele comercializados em Juazeiro, Bahia, Brasil

Evaluation of the labeling of skin lightening cosmetics marketed in Juazeiro, Bahia, Brazil

Amanda Santana Gomes, Raquel Deodato Silva Rodrigues, Joyce Kelly Marinheiro da Cunha Gonsalves

e39153 O consumo de substitutos de origem vegetal é nutricionalmente mais vantajoso que os produtos cárneos?

Is the consumption of plant origin substitutes nutritionally more advantageous than meat products?

Rosana Ribeiro Christ, Christiane Mileib Vasconcelos

. COLABORADORES

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

. INSTRUÇÕES AOS AUTORES

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



Falsificações por troca de espécies de peixes: uma revisão sistemática das espécies mais comumente substituídas

Fish mislabeling: a systematic review of the most commonly mislabeled species

Carolina Laipelt Matias^{2*} , Andrea Troller Pinto^{1,2} , Juliana Querino Goulart² 

¹ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

² Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

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

Recebido/Received: 13.06.2023 – Aceito/Accepted: 12.09.2023

RESUMO

O objetivo deste artigo é determinar quais são as espécies de peixes mais comumente substituídas, relatadas em revisões sobre falsificações por troca de espécies, em artigos científicos publicados entre 2002 e 2022, assim como expor quais são os fatores que levam à ocorrência de casos de falsificação, quais os danos sociais que tal prática ilegal pode gerar e em que tipo de estabelecimentos as falsificações normalmente são detectadas. Assim, por meio de uma revisão sistemática de literatura, foi verificado que as espécies de peixes mais comumente falsificadas foram *Anoplopoma fimbria*, *Gadus morhua*, *Solea solea*, *Thunnus albacares*, *Scomberomorus commerson*, *Lates calcarifer* e *Rastrelliger brachysoma*. As motivações por trás das falsificações intencionais foram predominantemente econômicas, tendo sido observados impactos negativos das falsificações na economia, na saúde pública e no meio ambiente. A maioria das falsificações foi encontrada no final da cadeia produtiva, em locais como varejos, restaurantes e peixarias. Dessa forma, ao saber como as falsificações acontecem e suas razões, torna-se possível saber como minimizar a sua ocorrência.

Palavras-chave. Peixes, Alimentos, Saúde Pública.

ABSTRACT

The aim of this article is to identify the most frequently mislabeled fish species, based on reports and reviews of species mislabeling-related falsifications, in scientific articles published between 2002 and 2022. It also aims to explore the factors contributing these counterfeiting incidents, the social harms associated with this illegal practice and the types of establishments where counterfeits are typically detected. Through a systematic literature review, it was verified that the most commonly mislabeled fish species were *Anoplopoma fimbria*, *Gadus morhua*, *Solea solea*, *Thunnus albacares*, *Scomberomorus commerson*, *Lates calcarifer* and *Rastrelliger brachysoma*. The primary motivations behind intentional counterfeiting were economic in nature, and negative impacts of counterfeiting on the economy, public health and the environment were widely recognized. Most counterfeits were found at the end of the production chain, in places such as retail stores, restaurants and fishmongers' businesses. By understanding the mechanisms and motivations behind counterfeiting, we can effectively minimize its prevalence.

Keywords. Fishes, Food, Public Health.

INTRODUÇÃO

Os peixes se destacam nutricionalmente de outros produtos de origem animal por conter, comparativamente, grandes quantidades de ferro, cobre, selênio, cálcio, fósforo e vitaminas A e D, além de conter todos os aminoácidos essenciais para o ser humano¹. Em contraste com a composição lipídica de mamíferos, os peixes também contêm uma elevada proporção de ácidos graxos poli-insaturados¹. De acordo com a Escola de Saúde Pública de Harvard (*Harvard T.H. Chan School of Public Health*), os benefícios da ingestão de uma ou duas porções de peixe por semana, que contêm cerca de 2 g de ácidos graxos poli-insaturados ômega 3, incluem a redução de acidente vascular cerebral e do risco de morte por doença cardíaca².

Com o aumento do consumo e do comércio mundial de pescado, níveis discrepantes de oferta e demanda de determinadas espécies de peixes levaram a identificação de casos de falsificação por troca de espécies, uma vez que alimentos ricos em proteínas e com alto valor biológico são mais propensos a sofrer fraudes por troca de espécies^{3,4}. O Decreto nº 10.468, de 18 de agosto de 2020 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) define que as matérias-primas e os produtos que tenham sido elaborados a partir de espécie diferente da declarada no rótulo ou divergente da indicada no registro, são considerados falsificados⁵.

No que tange à prevalência das espécies em casos de falsificação, há algumas espécies mais propensas a serem rotuladas incorretamente do que outras^{6,7}. Além disso, tal rotulagem errônea pode ocorrer de forma intencional ou não, ao longo de toda a cadeia de abastecimento^{7,8}.

Outro fator significativo está na maior conscientização dos consumidores atualmente, no que se refere à importância dos cuidados com a saúde, bem como suas responsabilidades sociais. Assim, buscam se assegurar sobre a origem, a composição e os impactos ambientais causados na produção dos alimentos que consomem⁴. Dessa forma, a designação da espécie é essencial para permitir que os consumidores façam a sua escolha a partir das informações ofertadas a eles, que devem ser corretas e confiáveis⁶.

Sendo assim, por meio de uma revisão sistemática de literatura, objetivou-se determinar quais são as espécies de peixes mais comumente substituídas, presentes em relatos e revisões sobre falsificações por troca de espécies, em artigos científicos publicados entre 2002 e 2022, assim como em que tipo de estabelecimentos as falsificações normalmente foram detectadas. Este trabalho também objetiva relatar quais são os fatores que levam à ocorrência de falsificações, e quais os danos sociais que tal prática ilegal pode gerar.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizada uma pesquisa bibliográfica em artigos científicos publicados entre os anos de 2002 a 2022. A base de dados utilizada foi a *Web of Science*. Foram usadas as palavras-chave “*fish fraud*”, “*fish mislabeling*” e “*fish species substitution*”, as quais deviam estar inclusas no título das publicações. Os artigos foram selecionados por meio da leitura dos seus resumos e, posteriormente, foi realizada a leitura integral dos artigos para a seleção final. Os critérios de inclusão de documentos para este estudo foram: o artigo deveria apresentar um relato de caso de falsificação, ou uma revisão de falsificações por troca de espécies em peixes, além de relatar os nomes científicos das espécies envolvidas nos casos de falsificação; o artigo deveria ter a sua data de publicação situada entre 2002 e 2022; e o artigo deveria estar publicado na língua inglesa.

RESULTADOS

Após a aplicação dos critérios de inclusão, foram selecionados 23 artigos para dar continuidade ao estudo (**Tabela 1**). Identificou-se que as espécies mais envolvidas em casos de falsificação por denominação falsa nos rótulos dos produtos foram (**Tabela 2**): *Anoplopoma fimbria* (36 amostras), *Gadus morhua* (18 amostras), *Solea solea* (18 amostras), *Thunnus albacares* (15 amostras), *Scomberomorus commerson* (14 amostras), *Lates calcarifer* (12 amostras) e *Rastrelliger brachysoma* (12 amostras).

Tabela 1. Seleção final dos artigos para o estudo

Autores	Título
Acutis et al (2019) ⁹	Detection of fish species substitution frauds in Italy: a targeted national monitoring plan
Bénard-Capelle et al (2015) ⁶	Fish mislabelling in France: Substitution rates and retail types
Blanco-Fernandez et al (2021) ¹⁰	Fraud in highly appreciated fish detected from DNA in Europe may undermine the development goal of sustainable fishing in Africa
Cawthorn et al (2012) ¹¹	DNA barcoding reveals a high incidence of fish species misrepresentation and substitution on the South African market
Cawthorn et al (2015) ⁴	Fish species substitution and misnaming in South Africa: an economic, safety and sustainability conundrum revisited
Changizi et al (2013) ¹²	Species identification reveals mislabeling of important fish products in Iran by DNA barcoding
Chen et al (2019) ¹³	DNA barcoding of fish species reveals low rate of package mislabeling in Qatar
Cutarelli et al (2014) ¹⁴	Italian market fish species identification and commercial frauds revealing by DNA sequencing
Deconinck et al (2020) ¹⁵	A high-quality genetic reference database for European commercial fishes reveals substitution fraud of processed Atlantic cod (<i>Gadus morhua</i>) and common sole (<i>Solea solea</i>) at different steps in the Belgian supply chain
Delpiani et al (2020) ¹⁶	Are we sure we eat what we buy? Fish mislabelling in Buenos Aires province, the largest sea food market in Argentina
Do et al (2019) ¹⁷	Assessment of marine fish mislabeling in South Korea's markets by DNA barcoding
Filonzi et al (2010) ¹⁸	Molecular barcoding reveals mislabelling of commercial fish products in Italy
Filonzi et al (2021) ¹⁹	Efficiency of DNA mini-barcoding to assess mislabelling in commercial fish products in Italy: An overview of the last decade
Galal-Khallaf et al (2014) ²⁰	DNA barcoding reveals a high level of mislabeling in Egyptian fish fillets
Gomes et al (2019) ²¹	Forensic analysis reveals fraud in fillets from the “Gurijuba” <i>Sciades parkeri</i> (Ariidae – Siluriformes): a vulnerable fish in Brazilian Coastal Amazon
Helyar et al (2014) ²²	Fish product mislabeling: Failings of traceability in the production chain and implications for Illegal, Unreported and Unregulated (IUU) fishing

Continua na próxima página

Continuação

Autores	Título
Horreo et al (2019) ⁷	Amplification of 16S rDNA reveals important fish mislabeling in Madrid restaurants
Kappel e Schröder (2016) ²³	Substitution of high-priced fish with low-priced species: adulteration of common sole in German restaurants
Muñoz-Colmenero et al (2016) ²⁴	DNA authentication of fish products reveals mislabeling associated with seafood processing
Sameera et al (2021) ²⁵	Species substitutions revealed through genotyping: implications of traceability limitations and unregulated fishing
von der Heyden et al (2010) ²⁶	Misleading the masses: detection of mislabelled and substituted frozen fish products in South Africa
Xiong et al (2016) ²⁷	DNA barcoding reveals substitution of Sablefish (<i>Anoplopoma fimbria</i>) with Patagonian and Antarctic Toothfish (<i>Dissostichus eleginoides</i> and <i>Dissostichus mawsoni</i>) in online market in China: how mislabeling opens door to IUU fishing
Yan et al (2016) ²⁸	DNA barcoding reveals mislabeling of imported fish products in Nansha new port of Guangzhou, Guangdong province, China

Tabela 2. Espécies declaradas no rótulo e espécies reais identificadas

Espécie declarada no rótulo	Espécie real identificada	Número de amostras	Artigo	
<i>Anoplopoma fimbria</i>	<i>Dissostichus eleginoides</i>	32	Xiong et al (2016) ²⁷	
	<i>Dissostichus mawsoni</i>	4	Xiong et al (2016) ²⁷	
	<i>Brama brama</i>	1	Cawthorn et al (2012) ¹¹	
	<i>Gadus chalcogrammus</i>	1	Deconinck et al (2020) ¹⁵	
	<i>Gadus macrocephalus</i>		1	Muñoz-Colmenero et al (2016) ²⁴
			1	Filonzi et al (2010) ¹⁸
<i>Gadus morhua</i>		5	Bénard-Capelle et al (2015) ⁶	
	<i>Melanogrammus aeglefinus</i>		1	Deconinck et al (2020) ¹⁵
			1	Filonzi et al (2010) ¹⁸
	<i>Molva molva</i>		4	Muñoz-Colmenero et al (2016) ²⁴
			1	Bénard-Capelle et al (2015) ⁶
		<i>Pollachius virens</i>	1	Cutarelli et al (2014) ¹⁴
		1	Deconinck et al (2020) ¹⁵	
	<i>Pristipomoides filamentosus</i>	2	Sameera et al (2021) ²⁵	
<i>Lates calcarifer</i>	<i>Seriola brama</i>	9	Cawthorn et al (2012) ¹¹	
	<i>Thyrsites atun</i>	1	Cawthorn et al (2012) ¹¹	
<i>Rastrelliger brachysoma</i>	<i>Alepes apercna</i>	12	Yan et al (2016) ²⁸	

Continua na próxima página

Continuação

Espécie declarada no rótulo	Espécie real identificada	Número de amostras	Artigo
<i>Scomberomorus commerson</i>	<i>Acanthocybium solandri</i>	3	Sameera et al (2020) ²⁵
	<i>Caranx ignobilis</i>	3	Sameera et al (2020) ²⁵
	<i>Coryphaena hippurus</i>	1	Sameera et al. (2020) ²⁵
	<i>Istiophorous platypterus</i>	3	Sameera et al (2020) ²⁵
	<i>Scomberomorus niphonius</i>	3	Changizi et al (2013) ¹²
	<i>Xiphias gladius</i>	1	Sameera et al (2020) ²⁵
<i>Solea solea</i>	<i>Cynoglossus senegalensis</i>	1	Deconinck et al (2020) ¹⁵
		4	Kappel e Schröder (2016) ²³
	<i>Cynoglossus sp.</i>	1	Deconinck et al (2020) ¹⁵
	<i>Limanda aspera</i>	3	Deconinck et al (2020) ¹⁵
	<i>Microstomus kitt</i>	1	Deconinck et al (2020) ¹⁵
	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	1	Deconinck et al (2020) ¹⁵
	<i>Pangasianodon hypophthalmus/ Pangasius sanitwongsei</i>	5	Kappel e Schröder (2016) ²³
	<i>Synaptura lusitanica</i>	2	Kappel e Schröder (2016) ²³
<i>Thunnus albacares</i>	<i>Callorhinchus callorhynchus</i>	1	Delpiani et al (2020) ¹⁶
	<i>Galeorhinus galeus</i>	3	Delpiani et al (2020) ¹⁶
	<i>Mustelus schmitti</i>	2	Delpiani et al (2020) ¹⁶
	<i>Squatina guggenheim</i>	1	Delpiani et al (2020) ¹⁶
	<i>Thunnus obesus</i>	6	Acutis et al (2019) ⁹
	<i>Thunnus thynnus</i>	1	Cawthorn et al (2015) ⁴
		1	Acutis et al (2019) ⁹

Foi observado que a falsificação por troca de espécies pode ter sido realizada de forma intencional, para aumentar lucros, evitar tributação, ocultar espécies ilegais ou satisfazer a demanda do mercado^{8,29-31}. As consequências da falsificação são diversas, o que inclui perdas financeiras para os consumidores e para o setor governamental, perda de confiança dos consumidores no comércio de pescado, problemas para a conservação de espécies já ameaçadas e sobre-explotadas, além de eventuais riscos à saúde pública^{26,32}.

Do ponto de vista da localização da falsificação, foi possível observar que estabelecimentos de varejo, restaurantes e peixarias foram os locais mais mencionados. O varejo foi mencionado em sete dos artigos selecionados, enquanto o restaurante e a peixaria foram mencionados em seis artigos.

DISCUSSÃO

A espécie *Anoplopoma fimbria* é denominada comumente no Brasil como Peixe-Carvão-do-Pacífico, ou Gindara³³. É um peixe que é rico em ômega-3 e que apresenta uma carne branca firme, com qualidade e sabor superiores, sendo consumido na Ásia na forma de sushi, sashimi ou marinado³⁴.

O notável valor do *A. fimbria* e a diminuição das suas populações selvagens, podem estimular o desenvolvimento da aquicultura comercial desta espécie³⁴. O Japão é o maior importador e consumidor mundial desse pescado, tendo registrado um consumo médio de 26.900 toneladas métricas por ano, no período de 1987 a 2012, o que corresponde a 88% da produção mundial de *A. fimbria* nesse intervalo de tempo³⁵. No entanto, também houve um aumento na demanda em outros mercados asiáticos, como na Coreia do Sul e em Hong Kong, onde esse peixe é considerado uma iguaria³⁶. Assim, o valor de mercado, o aumento da procura dos consumidores e a diminuição das unidades populacionais tornaram a criação de *A. fimbria* uma importante aquicultura³⁷.

A espécie *Gadus morhua* é denominada comumente no Brasil como Bacalhau, Bacalhau-do-Porto, Bacalhau-do-Atlântico, Cod e Cod-do-Atlântico³³. É uma das espécies de peixe branco mais consumidas em toda a Europa³⁸. O aumento do consumo mundial e os altos níveis de exploração provocaram diminuição dos estoques e limitações de captura³⁹. O declínio dos estoques naturais e o seu alto valor de mercado levaram a um aumento do interesse no cultivo intenso desta espécie⁴⁰. Os mesmos motivos também explicam a razão pela qual o Bacalhau é frequentemente substituído por espécies de menor valor ou tem a sua captura ilegal ocultada pelo uso de nomes de outras espécies²².

A espécie *Solea solea*, em Portugal, é denominada comumente como Linguado Legítimo. O *Solea solea* é um peixe de corpo achatado, de importância comercial na Europa, cuja distribuição se estende da Noruega e do Mar Báltico Ocidental ao Senegal, incluindo o Mar Mediterrâneo⁴¹. Devido ao seu alto valor de mercado, a alta qualidade da carne e a crescente demanda dos consumidores, é muito explorado na maior parte de sua área de distribuição⁴². Acredita-se que o estoque de Linguado Legítimo do Mar do Norte está em risco de exploração insustentável⁴³.

A espécie *Thunnus albacares* é denominada comumente no Brasil como Atum, Albacora-de-Lage ou Atum-Galha-Amarela³³. É um peixe importante na pesca comercial dos oceanos Pacífico, Índico e Atlântico⁴⁴. Indivíduos maduros podem produzir carne de qualidade de sashimi, e os animais mais jovens são, frequentemente, processados como atum enlatado de alta qualidade⁴⁵. Assim como diversas outras espécies, essa está atualmente em sobrepesca e é considerada uma espécie quase ameaçada de extinção⁴⁶.

Os peixes do gênero *Scomberomorus* spp. são denominados comumente, no Brasil, como Cavala³³. A sua popularidade e o seu alto preço de mercado resultam em uma forte exploração dos seus estoques⁴⁷. Devido à alta demanda, a captura anual global desse pescado aumentou, em um ritmo constante, de 70 mil toneladas métricas, na década de 1970, para mais de 220 mil toneladas métricas em 2008¹⁹. Assim, houve um declínio substancial dessa espécie devido à superexploração e as práticas de pesca não regulamentadas¹⁹.

Os peixes do gênero *Lates* spp. são denominados comumente no Brasil como Perca-de-Água-Doce³³. É um dos peixes de aquicultura marinha mais importante na Austrália e nos países asiáticos⁴⁸. A demanda de mercado e o preço desse pescado são altos devido ao seu sabor, textura e aroma apreciados⁴⁹. Além da elevada preferência do consumidor e do preço de mercado competitivo, essa espécie apresenta uma alta taxa de crescimento, além da capacidade de ser cultivada em uma ampla variedade de ambientes, sendo, por esses motivos, cultivada em diversos países⁴⁹.

A espécie *Rastrelliger brachysoma*, em inglês, é denominada “*short mackerel*”, o que, traduzido para o português, significa “Cavala Curta”⁵⁰. Essa espécie apresenta uma alta preferência entre os consumidores devido ao seu preço acessível e ao fato de ser amplamente disponível durante todo o ano, em muitos países do sudeste asiático, incluindo Tailândia, Malásia, Camboja, Filipinas e Indonésia⁵⁰. A

redução dessa espécie pode estar ocorrendo devido à sobrepesca e à deterioração de seu habitat natural⁵¹. Se a população de *R. brachysoma* continuar a diminuir nesse ritmo, essa espécie será extinta ou irá tornar-se ecologicamente insignificante⁵¹.

Em 2021, o mercado global da aquicultura foi estimado em US\$ 308 bilhões⁵². Em 2018, os peixes representavam 47,40% do total da produção aquícola, totalizando 54 milhões de toneladas⁵². As Carpas e a Tilápia estão entre as espécies de peixes mais cultivadas do mundo, com produções de 29,23 milhões de toneladas e 6,03 milhões de toneladas, respectivamente⁵².

Quando se trata do Brasil, os peixes mais produzidos atualmente são a Tilápia (*Oreochromis* spp.), o Tambaqui (*Colossoma macropomum*), o Pacu (*Piaractus mesopotamicus*), híbridos de Tambaqui e Pacu (Tambacu, Patinga e Tambatinga) e as Carpas⁵³. Em 2018, o país ocupou a quinta posição no ranking global de produção de Tilápias e outros ciclídeos (família de peixes de água doce), com produção de 317 mil toneladas e valor da produção de cerca de mais de dois bilhões de reais⁵². Apesar do grande potencial, o Brasil ainda contribui pouco para a produção mundial de pescado, pois a pesca continental é artesanal e a pesca marinha está estática⁵².

Entre 2014 e 2019, as regiões Sul e Sudeste do Brasil detiveram 50% da produção nacional, com 282 mil toneladas⁵². Entretanto, de acordo com Lopes et al⁵³, dentre as cinco macrorregiões do Brasil (Norte, Nordeste, Sul, Sudeste e Centro-Oeste), apenas na região Norte a população demonstra preferência por peixes nas suas refeições. Os resultados da pesquisa de Lopes et al⁵³ apontaram preferência por carne bovina nas outras quatro macrorregiões.

Com relação aos fatores que levam à ocorrência das falsificações, a substituição por troca de espécies pode ser não intencional, sendo ocasionada por simples erros ao longo da cadeia comercial como, por exemplo, quando espécies morfologicamente semelhantes são capturadas juntas^{8,54,55}. A substituição também pode surgir pelo fato de que as espécies podem ter nomes vernaculares diferentes em diferentes regiões, ou compartilharem o mesmo nome vernacular com outra espécie⁵⁶. Outro fator que também pode influenciar na substituição não intencional de espécies é a falta de protocolos eficazes para identificar, rastrear e rotular o pescado⁸.

A substituição por troca de espécies também pode ser realizada de forma intencional, sendo o incentivo financeiro a maior motivação. Como a carne de muitas espécies de peixes é semelhante em aparência, sabor e textura, torna-se relativamente fácil que espécies de alto valor comercial sejam substituídas por espécies de menor valor comercial^{11,57,58}.

Espécies com baixa oferta e alta demanda apresentam taxas mais altas de substituição⁸. Determinadas espécies de pescado podem apresentar maior demanda por causa da sua qualidade, da sua identidade tradicional ou porque se popularizaram comercialmente^{8,59}. O nível de oferta das espécies também varia muito, de forma que certas espécies podem estar disponíveis em grandes ou pequenas quantidades ao longo do ano, seja naturalmente ou devido a outros fatores, como a pesca de captura, a aquicultura ou o fornecimento de importações⁸.

A baixa oferta decorrente da diminuição dos estoques de peixes também é um fator que estimula a ocorrência de falsificações por troca de espécies^{15,60-62}. Em um estudo de duração de quatro anos, realizado em 10 grandes ecossistemas marinhos ao redor do mundo, Worm et al⁶³ relataram que 63% dos estoques de peixes avaliados estavam abaixo dos níveis desejados. Além disso, dados de 2009 da FAO indicam que a sobrepesca generalizada explorou totalmente, sobre-explorou ou esgotou até 75% dos estoques globais de peixes, tendo efeitos deletérios nos ecossistemas aquáticos^{11,60,64}.

Uma grave consequência das falsificações é o uso de espécies da pesca ilegal, não regulamentada e subnotificada para a substituição intencional de outras espécies, a fim de aumentar o lucro do vendedor, o que causa prejuízo ao cliente²². Esse tipo de pesca prejudica significativamente a biodiversidade¹⁷. Além disso, um estudo por estimativa indica que o valor global da pesca ilegal está entre 10 e 23 bilhões de dólares anuais⁶⁵.

A falsificação por troca de espécies impede que os consumidores conheçam a qualidade de seus alimentos⁸. Uma pesquisa realizada por Lima e Mesquita⁶⁶ procurou identificar as falsificações por troca de espécies mais comuns no comércio varejista de pescado do Estado do Rio de Janeiro. Uma delas foi a substituição da espécie Pescada (*Macrodon ancylodon*) pela espécie Abrótea (*Urophycis brasiliensis*)⁶⁶. Nessa substituição, a Abrótea, espécie comercialmente inferior à Pescada, é apresentada em filés, já que são espécies muito diferentes entre si⁶⁶. Um estudo realizado por Anjos e Tomita⁶⁷ relatou que a Pescada possui uma média de teor proteico de 19,20%, enquanto a Abrótea possui uma média de 18,83%, demonstrando que, nos casos de substituição de espécies que envolvem estes dois peixes, o consumidor estará sendo enganado quanto à qualidade e valor nutricional do alimento que irá consumir.

Além disso, essa situação causa perdas financeiras para os consumidores, uma vez que eles pagam por espécies de alta qualidade, mas obtêm espécies substitutas de qualidade inferior^{7,17}. Um exemplo disso é o Linguado, um peixe oneroso que pode ser substituído pelos peixes Alabote ou Panga⁶⁸. Em 2016, o quilo do filé de *Pangasius* custava R\$ 15,00, enquanto o de Linguado era vendido, no mínimo, pelo dobro do preço, ou seja, o consumidor que fosse alvo dessa substituição seria financeiramente prejudicado⁶⁸.

Outra consequência negativa das falsificações por troca de espécies é a ameaça à saúde dos consumidores, o que pode ocorrer quando os peixes substitutos são de espécies tóxicas, de espécies que contenham alérgenos ou de espécies que contenham altos níveis de metais pesados ou de poluentes orgânicos^{58,69,70}. Um exemplo disso foi o caso relatado por Cohen et al⁷¹, no qual, em 2007, dois indivíduos desenvolveram sintomas consistentes com envenenamento por tetrodotoxina após a ingestão de Baiacu comprado em um mercado de Chicago (Estados Unidos). O varejista alegou que o produto vendido era Tamboril, entretanto uma inspeção visual e uma análise genética determinaram que o peixe era, de fato, um Baiacu (família *Tetraodontidae*), além de a tetrodotoxina ter sido detectada em altos níveis nos peixes do lote implicado e nos restos da refeição ingerida.

Em contraste com a falsificação accidental, a falsificação deliberada é mais frequente em produtos irreconhecíveis^{20,72}. Nos produtos reconhecíveis, a cabeça está presente, além de todo o corpo conter características morfológicas que permitem a identificação da espécie, enquanto que, nos produtos irreconhecíveis, como os filés, a espécie não pode ser apurada visualmente¹⁰. Entretanto, os caracteres morfológicos podem ser alterados ou apagados durante a captura, o processamento, o transporte e a embalagem⁷³. Assim, a falsificação por troca de espécies é mais prevalente em produtos processados (fatiados, cortados, amassados ou misturados com outros ingredientes), uma vez que as características morfológicas não estão mais visíveis^{15,24}.

Relatórios têm mostrado um aumento no número de casos de falsificação por troca de espécies em filés de peixe^{23,74,75}. Um dado preocupante, visto que o tipo de pescado processado mais procurado pela população brasileira é o filé⁵³. Como o peixe é um alimento que se decompõe rapidamente, a principal estratégia para prolongar a sua vida útil é processar a sua carne, sendo que a forma mais comum de fazer isso

é a filetagem⁷⁶. O filé é produzido cortando e separando a carne do osso longitudinalmente, paralelamente à espinha dorsal e, assim, muitas estruturas morfológicas são removidas, o que dificulta o reconhecimento da espécie e facilita que falsificações acidentais ou intencionais ocorram^{11,20,76,77}.

Assim, os peixes podem ser alvo de falsificação por troca de espécies ao longo de toda a cadeia de abastecimento, pois sua crescente complexidade dificulta o rastreamento da origem da falsificação^{4,7}. Além disso, o nível de falsificação varia entre os pontos da cadeia produtiva²⁴. A partir disso, estudos sugerem que as falsificações por troca de espécies são mais importantes no final da cadeia de suprimentos, como em restaurantes, e que os esforços de controle devem ser direcionados a esse nível⁶.

Diante desse problema, o Brasil iniciou medidas para reduzir a falsificação por troca de espécies em peixes, como a Instrução Normativa nº 53, de 1º de setembro de 2020, publicada pelo MAPA, que correlaciona os nomes comuns e científicos das principais espécies-alvo do setor pesqueiro brasileiro, apesar de não exigir a inclusão dos nomes científicos nos rótulos das embalagens³³. Além disso, o MAPA também publicou um manual identificando as principais espécies de peixes comerciais colhidas no Brasil, o qual inclui um diagnóstico morfológico das espécies, a fim de evitar a substituição de peixes inteiros e de produtos processados⁷⁸. As principais características externas das espécies que devem ser analisadas a fim de identificar as substituições são: formato do corpo, pele, nadadeiras, pedúnculo caudal e cabeça. Já as características internas dos cortes comerciais que devem ser analisadas são: cor e aspecto da musculatura, septo horizontal, linhas acessórias, perimísio, miômeros e mioseptos⁷⁸.

O MAPA também adotou a metodologia de DNA *barcoding* como um método padronizado para a regulação sistemática de produtos do mar⁷⁹. Atualmente, o uso de técnicas moleculares como o DNA *barcoding* para a detecção das espécies em produtos processados é um dos métodos mais utilizados e eficazes, já que apresenta maior resolução quando comparado com outros métodos²⁰.

Em 2023, o MAPA realizou a 8ª edição da Operação Semana Santa para evitar a substituição por troca de espécies de pescados⁸⁰. A operação abrangeu produtos elaborados em estabelecimentos sob os Serviços de Inspeção Federal (SIF), Serviços de Inspeção Estadual (SIE) e Serviços de Inspeção Municipal (SIM) e produtos importados, e resultou na coleta de 152 amostras de pescados em 23 estados brasileiros e no Distrito Federal⁸⁰. O resultado apontou um índice de 96,1% de conformidade dos produtos analisados⁸⁰. Para os estabelecimentos sob os SIF que apresentaram amostras não conformes (três amostras de 109 amostras coletadas), foram adotadas ações fiscais previstas na legislação brasileira que podem resultar em multa, suspensão da atividade, interdição ou o cancelamento do registro junto ao SIF⁸⁰. Já para os estabelecimentos sob os SIE e sob os SIM que demonstraram amostras não conformes (três das 26 amostras coletadas), foram encaminhadas notificações aos serviços de inspeção competentes para que sejam adotadas ações previstas nas suas legislações⁸⁰. Nos produtos importados, não foi detectada nenhuma amostra não conforme⁸⁰.

CONCLUSÃO

As espécies de peixes mais comumente substituídas em relatos e revisões sobre falsificações por troca de espécies em artigos científicos publicados entre 2002 e 2022 foram: *Anoplopoma fimbria*, *Gadus morhua*, *Solea solea*, *Thunnus albacares*, *Scomberomorus commerson*, *Lates calcarifer* e *Rastrelliger brachysoma*. Tais espécies, como esperado, são de alto valor comercial. Entretanto, também se percebeu

que fatores como o esgotamento dos estoques de peixes e a oferta menor do que a demanda influenciam na ocorrência de falsificações.

Com relação às falsificações intencionais, as motivações eram, predominantemente, econômicas, apesar de “ocultar espécies ilegais” e “satisfazer a demandado mercado” também terem sido fatores que levaram à ocorrência de falsificações. Além disso, foi observado que as falsificações também ocorrem de forma accidental, devido a erros ao longo da cadeia produtiva.

Quanto aos impactos das falsificações, comprovou-se que troca de espécies em peixes impactam negativamente na economia, na saúde pública e no meio ambiente. Já com relação ao tipo de estabelecimento em que as falsificações normalmente são detectadas, constatou-se que a maioria das falsificações foi encontrada no final da cadeia produtiva, em locais como varejos, restaurantes e peixarias.

Portanto, a falsificação por troca de espécies de peixes é um problema internacional e que pode ocasionar diversos riscos à humanidade. Assim, este estudo auxilia na compreensão do cenário mundial desse tema e analisa o porquê das falsificações serem tão recorrentes, em que estabelecimentos elas geralmente são detectadas e quais espécies de peixes são mais propensas a ser alvo das substituições. Dessa forma, a partir de um maior conhecimento das circunstâncias em que normalmente acontecem as falsificações, torna-se possível adotar medidas para minimizar os fatores que levam à sua ocorrência.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não existir conflitos de interesse.

FINANCIAMENTO

Não declarado pelos autores.

AGRADECIMENTO

Não declarado pelos autores.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Carolina Laipelt Matias: idealização e redação. Andrea Troller Pinto: orientação, revisão e apoio na pesquisa bibliográfica. Juliana Querino Goulart: orientação e revisão. Todos os autores foram responsáveis pela aprovação do documento final ora apresentado.

NOTA DE APRESENTAÇÃO

Não declarado pelos autores.

REFERÊNCIAS

1. Sartori AGO, Amancio RD. Pescado: importância nutricional e consumo no Brasil. Seg Alim Nutr. 2012;19(2):83-93.
<https://doi.org/10.20396/san.v19i2.8634613>

2. Harvard TH Chan, School of Public Health. Omega-3 fatty acids: an essential contribution. Boston (MA): University of Harvard, School of Public Health; 2023. Disponível em: <https://www.hsph.harvard.edu/nutritionsource/what-should-you-eat/fats-and-cholesterol/types-of-fat/omega-3-fats/#:~:text=The%20human%20body%20can%20make,must%20get%20them%20from%20food>
3. Carrera E, Terni M, Montero A, Garcia T, Gonzalez I, Martin R. ELISA-based detection of mislabeled albacore (*Thunnus alalunga*) fresh and frozen fish fillets. Food Agric Immunol. 2014;25(4):569-77. <https://doi.org/10.1080/09540105.2013.858310>
4. Cawthorn DM, Duncan J, Kastern C, Francis J, Hoffman LC. Fish species substitution and misnaming in South Africa: an economic, safety and sustainability conundrum revisited. Food Chem. 2015;185:165-81. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.113>
5. Atos do Poder Executivo (BR). Decreto nº 10.468, de 18 de agosto de 2020. Altera o Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017, que regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre o regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 19 ago 2020. Seção 1(159):5-14.
6. Bénard-Capelle J, Guillonnet V, Nouvian C, Fournier N, Le Loët K, Dettai A. Fish mislabelling in France: substitution rates and retail types. Peer J. 2015;2:e714. <https://doi.org/10.7717/peerj.714>
7. Horreo JL, Fitze PS, Jiménez-Valverde A, Noriega JA, Pelaez ML. Amplification of 16S rDNA reveals important fish mislabeling in Madrid restaurants. Food Control. 2019;96:146-50. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.09.020>
8. Munguia-Vega A, Weaver AH, Dominguez-Contreras JF, Peckham H. Multiple drivers behind mislabeling of fish from artisanal fisheries in La Paz, Mexico. Peer J. 2021;9:e10750. <https://doi.org/10.7717/peerj.10750>
9. Acutis PL, Cambiotti V, Riina MV, Meistro S, Maurella C, Massaro M et al. Detection of fish species substitution frauds in Italy: a targeted national monitoring plan. Food Control. 2019;101:151-5. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.02.020>
10. Blanco-Fernandez C, Ardura A, Masiá P, Rodriguez N, Voces L, Fernandez-Raigoso M et al. Fraud in highly appreciated fish detected from DNA in Europe may undermine the development goal of sustainable fishing in Africa. Sci Rep. 2021;11(1):11423. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91020-w>

11. Cawthorn DM, Steinman HA, Witthuhn RC. DNA barcoding reveals a high incidence of fish species misrepresentation and substitution on the South African market. *Food Res Int.* 2012;46(1):30-40.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.11.011>
12. Changizi R, Farahmand H, Soltani M, Asareh R, Ghiasvand Z. Species identification reveals mislabeling of important fish products in Iran by DNA barcoding. *Iran J Fish Sci.* 2013;12(4):783-91. Disponível em:
<https://aquadocs.org/handle/1834/11666>
13. Chen KC, Zakaria D, Altarawneh H, Andrews GN, Ganesan GS, John KM et al. DNA barcoding of fish species reveals low rate of package mislabeling in Qatar. *Genome.* 2019;62(2):69-76.
<https://doi.org/10.1139/gen-2018-0101>
14. Cutarelli A, Amoroso MG, Roma A, Girardi S, Galiero G, Guarino A et al. Italian market fish species identification and commercial frauds revealing by DNA sequencing. *Food Control.* 2014;37:46-50.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.08.009>
15. Deconinck D, Volckaert FAM, Hostens K, Panicz R, Eljasik P, Faria M et al. A high-quality genetic reference database for European commercial fishes reveals substitution fraud of processed Atlantic cod (*Gadus morhua*) and common sole (*Solea solea*) at different steps in the Belgian supply chain. *Food Chem Toxicol.* 2020;141:111417.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111417>
16. Delpiani G, Delpiani SM, Antoni MYD, Ale MC, Fischer L, Lucifora LO et al. Are we sure we eat what we buy? Fish mislabelling in Buenos Aires province, the largest sea food market in Argentina. *Fisheries Research.* 2020;221:105373.
<https://doi.org/10.1016/j.fishres.2019.105373>
17. Do TD, Choi TJ, Kim J, An HE, Park YJ, Karagozlu MZ et al. Assessment of marine fish mislabeling in South Korea's markets by DNA barcoding. *Food Control.* 2019;100:53-7.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.01.002>
18. Filonzi L, Chiesa S, Vaghi M, Marzano FN. Molecular barcoding reveals mislabelling of commercial fish products in Italy. *Food Research International.* 2010;43(5):1383-8.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.04.016>
19. Filonzi L, Vaghi M, Ardenghi A, Rontani PM, Voccia A, Marzano FN. Efficiency of DNA mini-barcoding to assess mislabeling in commercial fish products in Italy: an overview of the last decade. *Foods.* 2021;10(7):1449.
<https://doi.org/10.3390/foods10071449>

20. Galal-Khallaf A, Ardura A, Mohammed-Geba K, Borrell YJ, Garcia-Vazquez E. DNA barcoding reveals a high level of mislabeling in Egyptian fish fillets. *Food Control*. 2014;46:441-5.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.06.016>
21. Gomes G, Correa R, Veneza I, Silva R, Silva D, Miranda J et al. Forensic analysis reveals fraud in fillets from the “Gurijuba” *Sciades parkeri* (Ariidae – Siluriformes): a vulnerable fish in Brazilian Coastal Amazon. *Mitochondrial DNA Part A*. 2019;30(5):721-9.
<https://doi.org/10.1080/24701394.2019.1622694>
22. Helyar SJ, Lloyd HD, Bruyn M, Leake J, Bennett N, Carvalho GR. Fish product mislabelling: failings of traceability in the production chain and implications for illegal, unreported and unregulated (IUU) fishing. *PLoS One*. 2014;9(6):e98691.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098691>
23. Kappel K, Schröder U. Substitution of high-priced fish with low-priced species: adulteration of common sole in German restaurants. *Food Control*. 2016;59:478-86.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.06.024>
24. Muñoz-Colmenero M, Blanco O, Arias V, Martinez JL, Garcia-Vazquez E. DNA authentication of fish products reveals mislabeling associated with seafood processing. *Fisheries*. 2016;41(3):128-38.
<https://doi.org/10.1080/03632415.2015.1132706>
25. Sameera S, Jose D, Harikrishnan M, Ramachandran A. Species substitutions revealed through genotyping: implications of traceability limitations and unregulated fishing. *Food Control*. 2021;123:107779.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107779>
26. von der Heyden S, Barendse J, Seebregts AJ, Matthee CA. Misleading the masses: detection of mislabelled and substituted frozen fish products in South Africa. *ICES J Mar Sci*. 2010;67(1):176-85.
<https://doi.org/10.1093/icesjms/fsp222>
27. Xiong X, Guardone L, Cornax MJ, Tinacci L, Guidi A, Gianfaldoni D et al. DNA barcoding reveals substitution of Sablefish (*Anoplopoma fimbria*) with Patagonian and Antarctic Toothfish (*Dissostichus eleginoides* and *Dissostichus mawsoni*) in online market in China: how mislabeling opens door to IUU fishing. *Food Control*. 2016;70:380-91.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.06.010>
28. Yan S, Lai G, Li L, Xiao H, Zhao M, Wang M. DNA barcoding reveals mislabeling of imported fish products in Nansha new port of Guangzhou, Guangdong province, China. *Food Chemistry*. 2016;202:116-9.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.133>

29. Feitosa LM, Martins APB, Giarrizzo T, Macedo W, Monteiro IL, Gemaque R et al. DNA-based identification reveals illegal trade of threatened shark species in a global elasmobranch conservation hotspot. Sci Rep. 2018;8:3347.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-21683-5>
30. Fox M, Mitchell M, Dean M, Elliott C, Campbell K. The seafood supply chain from a fraudulent perspective. Food Secur. 2018;10(4):939-63.
<https://doi.org/10.1007/s12571-018-0826-z>
31. Calosso MC, Claydon JAB, Mariani S, Cawthorn DM. Global footprint of mislabelled seafood on a small island nation. Biol Conserv. 2020;245:108557.
<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2020.108557>
32. Jacquet JL, Pauly D. Trade secrets: renaming and mislabeling of seafood. Mar Policy. 2008;32(3):309-18.
<https://doi.org/10.1016/j.marpol.2007.06.007>
33. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BR). Instrução Normativa nº 53, de 1º de Setembro de 2020. Define o nome comum e respectivos nomes científicos para as principais espécies de peixes de interesse comercial destinados ao comércio nacional. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 04 set 2020. Seção 1(171):2-5.
34. Goetz FW, Anulacion BF, Arkoosh MR, Cook MA, Dickhoff WW, Dietrich JP et al. Status of sablefish, *Anoplopoma fimbria*, aquaculture. J World Aquac Soc. 2021;52(3):607-46.
<https://doi.org/10.1111/jwas.12769>
35. Head MA, Keller AA, Bradburn M. Maturity and growth of sablefish, *Anoplopoma fimbria*, along the U.S. West Coast. Fish Res. 2014;159:56-67.
<https://doi.org/10.1016/j.fishres.2014.05.007>
36. Friesen EN, Balfry SK, Skura BJ, Ikonomou MG, Higgs DA. Evaluation of cold-pressed flaxseed oil as an alternative dietary lipid source for juvenile sablefish (*Anoplopoma fimbria*). Aquac Res. 2011;44(2):182-99.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.03022.x>
37. Vasquez I, Cao T, Hossain A, Valderrama K, Gnanagobal H, Dang M et al. *Aeromonas salmonicida* infection kinetics and protective immune response to vaccination in sablefish (*Anoplopoma fimbria*). Fish Shellfish Immunol. 2020;104:557-66.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.06.005>
38. Rose GA. Reconciling overfishing and climate change with stock dynamics of Atlantic cod (*Gadus morhua*) over 500 years. Can J Fish Aquat Sci. 2004;61(9):1553-7.
<https://doi.org/10.1139/f04-173>

39. Herrero B, Madriñán M, Vieites JM, Espiñeira M. Authentication of Atlantic cod (*Gadus morhua*) using real time PCR. J Agric Food Chem. 2010;58(8):4794-9.
<https://doi.org/10.1021/jf904018h>
40. Norberg B, Brown CL, Halldorsson O, Stensland K, Bjornsson BT. Photoperiod regulates the timing of sexual maturation, spawning, sex steroid and thyroid hormone profiles in the Atlantic cod (*Gadus morhua*). Aquaculture. 2004;229(1-4):451-67.
[https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00393-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00393-4)
41. Tanner SE, Vasconcelos RP, Reis-Santos P, Cabral HN, Thorrold SR. Spatial and ontogenetic variability in the chemical composition of juvenile common sole (*Solea solea*) otoliths. Estuar Coast Shelf Sci. 2011;91(1):150-7.
<https://doi.org/10.1016/j.ecss.2010.10.008>
42. Parma L, Bonaldo A, Massi P, Yúfera M, Martínez-Rodríguez G, Gatta PP. Different early weaning protocols in common sole (*Solea solea* L.) larvae: implications on the performances and molecular ontogeny of digestive enzyme precursors. Aquaculture. 2013;414-415:26-35.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.07.043>
43. Lacroix G, Maes GE, Bolle LJ, Volckaert FAM. Modelling dispersal dynamics of the early life stages of a marine flatfish (*Solea solea* L.). J Sea Res. 2013;84:13-25.
<https://doi.org/10.1016/j.seares.2012.07.010>
44. Li W, Chen X, Xu Q, Zhu J, Dai X, Xu L. Genetic population structure of *Thunnus albacares* in the Central Pacific Ocean based on mtDNA COI gene sequences. Biochem Genet. 2015;53(1-3):8-22.
<https://doi.org/10.1007/s10528-015-9666-0>
45. Anderson G, Lal M, Hampton J, Smith N, Rico C. Close kin proximity in yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) as a driver of population genetic structure in the Tropical Western and Central Pacific Ocean. Front Mar Sci. 2019;6:341.
<https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00341>
46. Collette BB, Carpenter KE, Polidoro BA, Juan-Jordá MJ, Boustany A, Die DJ et al. High value and long life: double jeopardy for tunas and billfishes. Science. 2011;333(6040):291-2.
<https://doi.org/10.1126/science.1208730>
47. Al-Hosni AHS, Siddeek SM. Growth and mortality of the narrowbarred Spanish Mackerel, *Scomberomorus commerson* (Lacepède), in Omani waters. Fish Manag Ecol. 1999;6(2):145-60.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2400.1999.00134.x>

48. Yang R, Han M, Fu Z, Wang Y, Zhao W, Yu G et al. Immune responses of Asian seabass *Lates calcarifer* to dietary *Glycyrrhiza uralensis*. *Animals*. 2020;10(9):1629.
<https://doi.org/10.3390/ani10091629>
49. Banerjee I, Sadhu T, Mukherjee R, Bhattacharjee A, Chakrabarty J. Nutritional consequences of sun-drying, freezing, and frying of *Lates calcarifer* on human health. *J Indian Chem Soc*. 2021;98(10):100158.
<https://doi.org/10.1016/j.jics.2021.100158>
50. Tan CW, Malcolm TTH, Kuan CH, Thung TY, Chang WS, Loo YY et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from short mackerels (*Rastrelliger brachysoma*) in Malaysia. *Front Microbiol*. 2017;8:1087.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01087>
51. Senarat S, Kettratad J, Jiraungkoorskul W, Kangwanrangsan N, Amano M, Shimizu A et al. Distribution and changes in the sbGnRH system in *Rastrelliger brachysoma* males during the breeding season. *Sci Mar*. 2021;85(3):187-95.
<https://doi.org/10.3989/scimar.05023.017>
52. Ximenes LF. Produção de pescado no Brasil e no nordeste brasileiro. *Cad Set ETENE*. 2021;5(150). [acesso 2023 Jun 05]. Disponível em:
https://www.bnb.gov.br/s482-dspace/bitstream/123456789/649/1/2021_CDS_150.pdf
53. Lopes IG, Oliveira RG, Ramos FM. Perfil do consumo de peixes pela população brasileira. *Biota Amazônia*. 2016;6(2):62-5.
<http://dx.doi.org/10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v6n2p62-65>
54. Marko PB, Lee SC, Rice AM, Gramling JM, Fitzhenry TM, McAlister JS et al. Mislabelling of a depleted reef fish. *Nature*. 2004;430(6997):309-10.
<https://doi.org/10.1038/430309b>
55. Gold JR, Voelker G, Renshaw MA. Phylogenetic relationships of tropical western Atlantic snappers in subfamily Lutjaninae (Lutjanidae: Perciformes) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Biol J Linn Soc Lond*. 2011;102(4):915-29.
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2011.01621.x>
56. Pinto A, Marchetti P, Mottola A, Bozzo G, Bonerba E, Ceci E et al. Species identification in fish fillet products using DNA barcoding. *Fish Res*. 2015;170:9-13.
<https://doi.org/10.1016/j.fishres.2015.05.006>
57. Cline E. Marketplace substitution of Atlantic salmon for Pacific salmon in Washington State detected by DNA barcoding. *Food Res Int*. 2012;45(1):388-93.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.10.043>

58. Xiong X, Yao L, Ying X, Lu L, Guardone L, Armani A et al. Multiple fish species identified from China's roasted Xue Yu fillet products using DNA and mini-DNA barcoding: implications on human health and marine sustainability. *Food Control*. 2018;88:123-30.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.12.035>
59. Miller DD, Clarke M, Mariani S. Mismatch between fish landings and market trends: a western European case study. *Fish Res*. 2012;121-122:104-14.
<https://doi.org/10.1016/j.fishres.2012.01.016>
60. Worm B, Barbier EB, Beaumont N, Duffy JE, Folke C, Halpern BS et al. Impacts of biodiversity loss on ocean ecosystem services. *Science*. 2006;314(5800):787-90.
<https://doi.org/10.1126/science.1132294>
61. Cheung WWL, Watson R, Pauly D. Signature of ocean warming in global fisheries catch. *Nature*. 2013;497(7449):365-8.
<https://doi.org/10.1038/nature12156>
62. Bryndum-Buchholz A, Tittensor DP, Blanchard JL, Cheung WWL, Coll M, Galbraith ED et al. Twenty-first-century climate change impacts on marine animal biomass and ecosystem structure across ocean basins. *Glob Chang Biol*. 2018;25(2):459-72.
<https://doi.org/10.1111/gcb.14512>
63. Worm B, Hilborn R, Baum JK, Branch TA, Collie JS, Costello C et al. Rebuilding global fisheries. *Science*. 2009;325(5940):578-85.
<https://doi.org/10.1126/science.1173146>
64. Pauly D, Watson R, Alder J. Global trends in world fisheries: impacts on marine ecosystems and food security. *Phil Trans R Soc B*. 2005;360(1453):5-12.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2004.1574>
65. Martinsohn JT, Raymond P, Knott T, Glover KA, Nielsen EE, Eriksen LB et al. DNA-analysis to monitor fisheries and aquaculture: too costly? *Fish and Fisheries*. 2019;20(2):391-401.
<https://doi.org/10.1111/faf.12343>
66. Lima FC, Mesquita EFM. Fraudes detectadas na comercialização de pescado no município de Niterói, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Rev Bras Cienc Vet*. 1996;3(2):39-43.
<https://doi.org/10.4322/rbcv.2015.042>
67. Anjos NF, Tomita RY. Estudo do valor nutricional do pescado visando agregação de valor e estímulo ao seu consumo. VII Simpósio de Controle de Qualidade do Pescado; outubro de 2016; São Paulo: Universidade Católica de Santos. Disponível em:
https://www.researchgate.net/publication/311793865_Estudo_do_Valor_Nutricional_do_Pescado_Visando_Agregacao_de_Valor_e_Estimulo_ao_seu_Consumo

68. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Manual identifica espécies de peixes para ajudar no combate à fraude. Brasília. 2016 [acesso 2023 Jun 05]. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/manual-identifica-especies-de-peixes-para-ajudar-no-combate-a-fraude>
69. Focardi S. Levels of mercury and polychlorobiphenyls in commercial food in Siena Province (Tuscany, Italy) in the period 2001-2010. Microchem J. 2012;105:60-4. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2012.01.013>
70. Giusti A, Castigliero L, Rubino R, Gianfaldoni D, Guidi A, Armani A. A conventional multiplex PCR assay for the detection of toxic gemfish species (*Ruvettus pretiosus* and *Lepidocybium flavobrunneum*): a simple method to combat health frauds. J Agric Food Chem. 2016;64(4):960-8. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04899>
71. Cohen NJ, Deeds JR, Wong ES, Hanner RH, Yancy HF, White KD et al. Public health response to puffer fish (tetrodotoxin) poisoning from mislabeled product. J Food Prot. 2009;72(4):810-7. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.4.810>
72. Garcia-Vazquez E, Machado-Schiaffino G, Campo D, Juanes F. Species misidentification in mixed hake fisheries may lead to overexploitation and population bottlenecks. Fish Res. 2012;114:52-5. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2011.05.012>
73. Nedunoori A, Turanov SV, Kartavtev YP. Fish product mislabeling identified in the Russian far east using DNA barcoding. Gene Rep. 2017;8:144-9. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2017.07.006>
74. Brito MA, Schneider H, Sampaio I, Santos S. DNA barcoding reveals high substitution rate and mislabeling in croaker fillets (Sciaenidae) marketed in Brazil: the case of “pescada branca” (*Cynoscion leiarchus* and *Plagioscion squamosissimus*). Food Res Int. 2015;70:40-6. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.01.031>
75. Veneza I, Silva R, Freitas L, Silva S, Martins K, Sampaio I et al. Molecular authentication of Pargo fillets *Lutjanus purpureus* (Perciformes: Lutjanidae) by DNA barcoding reveals commercial fraud. Neotrop Ichthyol. 2018;16(1):e170068. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20170068>
76. Staffen CF, Staffen MD, Becker ML, Lofgren SE, Muniz YCN, Freitas RHA et al. DNA barcoding reveals the mislabeling of fish in a popular tourist destination in Brazil. Peer J. 2017;5:e4006. <https://doi.org/10.7717/peerj.4006>

77. Galimberti A, Mattia F, Losa A, Bruni I, Federici S, Casiraghi M et al. DNA barcoding as a new tool for food traceability. Food Res Int. 2013;50(1):55-63.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.09.036>
78. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Manual de inspeção para identificação de espécies de peixes e valores indicativos de substituições em produtos da pesca e aquicultura. Brasília. 2022 [acesso 2023 Jun 05]. Disponível em:
<https://wikisda.agricultura.gov.br/pt-br/Inspe%C3%A7%C3%A3o-Animal/Manual-de-procedimentos-de-inspecao-e-fiscalizacao-de-pescado-e-derivados-em-estabelecimentos-sob-inspecao-federal>
79. Carvalho DC, Guedes D, Trindade MG, Coelho RMS, Araujo PHL. Nationwide Brazilian governmental forensic programme reveals seafood mislabelling trends and rates using DNA barcoding. Fish Res. 2017;191:30-5.
<https://doi.org/10.1016/j.fishres.2017.02.021>
80. Ministério da Agricultura e Pecuária – MAPA. Operação Semana Santa fiscaliza qualidade do pescado em 23 estados e no DF. Brasília. 2023 [acesso 2023 Jun 05]. Disponível em:
<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/operacao-semana-santa-fiscaliza-qualidade-do-pescado-em-23-estados-e-no-df>





Performance of the tetra-primer PCR technique compared to PCR-RFLP in the search for rs12979860 (C/T) and rs8099917 (T/G) single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *IFNL4* gene

Desempenho da técnica tetra-*primer* PCR em relação a PCR-RFLP na pesquisa de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) rs12979860 (C/T) e rs8099917 (T/G) no gene *IFNL4*

Ellen Hochleitner de Souza Kindermann¹, Karoline Rodrigues Campos^{1,2} , Adele Caterino-de-Araujo^{1*} 

¹ Laboratório de Pesquisa em HTLV, Centro de Imunologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil.

² Laboratório Estratégico, Centro de Respostas Rápidas, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil.

*Corresponding author/Autor de correspondência: adele.caterino@ial.sp.gov.br

Received/Recebido: 28.02.2023 – Accepted/Aceito: 04.04.2023

ABSTRACT

Single nucleotide polymorphisms (SNPs, rs12979860 e rs8099917) in the Interferon Lambda 4 gene (*IFNL4*, formerly *IFNL3* and/or *IL28B*) has been associated with failure in the innate immune response, sustained virological response in hepatitis C, and HTLV-1-associated myelopathy (HAM) development. To search for these polymorphisms several methodologies can be employed, such as sequencing, real-time or quantitative polymerase chain reaction (qPCR), restriction fragment length polymorphism analysis in PCR products (PCR-RFLP), and tetra-primer PCR. The present study compared the performance of the tetra-primer PCR in relation to the PCR-RFLP, both optimized in the Research HTLV Laboratory of the Center of Immunology of Instituto Adolfo Lutz in São Paulo. One hundred DNA samples obtained from patients of STD/Aids Reference Centre in São Paulo, previously analyzed for *IL28B* SNPs by PCR-RFLP were selected for analysis, after confirming that they represent all *IL28B* SNPs patterns described in the literature. The results obtained showed concordance between the PCR-RFLP and the tetra-primer PCR SNPs results, and because of the low cost, easy to perform, and minor employment of biological specimen and reagents, the tetra-primer PCR is of choice to be used in routine.

Keywords. Interferon Lambda 4 (IFNL4), Interleukin 28B (IL28B), Single Nucleotide Polymorphism (SNP), Polymerase Chain Reaction (PCR), Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis, Cost Analysis.

RESUMO

Polimorfismos de nucleotídeos únicos (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs rs12979860 e rs8099917) no gene que codifica o Interferon Lambda 4 (*IFNL4*, antigamente *IFNL3* e/ou *IL28B*) têm sido associados às falhas na resposta imune inata e resposta virológica sustentada na hepatite C, e a mielopatia associada ao HTLV-1 (*HTLV-1-associated myelopathy*, HAM). A pesquisa destes polimorfismos pode empregar diversas metodologias: sequenciamento, reação em cadeia da polimerase em tempo real ou quantitativa (*quantitative polymerase chain reaction*, qPCR), análise de fragmentos de restrição enzimática em produtos de PCR (*restriction fragment length polymorphism in PCR products*, PCR-RFLP) e a tetra-*primer* PCR. Este estudo comparou o desempenho da tetra-*primer* PCR em relação a PCR-RFLP, ambas otimizadas no Laboratório de Pesquisa em HTLV do Centro de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo. Foram selecionadas 100 amostras de DNA obtidas de pacientes do Centro de Referência e Treinamento em DST/Aids de São Paulo cujos SNPs na *IL28B* foram anteriormente determinados por PCR-RFLP e representaram todos os perfis descritos em literatura. Os resultados obtidos mostraram concordância entre elas, e pelo fato da tetra-*primer* PCR ter menor custo, ser de fácil execução, empregar menos tempo, insumos e material biológico, é a técnica de escolha para uso em rotina.

Palavras-chave. Interferon Lambda 4 (IFNL4), Interleucina 28B (IL28B), Polimorfismo de Nucleotídeo Único (SNP), Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), Polimorfismos de Fragmentos de Restrição (RFLP), Análise de Custo.

INTRODUCTION

The interferon lambda 4 gene (*IFNL4*) is one of the most recent human genes discovered and the last added to the interferon lambda family¹. The official symbols for the interferon lambda family genes are *IFNL1* (formerly *IL29*), *IFNL2* (formerly *IL28A*), *IFNL3* (formerly *IL28B*) and *IFNL4*. These genes are located on the long arm of chromosome 19, region q13+13^{1,2}. The *IFNL3* (*IL28B*) gene sequence had been described to have similarity of 96% and 81% with *IFNL2* (*IL-28A*) and *IFNL1* (*IL-29*) genes, respectively²⁻⁴.

The proteins encoded by interferon lambda family genes bind to a shared co-receptor complex, leading to activation of the JAK-STAT signaling pathway and upregulating of numerous interferon-stimulated genes¹. These proteins are involved in immune mechanisms, from cell stimulation/activation to cytokines self-production in response to an antigen, as occurs in inflammatory and degenerative processes (pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines).

Commins et al⁴ pointed the antiviral activity of the Interleukin 28B (*IL28B*) mainly in viral infections caused by hepatitis B virus (HBV) and hepatitis C virus (HCV), and other researchers in HIV and in human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) infections⁵⁻⁸.

Due to the antiviral activity of *IFNL3/IL28B*, IFN- α (the first drug to demonstrate activity against HCV) was developed by using biosynthetic processes. Later, in order to improve the IFN- α pharmacokinetics, an addition of bis-mono methoxy polyethylene glycol (PEG) in its chemical structure, originated PEG-IFN- α ⁹. Even with this drug change, the treatment was not operative because the adverse effects and poor adherence. In addition, low frequency (around 55%) of sustained virological response (SVR), which means undetectable plasmatic HCV RNA after 12-24 weeks of therapy, was detected in patients undergoing treatment¹⁰. Currently, direct acting antiviral agents (DAAs) that target specific HCV proteins involved in viral replication and assembly are available for treatment, but until 2013, the universal therapeutic scheme was based on PEG-IFN- α with or without ribavirin (RBV); the same scheme recommended by the Brazilian Ministry of Health¹¹.

During follow-up of patients with HCV infection, different response profiles were observed; good responders denoting patients who had spontaneous viral load clearance or SVR after treatment, and poor responders in cases of therapeutic failure. Such different responses have been linked to a combination of viral and host factors^{12,13}. Viral factors refer mainly to the HCV genotype and viral load (HCV RNA levels), and host factors to ethnicity, sex, age, body mass index (BMI), and single nucleotide polymorphisms (SNPs); the last one pointed out as early markers of treatment success and SVR^{12,13}.

In fact, genome-wide association studies (GWASs) of *IL28B* with response to PEG-IFN- α treatment identified the SNPs rs12979860 and rs8099917 as useful pharmacogenetics tool for prediction of hepatitis C treatment response (HCV clearance and SVR) when applied to populations from different geographic regions¹⁴⁻¹⁶. These SNPs were firstly located in a genomic region of 24 Kb between the *IFNL2* and *IFNL3* genes, more precisely, at the 3 Kb (rs12979860) and 8 Kb (rs8099917) positions that precede *IFNL3*¹⁷, but after the discovery of *IFNL4* they were repositioned within intron 1 of *IFNL4* (rs12979860), and in an intergenic region near to and upstream of *IFNL4* (rs8099917)¹. The polymorphism at the rs12979860 position represented by the CC, TT or CT genotypes, disclosed the C allele as associated with a better response to HCV infection treatment^{14,18}, while the polymorphism at position rs8099917 represented by TT, GG or TG genotypes, associates the G allele with a higher risk for hepatitis C disease chronicity^{15,16,19}.

As the treatment based on PEG-IFN- α with or without association with RBV was expensive and had many adverse effects causing patients abandon of treatment, it was recommended to research the SNPs rs12979860 and rs8099917 before starting therapy. Regardless of others important and unusual polymorphisms that control the generation of IFNL4 protein have been detected recently, like the *IFNL4*- $\Delta G/TT$ (rs368234815) variant within exon 1, the rs12979860 and rs8099917 SNPs whose are in linkage disequilibrium with *IFNL4*- $\Delta G/TT$ continue to be important predicted markers associated with HCV clearance¹.

The determination of such polymorphisms can be performed by many methods; genetic sequencing, real-time or quantitative polymerase chain reaction (qPCR), restriction fragment length polymorphism analysis in PCR products (RFLP-PCR), and amplification-refractory mutation system-polymerase chain reaction / tetra-primer polymerase chain reaction (ARMS-PCR/tetra-primer PCR). The choice of the method to be used for SNPs searching will depend on the facilities and equipment available in the laboratory. Furthermore, it should take into account the quantity of inputs and biological material, as well as the training of its technical staff. Therefore, in regions and countries with a lot of financial resources, sequencing, and qPCR techniques (commercially available) can be used without problems, but in conditions of low financial resources, PCR-RFLP and tetra-primer PCR techniques seem to be a great alternative.

Briefly, the PCR-RFLP technique consists of PCR amplification of a DNA region of interest and subsequent enzymatic restriction. For PCR, a pair of specific primers is used to amplify the target region. After confirming the amplification of the specific product by agarose gel electrophoresis, these amplicons are incubated with restriction endonucleases that recognize and cut specific sites (usually four to six base pairs) in a DNA sequence, generating fragments that can be separated on a gel mesh (agarose or polyacrylamide) after electrophoresis according to its size²⁰. The genotype profiles are analyzed after the second electrophoresis and are discriminated according to the fragments presented. Polymorphisms in homozygosis (wild-type and mutant) have distinct fragments profiles, while heterozygosis for the same SNP combines the profile of both.

The tetra-primer PCR differs from the conventional reaction by using four primers in a single step. Two outer primers and two inner primers, both with forward and reverse. The outer primers amplify a larger fragment that comprises the region where the SNPs are to be identified and function as an amplification control. While the forward and reverse combination between the inner and outer primer [(inner-forward and outer-reverse) or (outer-forward and inner-reverse)] amplify smaller products corresponding to the specific alleles of the studied polymorphism^{21,22}. The high specificity of this technique depends on an error in the second nucleotide of the 3' end of the inner primers (allele-specific). This mistake destabilizes the sharing of the polymorphic base between the primers and the target region, increasing the specificity of the reaction and minimizing false-positive results²¹. Identification of genotypes occurs by analysis of PCR products, separated in the agarose gel after electrophoresis. The interpretation of products according to size in base pairs (bp) is specific for the control and each allele. In cases of homozygous genotypes, two bands are seen, one referring to the control (larger segment) and the other to the specific allele. Samples with heterozygosis present in addition to the control band, two bands indicative of the alleles^{23,24}.

Based on the above descriptions, the HTLV Research Laboratory of the Center of Immunology of Institute Adolfo Lutz standardized in 2015 the PCR-RFLP technique for searching *IL28B* SNPs rs12979860 and rs8099917 according to the protocols from Moreira et al²⁵. However, due to the high cost of restriction

endonucleases and the scarcity of biological material from patients, this Laboratory has been concerned with standardizing another technique that use less DNA inputs and reagents. Thus, the present study aimed to optimize the tetra-primer PCR and compare its performance in relation to the PCR-RFLP technique.

MATERIAL AND METHODS

Study design and samples

The samples came from a cross-sectional study that investigated the prevalence of HTLV-1/2 in patients attended at the Reference and Training Center for STD/Aids (CRT DST/Aids) in São Paulo. 1,608 patients agreed to participate, and signed the Informed Consent which included the search for *IL28B* SNPs rs12979860 and rs8099917. The project was approved by the Ethics Committees for Research of Instituto Adolfo Lutz under protocols number CTC # 106D/2012 and by the Brazilian Ministry of Health CAAE # 11302512.0.0000.0059. DNA samples from the blood of 100 patients (50 HIV single-infected and 50 HIV/HCV co-infected) whose SNPs profiles (rs12979860 and rs8099917) were previously determined by PCR-RFLP and showed all genotypes described in literature were employed in the present study (project approved by the Ethics Committees for Research of Instituto Adolfo Lutz under protocols number CTC # 62H/2015 and the Brazilian Ministry of Health CAAE # 52493316.1.0000.0059). No data that could identify the patients were presented. All procedures were performed following the principles established in the Declaration of Helsinki of 1975, as revised in 1983, 1989, 1996, and 2000.

Methods

DNA extraction

DNA extractions were performed from peripheral blood leukocytes, using the Roche robotic system which consists of purification by magnetic beads (MagNA Pure LC 2.0 extractor) and/or the MagNA Pure LC DNA isolation kit I (Roche Diagnostics GmbH – Roche Applied Science-Mannheim, Germany), following the manufacturers' instructions.

PCR-RFLP

Briefly, in the PCR reaction, primers IL28B-860F - 5' AGC AGG ACA GAT TGG CAA AG 3' and IL28B-860R - 5' CAC AAT TCC CAC CAC GAG AC 3' were used for SNP rs12979860, and primers IL28B-917F - 5' CTG GAA CAA ATC GTC CCA AT 3' and IL28B-917R - 5' TTC CTT TAG GCC TGT GGA TG 3' for SNP rs8099917; they amplify products of 694 bp and 496 bp, respectively. The PCR reactions employed protocols adapted from Moreira et al²⁵. Briefly, 50-500 ng of DNA template, 1U of *Taq* DNA polymerase, 200 µM of each dNTPs, 1.5 mM of MgCl₂, PCR buffer, 10 pmol of each primer were added to a final volume of 50 µL of reaction. For rs12979860 5% DMSO was added. The primer annealing temperature was 59 °C for rs12979860 and 57.5 °C for rs8099917. Cycling was performed in a PTC 100TM MJ Research device, using temperatures of 94 °C for 3 min, followed by 40 cycles of 94 °C for 30 s, 59 or 57.7 °C for 30 s and 72 °C for 1 min. The final extension took place at 72 °C for 7 min. The restriction enzymes used for RFLP were *Hpy166II* (37 °C for 2 h) and *BsrDI* (65 °C for 2 h), both from New England Biolabs Inc. The reaction products were visualized in 2% and 3% agarose gels, respectively (**Figure 1**).

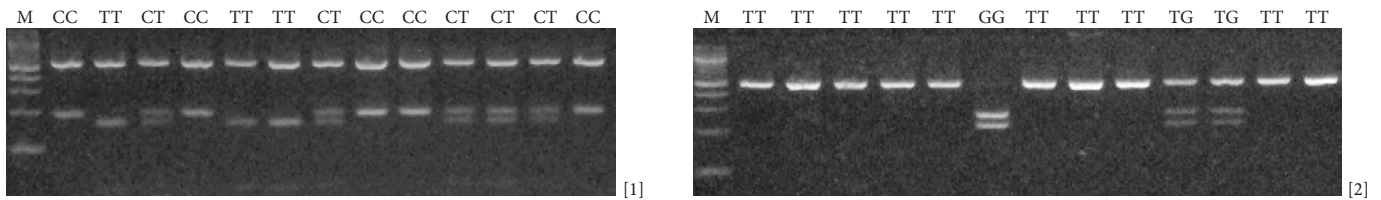


Figure 1. PCR-RFLP electrophoretic patterns related to *IFNL4* (*IL28-B*) SNP rs12979860 [1] and rs8099917 [2] after digestion by *Hpy*166II, and *Bsr*DI, respectively

Legend: [1] SNP rs12979860; M, molecular size marker (100 bp Ladder); CC genotype products of 509 bp and 185 bp; CT genotype products of 509 bp, 185 bp, and 155 bp; TT genotype products of 509bp and 155 bp; [2] SNP rs8099917; M, molecular size marker (100 pb Ladder); TT genotype products of 496 bp; TG genotype products of 496 bp, 272 bp, and 224 bp; GG genotype products of 272 bp and 224 bp

Source: Laboratório de Pesquisa em HTLV

Tetra-primer PCR

The technique described by Delvaux et al²³ was employed and adapted for the reagents and conditions of the HTLV Research Laboratory of the Center of Immunology, Instituto Adolfo Lutz.

For rs12979860, primers ARMS 860F1 (outer forward) CCA GGG CCC CTA ACC TCT GCA CAG TCT G, ARMS 860R1 (outer reverse) CTA TGT CAG CGC CCA CAA TTC CCA CCA C, ARMS 860F2T (inner forward) ACT GAA CCA GGG ACG TCC CCG AAG GAG T, and ARMS 860R2C (inner reverse) CGG AGT GCA ATT CAA CCC TGG TGC G were used, and for rs8099917, primers ARMS 917F1 (outer forward) CAT CAC CTA TAA CTT CAC CAT CCT CCT C, ARMS 917R1 (outer reverse) GGT ATC AAC CCC ACC TCA AAT TAT CCT A, ARMS 917F2C (inner forward) CTT TTG TTT TCC TTT CTG TGA GCA GTG, and ARMS 917R2T (inner reverse) TAT ACA GCA TGG TTC CAA TTT GGG TAA A. The PCR reactions were conducted with 3 μ L of DNA, 0.6 μ L (inner reverse) primers, 0.8 μ L (inner forward) primers, and 0.2 μ L (outer reverse e outer forward) primers, 10 μ L of Go *Taq* Colorless master mix (Promega Corporation, USA), $MgCl_2$, and ultrapure water, in a total volume of 20 μ L.

The temperature for the annealing of both sets of primers was defined at 64 $^{\circ}C$ for rs12979860 and 54.5 $^{\circ}C$ for rs8099917. The best results were obtained with the initial denaturation at 94 $^{\circ}C$ for 5 min; followed by 35 cycles, including denaturation at 94 $^{\circ}C$ for 30 s; annealing for 30 s; extension at 72 $^{\circ}C$ for 1 min, and a final extension step at 72 $^{\circ}C$ for 10 min. The DNA tetra-primer PCR products were visualized on 3% agarose gels with SyberSafe[®] (Invitrogen). For SNPs rs12979860 products of 277 pb (control); 198 bp (T allele) and 132 bp (C allele) were detected, and for rs8099917 products of 437 bp (control); 295 bp (T allele), and 197 bp (G allele).

RESULTS

For the tetra-primer PCRs optimization, several primers temperatures for the annealing were tested; 56 $^{\circ}C$ to 76 $^{\circ}C$ for rs12979860, and 53 $^{\circ}C$ to 57 $^{\circ}C$ for rs8099917. The same was conducted for $MgCl_2$ concentrations (1.5 mM to 3.0 mM), inner primers (0.1 pmol to 0.4 pmol) and DNA input (2 μ L and 3 μ L).

The best results were obtained using 3.0 mM of $MgCl_2$; temperature of primers annealing of 64 $^{\circ}C$ and 54.5 $^{\circ}C$ (rs12979860 and rs8099917, respectively); concentration of primers: 0.3 pmol of each inner primers, except for inner forward rs12979860 (0.4 pmol), and 3 μ L of DNA input (**Figures 2 and 3**).

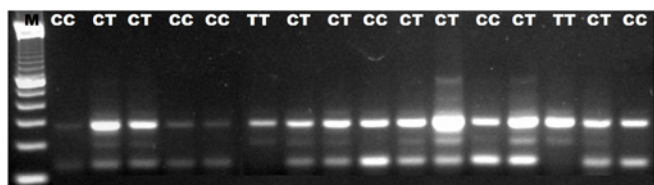


Figure 2. *IFNL4* (*IL28B*) genotypes profiles for SNPs rs12979860.

Legend: M, molecular size marker (100 bp DNA Ladder); CC genotype (products of 277 bp and 132 bp); CT genotype (products of 277 bp, 198 bp, and 132 bp); TT genotype (products of 277 bp and 198 bp)

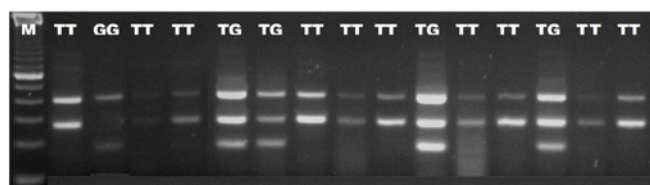


Figure 3. *IFNL4* (*IL28B*) genotypes profiles for SNPs rs8099917

Legend: M, molecular size marker (100 bp DNA Ladder); TT genotype (products of 437 bp and 295 bp); TG genotype (products of 437 bp, 295 bp, and 197 bp); GG genotype (products of 437 bp and 197 bp)

After tetra-primer PCR optimization, 100 DNA samples whose SNPs rs12979860 e rs8099917 patterns had been determined by PCR-RFLP were now analyzed by tetra-primer PCR, and the results obtained were 100% concordant.

It is important emphasize that although the low number of samples analyzed, all genotypes for both SNPs were correctly identified. The frequencies detected were: 35% (CC), 46% (CT), and 19% (TT) for rs12979860, and 72% (TT), 24% (TG), and 4% (GG) for rs8099917. In relation to the allelic distribution, the majority of wild alleles were detected: C (58%) and T (84%) for rs12979860 and rs8099917, respectively.

In order to choose the best technique to be employed as routine, an analysis of cost was conducted. **Table** shows the parameters analyzed for comparing the PCR-RFLP and tetra-primer PCR. The tetra-primer PCR disclosed a reduction of 45.5% in the cost of SNPs genotyping taking into account only the value of reagents and technical handle, without computing the required equipment.

Table. Comparative analysis of the PCR-RFLP and tetra-primer PCR techniques applied for *IFNL4* (formerly *IFNL3* and/or *IL28B*) genotyping SNPs rs12979860 and rs8099917

Parameters	PCR-RFLP	tetra-primer PCR
	(rs12979860 and rs8099917)	(rs12979860 and rs8099917)
PCR (number of reactions)	2	2
Enzymatic digestion (number of reaction)	2	–
Electrophoresis (number of reactions)	2	1
DNA input (µL)	10	6
Time of reactions (hours)	10	5.5
Cost of PCR (R\$)*	3.20	6.17
Cost of RFLP (R\$)*	5.29	–
Cost of electrophoresis (R\$)*	82.80	41.40
Cost of technical work [R\$ (R\$ 40.00/hour)]*	400.0	220.0
Total cost [R\$* (2 SNPs)]	491.29	267.57

Legend: N, number; R\$, real; * values in real in April 2023

DISCUSSION AND CONCLUSION

Currently, the determination of SNPs has a wide arsenal of molecular methods. The choice of the best technique to be applied in routine laboratory depends on the advantages and disadvantages the technique present, allowing adaptation to the particularities of each laboratory.

The gold standard of molecular techniques is genetic sequencing, especially when there is a need to know or discriminate the nucleotide present in a specific position (mutation), as is the case with polymorphisms. However, it is a laborious methodology, requires specialized technicians to analyze the results, in addition to being quite expensive²²⁻²⁵.

Since analysis of single nucleotide mutations on a large scale (routine laboratory) is difficult by sequencing, other techniques have been standardized. The qPCR showed high sensitivity, specificity and 100% agreement with the sequencing, indicating that it is the best choice, aiming at practicality, as it has the shortest execution time (about 130 minutes) and low risk of contamination^{23,26,27}. In addition, it is a closed system with ease of automation, eliminating post-amplification manipulation and allowing the reading of results with the software in real time²⁸. However, commercial kits and even in-house reactions are expensive, due to the fluorescent chemistries that allow the interpretation of the results, in addition to the maintenance and calibration of thermal cyclers coupled with a fluorescence reader, specific for real-time PCR²³.

In an attempt to reduce costs and make SNP research more accessible, some PCR reactions followed by enzyme restriction to identify genotypes were standardized, as they used only conventional thermocyclers and electrophoresis equipment. Comparing the PCR-RFLP results with those obtained by sequencing, 100% of agreement were found, which demonstrated the good performance of the technique^{17,23,29,30}. Unlike qPCR, in this reaction, there is manipulation of amplified material (electrophoresis and preparation of mix for digestion), which increases the risk of contamination. Also, a lot of time is used for the reaction, due to the various steps and the incubation with the enzyme, taking around 10 hours until the final result. Another disadvantage relates to the endonucleases that differentiate the mutation in each SNPs, they are usually very expensive and depend on importation most of the time²³. In particular, the protocol previously used in the laboratory (adapted from Moreira et al)²⁵, still presented as a limiting factor, the required volume of DNA sample [10µL for the two polymorphisms (rs12979860 and rs8099917)].

Because it is a simple, fast, economical technique that does not require elaborate equipment, tetra-primer PCR has been increasingly used in polymorphism research. Studies that compared its performance in relation to the gold standard genotyping methodology of rs12979860 and rs8099917 found 98% to 100% agreement of results^{22-24,30}. The relatively short execution time (approximately 5 hours) is another of its advantages, being superior only to the qPCR performance time. In addition, it is a very safe reaction, as it manipulates amplicons only once during application on the gel for electrophoresis and is economical in terms of DNA input (3 µL per test)²³.

In the present study, comparative analysis of cost-effectiveness between PCR-RFLP and tetra-primer PCR methodologies that considered some operational characteristics, reagent costs and technical fees in the genotyping of SNPs (rs12979860 and rs8099917), disclosed the tetra-primer PCR the best one. It was cheaper, had a shorter execution time, and 100% agreement with PCR-RFLP results.

Delvaux et al²³ evaluated the cost-effectiveness of four molecular techniques [Sanger sequencing (US\$ 202.80); qPCR (US\$ 22.90); PCR-RFLP (US\$ 27.80) and tetra-primer PCR (US\$ 19.40)] for genotyping rs12997860 and rs8099917. They also found the tetra-primer to be the best cost/benefit methodology, highlighting the ease of its implementation in laboratories with little routine or with scarce financial resources, common in developing countries. The same was observed by Fateh et al³⁰ who evaluated three methods in relation to cost and turn-around time: direct sequencing, PCR-RFLP and ARMS-PCR (tetra-primer PCR). The authors excluded the value of sample extraction, as it is common in all three methods, and estimated the costs of US\$ 4.70 for PCR-RFLP, US\$ 3.10 for ARMS-PCR, and US\$ 16.20 for sequencing, and the turn-around time of 6 hours and 45 minutes for PCR-RFLP, 2 hours and 40 minutes for ARMS-PCR, and 2 days for sequencing. Thus, they concluded that the ARMS-PCR was the most efficient and reliable method to determine polymorphisms in routine clinical practice.

Regarding the different costs of each methodology disclosed here, we have to consider that the technical fees, equipment, inputs and the value of imported products (US\$) differ depending on the country, but despite these differences, all studies point to tetra-primer PCR as the best in terms of cost-benefit.

Due to the simplicity, safety and low cost of tetra-primer PCR, it is a good choice for routine use in Public Health Laboratories, where human and financial resources, as well as sample volumes are limited.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest.

FUNDING

This research has been financed by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) grants #2016/03654-0, and scholarship TT3 to EHSK, grants # 2017/2178-1; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) scholarship to KRC, grant # 001; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), grant to ACA # 302661/2015-8.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

All authors have contributed significantly to this study: ACA contributed to the study conception and design, and wrote the manuscript; EHSK and KRC performed the lab experiments, analyzed the data, and wrote the monography. All authors approved the final content.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are indebted with Instituto Adolfo Lutz for support.

PRESENTATION NOTE

This manuscript is based on the Research Technical Training Monograph by Ellen Hochleitner de Souza Kindermann, entitled: Técnicas para pesquisa de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) próximos ao gene que codifica o interferon lambda III (*IFNL3*) e comparação do desempenho da técnica tetra-*primer* PCR em relação a PCR-RFLP. Instituto Adolfo Lutz, Centro de Imunologia, Laboratório de Pesquisa em HTLV. São Paulo, 2018. 38p. Advisor: Adele Caterino-de-Araujo.

REFERENCES

1. Fang MZ, Jackson SS, O'Brien TR. *IFNL4*: Notable variants and associated phenotypes. *Gene*. 2020;730:144289.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.144289>
2. Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK et al. IFN – lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol*. 2003;4(1):69-77.
<https://doi.org/10.1038/ni875>
3. Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, Whitmore TE et al. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol*. 2003;4(1):63-8.
<https://doi.org/10.1038/ni873>
4. Commins S, Steinke JW, Borish L. The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, and IL-29. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121(5):1108-11.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.02.026>
5. Araujo ESA, Dahari H, Cotler JS, Layden TJ, Neumann AU, Melo CE et al. Pharmacodynamics of PEG-IFN alpha-2a and HCV response as a function of IL28B polymorphism in HIV/HCV co-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2011;56(2):95-9.
<https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e3182020596>
6. Ramos JA, Ramos ALA, Hoffmann L, Perez RM, Coelho HSM, Ürményi TP. A single nucleotide polymorphism, rs129679860, in the IL28B locus is associated with the viral kinetics and a sustained virological response in a chronic, monoinfected hepatitis C virus genotype-1 Brazilian population treated with pegylated interferon-ribavirin. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107(7):888-92.
<https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000700008>
7. Assone T, Souza FV, Gaester KO, Fonseca LAM, Luiz OC, Malta F et al. IL28B gene polymorphism SNP rs8099917 genotype GG is associated with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in HTLV-1 carriers. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(9):e3199.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003199>
8. Assone T, Paiva A, Fonseca LAM, Casseb J. Genetic markers of the host in persons living with HTLV-1, HIV and HCV infections. *Viruses*. 2016;8(2):38.
<https://doi.org/10.3390/v8020038>
9. Patel K, McHutchison J. Peginterferon alpha-2b: a new approach to improving response in hepatitis C patients. *Expert Opin Pharmacother*. 2001;2(8):1307-15.
<https://doi.org/10.1517/14656566.2.8.1307>

10. Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology*. 2009;49(4):1335-74.
<https://doi.org/10.1002/hep.22759>
11. Ministério da Saúde. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite viral C e coinfeções: manejo do paciente infectado cronicamente pelo genótipo 1 de HCV e fibrose avançada / Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. – Brasília: Ministério da Saúde, 2013. Suplemento 1.
12. Chen L, Borozan I, Feld J, Sun J, Tannis LL, Coltescu C et al. Hepatic gene expression discriminates responders and nonresponders in treatment of chronic hepatitis C viral infection. *Gastroenterology*. 2005;128(5):1437-44.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.01.059>
13. Kau A, Vermehren J, Sarrazin C. Treatment predictors of a sustained virologic response in hepatitis B and C. *J Hepatol*. 2008;49(4):634-51.
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.07.013>
14. Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*. 2009; 461(7262):399-401.
<https://doi.org/10.1038/nature08309>
15. Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, Abate ML et al. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet*. 2009;41(10):1100-04.
<https://doi.org/10.1038/ng.447>
16. Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N et al. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon- α and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet*. 2009;41(10):1105-09.
<https://doi.org/10.1038/ng.449>
17. Sharafi H, Pouryasin A, Alavian SM, Behnava B, Keshvari M, Mehrnoush L et al. Development and validation of a simple, rapid and inexpensive PCR-RFLP method for genotyping of common IL28B polymorphisms: a useful pharmacogenetic tool for prediction of hepatitis C treatment response. *Hepat Mon*. 2012;12(3):190-5.
<https://doi.org/10.5812/hepatmon.849>
18. Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O’Huigin C et al. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature*. 2009;461(7265):798-802
<https://doi.org/10.1038/nature08463>

19. Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, Cai T, Di Iulio J, Mueller T et al. Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. *Gastroenterology*. 2010;138(4):1338-45, 1345,e1-7.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.056>
20. Galvão C. Vetores da doença de chagas no Brasil. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014. Available from: SciELO Books
<http://books.scielo.org/id/mw58j>
21. Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins AR, Day IN. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(17): E88-8.
<https://doi.org/10.1093/nar/29.17.e88>
22. Galmozzi E, Del Menico B, Rametta R, Dongiovanni P, Fracanzani AL, Benedan L et al. A tetra-primer amplification refractory mutation system polymerase chain reaction for the evaluation of rs12979860 IL28B genotype. *J Viral Hepat*. 2011;18(9):628-30.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2010.01349.x>
23. Delvaux N, Costa VD, Costa MM, Lampe E. Comparison of four methods of genotyping IL28B polymorphisms in chronic hepatitis C patients. *J Virol Methods*. 2015;220:1-4.
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.04.001>
24. Li W, Zeng Y, Wang J, Zhou B, Zhang J, Zhang H et al. Predicting sustained viral response to hepatitis C using a rapid and simple IL28B rs8099917 genotyping assay. *Antiviral Res*. 2012;94(1):54-6.
<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.02.007>
25. Moreira S, Garcia RFL, Gutberlet A, Bertol BC, Ferreira LE, Pinho MSL et al. A straightforward genotyping of the relevant IL28B SNPs for the prediction of hepatitis C treatment outcome. *J Virol Methods*. 2012;184(1-2):93-7.
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.05.024>
26. Ferreira PRA, Santos C, Côrtes R, Reis A, Tenore SB, Silva MH et al. Association between IL28B gene polymorphisms and sustained virological response in patients coinfecting with HCV and HIV in Brazil. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(20):509-10.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkr488>
27. Melis R, Fauron C, McMillin G, Lyon E, Shirts B, Hubley LM et al. Simultaneous genotyping of rs12979860 and rs8099917 variants near the IL28B locus associated with HCV clearance and treatment response. *J Mol Diagn*. 2011;13(4): 446-51.
<https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2011.03.008>

28. Payungporn S, Tangkyvanich P, Jantaradsamee P, Theamboonlers A, Poovorawan Y. Simultaneous quantitation and genotyping of hepatitis B virus by real-time PCR and melting curve analysis. J Virol Methods. 2004;120(2):131-40.
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.04.012>
29. Garcia RFL, Moreira S, Ramos ALA, Ferreira LE, Mattos AA, Tovo CV et al. Interleukin 28B-related polymorphisms: a pathway for understanding hepatitis C virus infection? World J Gastroenterol. 2013;19(42):7399-404.
<https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i42.7399>
30. Fateh A, Aghasadeghi M, Siadat SD, Vaziri F, Sadeghi F, Fateh R et al. Comparison of three different methods for detection of IL28 rs12979860 polymorphisms as a predictor of treatment outcome in patients with hepatitis C virus. Osong Public Health Res Perspect. 2016;7(2):83-9.
<https://doi.org/10.1016/j.phrp.2015.11.004>





Estratégias para recuperação de xilooligossacarídeos do licor de resíduos de eucalipto para avaliação do seu efeito estimulante em *Staphylococcus xylosus*

Strategies for xylooligosaccharides recovery from eucalyptus waste liquor to evaluate their stimulatory effect on *Staphylococcus xylosus*

Mariana Gomes Moreira¹ , Jenniffer Andrea Tamayo Peña¹ , Telma Teixeira Franco^{1,2*} 

¹ Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

² Núcleo Interdisciplinar de Planejamento Energético, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

*Autor de correspondência/Corresponding author: tfranco@unicamp.br

Recebido/Received: 08.11.2022 – Aceito/Accepted: 11.04.2023

RESUMO

Xilooligossacarídeos (XOS) são reconhecidos pelo seu potencial prebiótico relevante para diversos setores industriais e foram obtidos após o pré-tratamento hidrotérmico da biomassa lignocelulósica residual de galhos de eucalipto. Subprodutos inibitórios são gerados durante o processo de solubilização dos oligossacarídeos e acabam comprometendo a utilização do licor em microrganismos. Neste trabalho, o processo de destoxificação, hidrólise enzimática e atividade estimulantes de crescimento da bactéria *Staphylococcus xylosus* foram estabelecidos. Os resultados mostraram que a adsorção com carvão ativado em pó removeu cerca de 55% do ácido acético e mais de 90% do ácido fórmico, compostos fenólicos, lignina solúvel, furfural e 5-hidroximetilfurfural, e que a soma dos oligossacarídeos xilobiose (X2) e xilotriose (X3) foram maximizadas de 0,57 g/L para 1,21 g/L com 110 U/g_{XOS} da enzima endoxilanase e 6,3% do licor destoxificado na hidrólise enzimática. O consumo de cerca de 63% de X2 e de 46% de X3 pela bactéria em meio basal deficiente em fontes de carbono, mas acrescido com os oligômeros, proporcionou maior crescimento celular em relação aos meios basais com alta composição de carbono, com e sem XOS, revelando seu potencial prebiótico pelo efeito estimulante de crescimento.

Palavras-chave. Xilooligossacarídeos, Carvão Ativado, Prebiótico, Eucalipto, Biomassa.

ABSTRACT

Xylooligosaccharides (XOS) are recognized for their prebiotic potential relevant to several industrial sectors and were obtained after hydrothermal pretreatment of residual lignocellulosic biomass from eucalyptus branches. Inhibitory by-products are generated during the solubilization process of oligosaccharides and end up compromising the utilization of the liquor in microorganisms. In this work, the detoxification process, enzymatic hydrolysis and growth stimulating activity of *Staphylococcus xylosus* bacteria were established. The results showed that adsorption with powdered activated carbon removed about 55% of acetic acid and more than 90% of formic acid, phenolic compounds, soluble lignin, furfural, and 5-hydroxymethyl furfural and the sum of the oligosaccharides xylobiose (X2) and xylotriose (X3) were maximized from 0.57 g/L to 1.21 g/L with 110 U/g_{XOS} of the enzyme endoxylanase and 6.3% of the detoxified liquor in the enzymatic hydrolysis. The consumption of X2 and X3 were about 63% and 46%, respectively, by the bacteria in basal medium deficient in carbon sources, but in medium added with the oligomers, provided higher cell growth compared to basal medium with high carbon composition, with and without XOS, revealing its prebiotic potential by its growth-stimulating effect.

Keywords. Xylooligosaccharides, Activated Charcoal, Prebiotic, Eucalyptus, Biomass.

INTRODUÇÃO

O Brasil é referência mundial no cultivo de árvores de eucalipto e está entre os principais produtores de papel, celulose e madeira serrada no mundo. Entre os milhões de toneladas de resíduos sólidos florestais gerados, 12,5% são mantidos em campo para proteção e adubação do solo e apenas 8,9% são reutilizados em outros setores industriais. O uso desses resíduos como matéria-prima para fabricação de novos produtos agrega valor, cria oportunidades por meio da inovação e reduz a pressão por novos recursos¹. A partir da hidrólise das xilanas presentes nas frações hemicelulósicas das biomassas lignocelulósicas de eucalipto, obtêm-se uma importante classe oligossacarídeos denominados xilooligossacarídeos (XOS).

Os XOS são definidos como oligômeros formados por 2 a 10 unidades de xilose conectados por ligações β -1,4-glicosídicas², sendo um ingrediente prestigiado pelas indústrias cosméticas, farmacêuticas e de alimentos, devido, principalmente, às suas propriedades prebióticas^{3,4}, sendo bons estimuladores de microbianos naturais, responsáveis por aumentar a atividade da microbiota saudável⁵ e contribuir de forma sustentável para a saúde do hospedeiro. Além disso, em formulações cosméticas podem ser utilizados como estabilizadores, agente de volume e antioxidantes³.

Durante o pré-tratamento para desconstruir a estrutura lignocelulósica e solubilizar a hemicelulose na forma de oligômeros e monômeros, as altas temperaturas e condições severas empregadas geram subprodutos considerados inibitórios que comprometem a utilização do licor em fermentações e etapas sucessoras. Destacam-se as formações de produtos de degradação, como o furfural e 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), gerados a partir da desidratação de pentoses e hexoses da hemicelulose e celulose, respectivamente, ácido fórmico, os compostos fenólicos derivados da decomposição da lignina, e o ácido acético resultante da hidrólise dos grupos acetil hemicelulósicos^{6,7}.

Várias estratégias são utilizadas para remover ou reduzir esses compostos presentes no licor, como a filtração por membrana⁸, adsorção com carvão ativado⁹⁻¹¹, purificação por resinas de troca iônica¹² e floculação por polímeros vegetais¹³. Entre elas, a adsorção com carvão ativado se apresenta como uma técnica relevante para diminuir efetivamente as concentrações desses compostos sem alterar significativamente a concentração dos compostos valiosos. Como vantagens, destacam-se as propriedades como a área superficial, capaz de acomodar seletivamente as moléculas de interesse, alta porosidade, baixa reatividade, ser facilmente regenerado e por apresentar baixo custo quando comparado com os outros métodos¹⁴.

A composição elementar de um carvão ativado característico é formada por mais de 85% de carbono (C), seguido de elementos como oxigênio (O), enxofre (S), nitrogênio (N), hidrogênio (H) e cinzas orgânicas¹⁵. Esses átomos podem formar moléculas na superfície do material, impedindo o acesso aos poros. Para melhorar a acessibilidade do material, algumas técnicas podem ser aplicadas, como a carbonização, a qual é capaz de eliminar substâncias voláteis e gases leves, como metano, gás hidrogênio, dióxido e monóxido de carbono para contribuir na formação da estrutura porosa do adsorvente, e a ativação física e química, as quais são responsáveis por desobstruir os poros internos. Enquanto a ativação física envolve fluxos de gases oxidantes ou de vapor de água a altas temperaturas, a ativação química utiliza agentes ativadores para remover as impurezas do material, como ácido fosfórico (H_3PO_4), ácido sulfúrico (H_2SO_4), hidróxido de potássio (KOH), hidróxido de sódio (NaOH) e cloreto de zinco ($ZnCl_2$)¹⁶. Cada agente causa diferentes efeitos no produto final, como por exemplo, o $ZnCl_2$ leva à formação de uma elevada área superficial contendo mais estruturas de microporos, enquanto a utilização de H_3PO_4 gera uma distribuição de poros mais heterogênea^{14,17}.

Diversas referências destoxificaram licores oriundos de biomassas vegetais com carvão ativado para reduzir a concentração das moléculas nocivas sem alterar a concentração de açúcares fermentáveis^{10,18}. Outras, combinaram a adsorção com carvão ativado com filtrações prévias do licor^{9,13}, já que a alteração do pH por um reagente alcalino seguida da sua redução com um reagente ácido precipitava compostos aromáticos^{6,19}. A aplicação do método de destoxificação, por separação ou purificação, depende do grau de toxicidade do licor, o qual varia de acordo com a matéria prima e condições de pré-tratamento empregadas. Assim, faz-se necessário investigar e avaliar o melhor método para cada trabalho.

Seguir com a hidrólise enzimática após a destoxificação é uma alternativa para garantir maior formação de XOS com menores graus de polimerização, como 2 e 3, (XOS₂₋₃), já que as reações catalisadas por enzimas específicas permitem que moléculas maiores deem origem a moléculas menores sem a formação de subprodutos indesejáveis^{19,20}. As enzimas xilanases são os catalisadores preferidos para a hidrólise das xilanas, as quais são capazes de formar seletivamente XOS₂₋₃ sem gerar significativamente monômeros de xilose^{21,22}.

Xilobiose (X2) e xilotriose (X3) são os principais candidatos para aplicações prebióticas, pois seus tamanhos são mais facilmente consumidos por bactérias seletivas e benéficas à saúde humana^{2,23}. Uma microbiota saudável exerce funções a favor da proteção da barreira cutânea, através de mecanismos por crescimento competitivo entre bactérias benéficas e patogênicas ou por excreção de moléculas antimicrobianas por parte dos microrganismos benignos, atuando diretamente na defesa natural da pele. Como por exemplo, doenças como dermatite atópica, acne, rosácea e distúrbios na pele estão associadas às perturbações na composição da microflora²⁴.

Staphylococcus xylosus é uma bactéria residente da pele, que se desenvolve geralmente em ambientes quentes e úmidos, como axilas, pés e virilha, e pode ser comumente encontrada em culturas iniciadoras para desenvolvimento de cor e sabor em alimentos de origem animal²⁵. Há poucos estudos sobre os mecanismos de ação de prebióticos nessa bactéria na literatura, entretanto, no geral, são consideradas produtoras de bactericidas peptídicas que impedem a ação de patógenos^{26,27}.

O presente estudo teve como objetivo remover compostos inibidores de crescimento microbiano por adsorção com carvão ativado em batelada e converter os XOS de maiores GP em XOS₂₋₃ por hidrólise enzimática, ambos presentes no LB_{RE}, para avaliar a atividade estimulante dos oligossacarídeos no crescimento da bactéria *S. xylosus*, e assim, contribuir com as pesquisas para a conversão de resíduos de eucalipto abundantes, acessíveis e renováveis, em ingredientes qualificados pela indústria, garantindo um reaproveitamento efetivo e novas aplicações.

MATERIAL E MÉTODOS

Matéria Prima

O licor bruto (LB_{RE}) de galhos residuais de eucalipto da espécie *Eucalyptus grandis* foi gentilmente fornecido pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica, Biorrefinaria e Produtos de Origem Renovável (LEBBPOR) da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). A caracterização e a preparação do material foram feitas em trabalho anterior por Tamayo-Pena et al²⁸, sendo sua composição química: 1,44 ± 0,16 g/L de xilose, 8,70 ± 0,01 g/L de XOS totais, 0,98 ± 0,07 g/L de compostos fenólicos, 0,58 ± 0,05 de ácido fórmico, 0,44 ± 0,16 g/L de ácido acético, 0,13 ± 0,11 g/L de furfural,

0,04 ± 0,02 g/L de 5-HMF e (0,22 ± 0,01) ×10⁻¹ de lignina solúvel. O LB_{RE} foi obtido por pré-tratamento hidrotérmico com 10% (m/m) de carga de sólidos e 175 °C durante 20 minutos, e valor de pH 3,2.

Os carvões utilizados nos experimentos foram carvão ativado granulado (C_{Gran}), com 8x30 mesh, gentilmente cedido pelo Laboratório de Bioprocessos e Engenharia Metabólica (LEMeB) da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, e carvão ativado em pó P.A. (C_{Pó}) comercial (Synth – Lote 235611).

Destoxificação do licor bruto com carvão ativado

O LB_{RE} foi destoxificado por adsorção com os carvões ativados 4% (m/v) em agitador *orbital shaker* a 150 rpm e 30 °C durante 2 horas. As amostras foram centrifugadas (4200 rpm por 30 minutos a 4 °C) e então filtradas em papel filtro qualitativo para retenção do carvão. Em seguida, uma nova centrifugação foi aplicada sob as mesmas condições. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente com o auxílio de pipetas Pasteur e armazenado para análises quantitativas pelos métodos analíticos.

A porcentagem de remoção dos compostos adsorvidos (i) foi calculada segundo a [Equação 1](#) a seguir:

$$\% \text{ Remoção} = \frac{C_{0,i} - C_i}{C_{0,i}} \times 100 \quad (1)$$

C_{0,i} é definido como a concentração inicial do composto *i* (g/L) e C_i como a concentração do composto *i* ao final da adsorção (g/L), em que *i* corresponde aos compostos fenólicos, furfural, 5-HMF, lignina solúvel, ácido acético ou ácido fórmico.

Tratamentos dos carvões ativados

Para avaliar a efetividade da remoção dos compostos fenólicos, inibidores, ácidos orgânicos e lignina solúvel no LB_{RE}, foram testados três diferentes tratamentos no C_{Gran}, de acordo com metodologias descritas por Heylmann et al²⁹ e Ramos et al¹⁶. O C_{Pó} não recebeu nenhum tipo de tratamento preliminar, já que seu grau analítico garante maior confiabilidade.

Os tratamentos empregados no C_{Gran} foram: carvão ativado granulado sem tratamento prévio (C_{G-ST}), carvão ativado granulado carbonizado em cadinhos de porcelana a 700 °C por 10 minutos em mufla (C_{G-CA}) e carvão ativado granulado quimicamente tratado com solução 33% (m/v) de ZnCl₂, na proporção 1:1, durante 24 horas e carbonizado (C_{G-QT}) sob as mesmas condições anteriores. Neste último, o material foi lavado primeiramente, com uma solução de ácido clorídrico (HCl) 2,5% (v/v) para remoção dos resíduos de ZnCl₂ e desobstrução dos poros formados, e com água destilada até obtenção do pH da água de lavagem. Em seguida, o material foi seco em estufa a 100 °C durante 1 hora.

Filtração do licor bruto

A remoção de impurezas e compostos sólidos do LB_{RE} foi feita de acordo com a metodologia adaptada estabelecida por Alves et al¹⁹, a qual envolve duas etapas: aumento do pH para 8,0 com óxido de cálcio (CaO) seguida de filtração com papel filtro qualitativo; redução do pH para 5,2 com ácido fosfórico (H₃PO₄) seguida de uma nova filtração. Ao final deste processo, o licor filtrado (LF) e o LB_{RE} foram submetidos à adsorção com o C_G de melhor desempenho para comparação.

Enzima comercial e ensaios de atividade enzimática

A enzima e o substrato empregados nos ensaios enzimáticos foram a endo-1,4- β -xilanase de *Neocallimastix patriciarum* (GH11) e o arabinoxilano de trigo, ambos obtidos comercialmente da Megazyme®.

A atividade da enzima foi determinada colorimetricamente através de um espectrofotômetro UV/Vis a 540 nm a partir da quantidade de açúcares redutores liberados³⁰. Uma curva de calibração foi previamente construída com padrões de concentrações conhecidas de xilose. As reações contendo 50 μ L de substrato (0,5% p/v) e 50 μ L da enzima, ambos diluídos em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0, foram incubadas a 50 °C durante 20 minutos em termociclador e interrompidas pela adição de 100 μ L do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), seguido do aquecimento imediato até a ebulição por 5 minutos. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de açúcares redutores do substrato por minuto. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Produção de XOS com baixo grau de polimerização

O licor destoxificado (LD) foi submetido à hidrólise enzimática para aumentar a proporção de XOS₂₋₃ e formar o hidrolisado (H). Os ensaios foram executados em frascos Erlenmeyer contendo 6,3% do LD, enzima na dosagem 110 U/g_{XOS} e tampão citrato fosfato 50 mM e pH 6,0 para integrar o volume final 10 mL. As amostras foram incubadas sob agitação contínua a 160 rpm e 50 °C durante 48 horas. Em seguida, foram aquecidas a 90 °C por 10 minutos em banho maria, centrifugadas (4200 rpm por 15 minutos a 4 °C) e armazenadas para determinação da concentração XOS por HPLC.

ESTUDO DE CASO

Microrganismos e condições de cultivo

A bactéria *S. xylosus* (ATCC 29971) foi adquirida da Coleção de Culturas Tropical (CCT) da Fundação André Tosello, em Campinas (São Paulo, Brasil).

As bactérias criopreservadas foram ativadas pelo cultivo dos microrganismos em meio de cultura caldo nutriente (C), previamente esterilizado a 121 °C por 20 minutos, contendo: 1 g/L de extrato de carne, 2 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de peptona A e 5 g/L de cloreto de sódio (NaCl), na proporção de 1,5 mL de criotubo para 50 mL de meio C. O pH do meio foi ajustado para $7,2 \pm 0,2$ e as amostras foram incubadas por 17 horas a 250 rpm em agitador *orbital shaker* a 37 °C.

Após a ativação, o cultivo foi escalonado para 150 mL, na proporção de ativação 30% (v/v), para a formação do pré-inóculo e incubadas por 24 horas sob as mesmas condições. Em seguida, mantendo-se a mesma proporção e condições, o pré-inóculo foi transferido para o inóculo, de volume final de 250 mL, e incubado novamente por 24 horas. Esse escalonamento garantiu a quantidade necessária de inóculo para os ensaios de crescimento da bactéria com o H.

Crescimento da bactéria *Staphylococcus xylosus*

A estimulação do crescimento da bactéria foi estudada a partir de quatro diferentes meios de culturas esterilizados: meio caldo nutriente (C) e caldo nutriente com 0,47 g/L de XOS₂₋₃ (CX), caldo

nutriente diluído 4x com água (D) e caldo nutriente diluído com 0,64 g/L de XOS_{2-3} (DX). Os ensaios foram conduzidos em fracos Erlenmeyer em duplicata, com volume final de 10 mL, sendo 30% (v/v) do inóculo.

As culturas foram incubadas a 37 °C e 250 rpm e amostras foram retiradas nos tempos 0, 1, 2, 3 e 6 horas para determinação da concentração celular e pH. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (4500 rpm por 10 minutos a 4 °C) para remoção das células e os sobrenadantes foram devidamente diluídos, filtrados com filtros PVDF 0,22 µm e utilizados para a quantificação do consumo dos XOS_{2-3} por HPLC. O crescimento celular foi monitorado a partir da densidade óptica a 600 nm em espectrofotômetro, a qual foi correlacionada com seu peso seco correspondente. Uma curva de calibração foi previamente preparada a partir do inóculo da bactéria.

MÉTODOS ANALÍTICOS

Análises de açúcares monoméricos, ácidos orgânicos e inibidores

Açúcares monoméricos foram quantificados por *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) equipada com coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm) a 55 °C e detector de índice de refração Waters 410 com temperatura de 40 °C. Ácido sulfúrico (H_2SO_4) 5 mM foi utilizado como eluente a vazão de 0,6 mL/min.

Ácidos orgânicos foram analisados por HPLC de troca iônica com detector por condutividade. A coluna Metrosep *Organic Acids* (300 x 7,8 mm) foi utilizada para as análises a 30 °C. Ácido sulfúrico 0,5 mM e supressor de cloreto de lítio (LiCl) 50 mM foram utilizados como fase móvel com vazão a 0,5 mL/min.

As concentrações dos inibidores, furfural e 5-HMF, foram determinadas por HPLC equipada com coluna C18 Thermo (50 x 2,1 mm) a 30 °C e detector de Arranjo de Diodo (PDA) com comprimento de onda de 280 nm. Ácido fosfórico 2 mM contendo acetonitrila 2,5% foi utilizado como eluente com vazão de 100 µL/min.

Análises de compostos fenólicos e lignina solúvel

Compostos fenólicos totais foram determinados pelo método de Folin-Ciocalteu, conforme preconizado por Arruda et al¹³. O teor de lignina solúvel foi determinado por *UV-Spectroscopy* a 280 nm e calculada conforme descrito por Rocha et al³¹.

Análises de xilooligossacarídeos

Xilobiose (X2), Xilotriose (X3), Xilotetraose (X4) e Xilopentaose (X5) foram quantificados por HPLC com detector amperométrico, coluna e pré-coluna CarboPac PA100 (4 x 50 mm). A composição da fase móvel consistiu em um sistema de gradiente de solvente composto por: A (água deionizada), B (NaOH 80 mM e acetato de sódio 500 mM) e C (NaOH 500 mM) com vazão de 1,0 mL/min.

A concentração de XOS totais foi determinada utilizando o NREL/TP-510-42623 descrito por Sluiter et al³².

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Destoxificação do licor bruto

O LB_{RE} contém subprodutos inibitórios como os compostos fenólicos, furfural, 5-HMF, ácido acético, ácido fórmico e lignina solúvel, que afetam o crescimento e atividade celular de microrganismos^{18,33}.

Antunes et al³⁴ reportaram que concentrações abaixo de 1,5 g/L de ácido acético não inibem o metabolismo de cepas de *Scheffersomyces shehatae* e *Candida tropicalis* durante etapas de fermentação, enquanto Costa-Trigo et al¹⁸ relataram que concentrações a partir 0,5 g/L de compostos fenólicos inibem a produção de ácido láctico por bactérias. Wikandari et al³⁵ também observaram que a mesma concentração de ácido acético de 1,5 g/L foi suficiente para causar diminuição no rendimento e produtividade de etanol, a partir da fermentação da levedura *Pichia stipitis*, além da concentração de 0,5 g/L para os inibidores furfural e 5-HMF. Assim, a destoxificação por adsorção em carvão ativado garante que os ensaios de crescimento com a bactéria *S. xylosus* e com o LB_{RE} não sejam prejudicados.

Efeitos dos tratamentos dos carvões ativados na adsorção

Para aumentar a eficiência adsortiva do carvão ativado é necessário garantir que seus poros estejam desobstruídos e disponíveis para que as moléculas inibidoras de interesse possam ser acomodadas em sua superfície²⁹. Diferentemente dos carvões ativados em pó, os carvões ativados granulados podem necessitar de mais processos para sua formação, já que o tamanho de sua partícula influencia diretamente na capacidade de adsorção³⁶.

De um modo geral, observa-se na **Figura 1** que os carvões que receberam algum tipo de tratamento, C_{G-CA} e C_{G-QT}, promoveram uma maior remoção dos compostos propostos, exceto para os inibidores furfural e 5-HMF, os quais foram efetivamente removidos em todos os casos (> 99%). Além disso, nota-se que os tratamentos não influenciaram significativamente na remoção do ácido fórmico, sendo as porcentagens de remoção de 90,9%, 89,9%, e 89,1% C_{G-CA}, C_{G-ST} e C_{G-QT}, respectivamente.

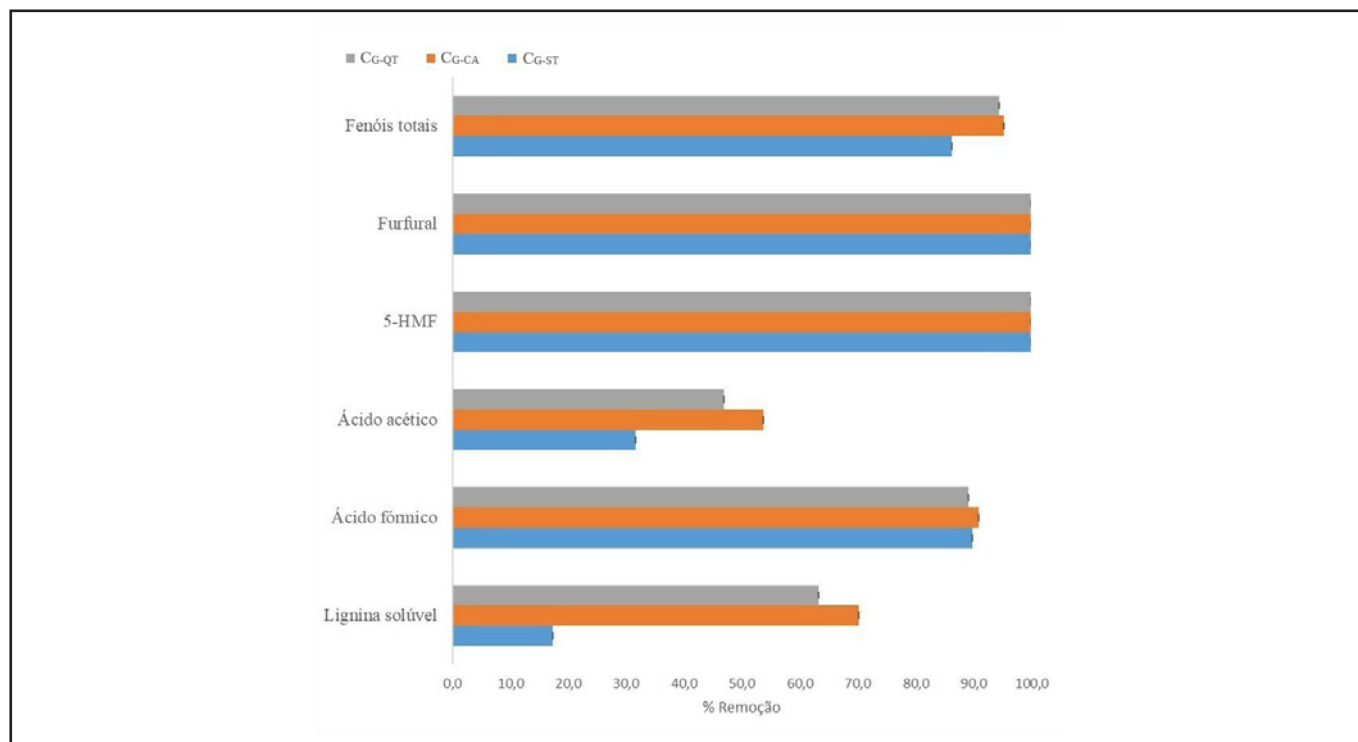


Figura 1. Remoção de compostos inibidores no LBRE a partir dos carvões: C_{G-ST} (sem tratamento), carvão C_{G-CA} (carbonizado) e carvão C_{G-QT} (quimicamente tratado) após 2 horas de adsorção

A ativação feita no C_{G-QT} não favoreceu a remoção de lignina solúvel, 63,2%, fenóis totais, 94,4%, e ácido acético, 46,9%, em relação ao carvão C_{G-CA} , 70,2%, 95,2% e 53,7%. A ativação química do material tem como objetivo básico aumentar a área superficial do adsorvente. O $ZnCl_2$ como ativador é capaz de remover impurezas e compostos orgânicos residuais do material, aumentando sua capacidade adsortiva³⁷. Entretanto, Vargas et al³⁸ afirmaram que pode haver o colapso da estrutura porosa do material adsorvente por excesso do agente ativador ao observar que a capacidade de adsorção do carvão ativado granulado de caroço de palmeira africana diminuiu com o aumento da concentração do $ZnCl_2$, ficando evidente que neste estudo, concentração de impregnação pode ter afetado as propriedades do C_{G-Gran} .

Sendo assim, o C_{G-CA} apresentou os melhores resultados para a remoção dos compostos inibitórios e foi utilizado para os experimentos de observação do efeito da filtração do licor bruto. Além disso, este tipo de tratamento favorece a redução de reagentes, água e energia em relação ao C_{G-QT} .

Efeito da filtração do licor bruto

A adição de um reagente básico no LB_{RE} , como o CaO, permite que alguns compostos sejam precipitados na forma de óxidos e removidos por filtração, segundo Alves et al¹⁹. Diversas referências na literatura^{13,34,39,40} aplicam esse processo prévio à adsorção com carvão ativado para garantir maior remoção dos compostos fenólicos presentes nos licores de diferentes biomassas lignocelulósicas.

As concentrações finais dos compostos inibidores para o LF, correspondente ao LB_{RE} filtrado previamente à adsorção, foram de: 0,243 g/L para o ácido acético, 0,059 g/L para o ácido fórmico, 0,008 g/L para a lignina solúvel, 0,027 g/L para os compostos fenólicos e concentrações inferiores a 0,001 g/L para furfural e 5-HMF. Já para o LB_{RE} que foi submetido direto à adsorção, o LD, os resultados foram 0,202 g/L de ácido acético, 0,053 g/L de ácido fórmico, 0,007 g/L de lignina solúvel, 0,047 g/L de compostos fenólicos e inferiores a 0,001 g/L de furfural e 5-HMF. Os valores foram calculados a partir de duplicadas e apresentaram erros inferiores a 5%.

A partir dos resultados, observa-se que as filtrações prévias não influenciaram nos resultados de adsorção do furfural, 5-HMF e ácido fórmico sendo que todos os resultados apresentaram porcentagem de remoção superior a 90,0%. Além disso, para o ácido acético a porcentagem de remoção no LD foi maior, 53,7%, do que para o LF, 44,4%.

Para a lignina solúvel, enquanto a filtração combinada a adsorção com C_{G-CA} removeu 62,6%, a aplicação direta do LB_{RE} à adsorção removeu 70,2%. De acordo com Evstigneyev et al⁴⁰ e Horvath⁴¹, a solubilidade da lignina aumenta com o aumento do pH da fase líquida. Desta forma, manter o pH ácido do LB_{RE} garantiu a maior afinidade das macromoléculas pelo adsorvente em relação à fase líquida, justificando sua menor concentração ao final da adsorção.

Em ambos os casos, nota-se que os compostos fenólicos foram altamente removidos, sendo de 97,3% e 95,2%, respectivamente, nos LF e LD. Como o esperado, a adição de CaO no LB_{RE} causa a precipitação de compostos aromáticos na forma de óxidos, permitindo que os mesmos sejam removidos por filtração¹⁹, justificando a ligeira maior remoção desses compostos, e relação ao LB_{RE} que foi diretamente adsorvido. Entretanto, esta etapa de filtração prévia como alternativa para aprimorar a adsorção não beneficiou significativamente a retirada dos fenólicos, assim como a remoção das impurezas sólidas do LB_{RE} , indicando que somente a adsorção com o carvão ativado foi suficiente para retirar efetivamente os compostos propostos.

Para este estudo com galhos de eucalipto residuais, filtrar o licor previamente à adsorção não promoveu reduções significantes nas concentrações dos compostos inibidores, e por essa razão, essa condição não foi empregada nos ensaios seguintes. Além disso, preservar o pH do LB_{RE} evita o consumo de reagentes e equipamentos e perdas de matéria prima que são geradas durante a filtração.

Comparação entre C_{pó} e C_{G-CA}

A **Tabela 1** apresenta os resultados da adsorção empregando-se os carvões em pó (C_{pó}) e o carvão ativado granulado de melhor desempenho, o carbonizado (C_{G-CA}). Além das menores partículas de carvão ativado conferirem menor taxa de difusão das moléculas do adsorvato no adsorvente, como consequência da menor resistência gerada no meio, o material em pó também proporciona uma maior área de contato com a fase líquida, aumentando os efeitos da adsorção^{11,42}.

Tabela 1. Concentrações finais dos compostos inibitórios, xilose e XOS totais após duas horas de adsorção com C_{G-CA} e C_{pó}

Inibidores	Concentração (g/L)		
	LB _{RE}	LD - C _{G-CA}	LD - C _{pó}
Furfural	0,125 ± 0,114	< 0,001	< 0,001
5-HMF	0,040 ± 0,019	< 0,001	< 0,001
Fenóis totais	0,979 ± 0,070	0,048 ± 0,001	0,063 ± 0,001
Ácido fórmico	0,579 ± 0,050	0,053 ± 0,001	0,041 ± 0,002
Lignina solúvel	0,022 ± 0,001	0,007*	< 1,000×10 ⁻⁵
Ácido acético	0,436 ± 0,156	0,202*	0,197 ± 0,002
Xilose	1,436 ± 0,162	1,204 ± 0,074	1,297 ± 0,003
XOS totais	8,698 ± 0,005	5,879 ± 0,001	7,785 ± 0,001

* Valores de duplicatas com erros inferiores a 5%

Apesar do C_{pó} ter removido maiores quantidades de lignina solúvel (99,9%) em relação ao C_{G-CA} (70,2%) e ligeiramente mais ácido fórmico e ácido acético (93,0% e 55,0% contra 90,9% e 53,7%), observou-se que o carvão granulado adsorveu um pouco mais dos compostos fenólicos (95,2%) em relação ao em pó (93,6%) e que a granulometria não influenciou na adsorção do furfural e 5-HMF, sendo que estes foram eficientemente removidos em ambos os casos (> 99,0%).

Em comparação, Mussatto e Roberto¹¹ avaliaram a remoção de inibidores em licor de palha de arroz com diferentes granulometrias de carvões ativados a 2,5% por uma hora e mostraram que o carvão ativado em pó de maior área superficial removeu 26% de compostos fenólicos, 42% de furfural e 93% de 5-HMF, enquanto o carvão granulado de 8x30 mesh removeu 12%, 54% e 39%, respectivamente. Apesar da adsorção ser fortemente dependente da concentração dos adsorvatos na fase líquida, esses estudos se assemelham pelo fato de que o carvão ativado em pó obteve melhor êxito para a remoção dos três compostos e que o ácido acético foi o composto menos adsorvido. A razão para essa tendência do ácido acético pode ser atribuída pela falta de sítios ativos necessários para uma alta concentração inicial de ácido acético, além de sua competição com os outros compostos, levando a uma menor remoção⁴³.

Apesar dos resultados estarem de acordo com o esperado para o C_{P_0} , nota-se que a carbonização do C_{Gran} também gerou um material eficaz para a remoção dos compostos inibidores propostos. Entretanto, remoções de açúcares também foram observadas para ambos carvões, sendo que o C_{G-CA} retirou mais xilose e XOS totais (16,2% e 32,2%) em relação ao C_{P_0} (9,7% e 10,5%). Perdas de açúcares também foram relatadas em outros estudos^{13,18}. Desta forma, o carvão C_{P_0} foi escolhido para os experimentos de adsorção antes do estudo de caso por ser capaz de remover eficientemente os compostos inibitórios, não exigir tratamentos prévios e gerar menores perdas dos XOS.

Aplicação de endoxilanase para aumentar xilobiose e xilotriose no licor destoxificado

XOS com GP 2 e 3 são reconhecidos como açúcares fermentáveis qualificados para microrganismos benéficos e específicos no corpo humano, por possuírem tamanho adequado e por auxiliar no controle da microbiota^{2,33}. A principal vantagem de aplicar a hidrólise enzimática em polissacarídeos é atribuída à alta especificidade da reação, a qual garante a conversão em produtos com baixo GP, sem a formação de subprodutos^{44,45}. Para aumentar a concentração desses oligômeros no LD, a hidrólise enzimática com a enzima comercial endoxilanase GH11 foi aplicada.

A composição de oligômeros e monômeros no licor destoxificado era de 0,23 g/L de X2, 0,34 g/L de X3, 0,84 g/L de X4+X5 e 1,30 g/L de xilose. As enzimas endoxilanasas da família GH11 apresentam alta seletividade pelo substrato e eficiência catalítica, gerando menos monômeros e atuando preferencialmente nas cadeias mais longas⁴⁶. Após 48 horas, as concentrações aumentaram cerca de 134%, 97%, 51% e 7%, respectivamente, para X2, X3, X4+X5 e xilose, atingindo concentrações de 0,54 g/L, 0,67 g/L, 1,27 g/L e 1,39 g/L, ficando evidente que as cadeias mais longas dos XOS foram convertidas principalmente em X2 e X3 durante a hidrólise enzimática.

Efeito do X2 e X3 na *S. xylosus*

Nos microrganismos, os compostos inibidores prejudicam o crescimento e atividades celulares por atuarem diretamente na membrana. Enquanto os compostos fenólicos são responsáveis pelas perdas de potássio, ácido glutâmico, RNA e entre outros compostos da barreira seletiva, o furfural e 5-HMF são capazes de impedir a formação das enzimas das vias metabólicas centrais, como as fermentativas, e levar ao rompimento da membrana. Além desses, os ácidos orgânicos também afetam o crescimento da célula através de mecanismos de acidificação intracelular⁴⁷. Neste estudo, com exceção da lignina solúvel e seus derivados, compostos fenólicos, nota-se que as concentrações do furfural, 5-HMF dos ácidos orgânicos estão abaixo dos limites considerados inibitórios no LB_{RE} , conforme descrito anteriormente, para outros microrganismos. Considerando que os limites inibitórios desses compostos não tenham sido reportados pela literatura para a bactéria *S. xylosus* e que pode haver efeito sinérgico entre eles^{18,48}, a adsorção do LB_{RE} com o carvão ativado se fez necessária para garantir que o crescimento da bactéria e a avaliação do consumo de X2 e X3 não fossem prejudicadas.

Ensaio para avaliar o efeito dos XOS_{2,3} no crescimento da *S. xylosus* foram feitos em diferentes meios de culturas. Para avaliar efetivamente o crescimento da *S. xylosus* pelo consumo de XOS_{2,3} é importante analisar se as bactérias consomem, preferencialmente, os oligossacarídeos ou as fontes de carbono provenientes dos meios basais, já que estes são meios complexos e ricos em bons nutrientes. Com isso, a **Tabela 2** apresenta as composições dos meios basais ricos em nutrientes sem (meio C) e com XOS_{2,3} (meio CX), e os meios deficientes

em nutrientes sem (meio D) e com XOS₂₋₃ (DX) a partir das concentrações totais e das concentrações de carbono (C_{Carbono}), em g/L, de cada componente, sendo a última calculada pela fração mássica de carbono em cada um^{49,50}.

Tabela 2. Concentrações totais e concentrações de carbono (C_{carbono}) de cada componente para cada meio de cultura, sendo os meios ricos em nutrientes com XOS₂₋₃ (meio CX) e sem XOS₂₋₃ (meio C) e os deficientes em nutrientes com XOS₂₋₃ (meio DX) e sem (meio D) XOS₂₋₃

Componentes	Fração mássica de Carbono	Concentração (g/L)					
		Meios deficientes em nutrientes			Meio rico em nutrientes		
		Meio C	Meio CX	C _{Carbono}	Meio D	Meio DX	C _{Carbono}
Extrato de Levedura	50%	2,00	2,00	1,00	0,50	0,50	0,25
Extrato de Carne	50%	1,00	1,00	0,50	0,25	0,25	0,13
Peptona	50%	5,00	5,00	2,50	1,25	1,25	0,62
XOS ₂₋₃	43%	-	0,47	0,20	-	0,64	0,28

No geral, após 6 horas de ensaio, observa-se que a alta disponibilidade de carbono do meio basal nos meios C e CX, calculada a partir da soma de C_{Carbono} de cada componente, sendo de 4,00 g/L e 4,20 g/L, respectivamente, fez com que a bactéria crescesse continuamente, diferentemente dos meios deficientes de nutrientes basais, D e DX, com concentrações de carbono de 1,00 g/L e 1,28 g/L, na devida ordem, em que a concentração celular diminuiu após duas horas de ensaio. Entretanto, para o tempo de 2 horas, destaca-se o máximo crescimento da bactéria no meio deficiente de nutrientes, porém acrescido de XOS₂₋₃ (meio DX). A incorporação de XOS₂₋₃ no meio basal escasso quase dobrou sua concentração celular em relação ao meio sem os oligossacarídeos, indo de 0,80 g/L (meio D) para 1,55 g/L (meio DX). Além disso, o crescimento do meio DX também superou os crescimentos da bactéria nos meios basais abundantes em nutrientes, os quais apresentaram 1,26 g/L (meio C) e 1,15 g/L (meio CX) de concentração celular, conforme **Figura 2**.

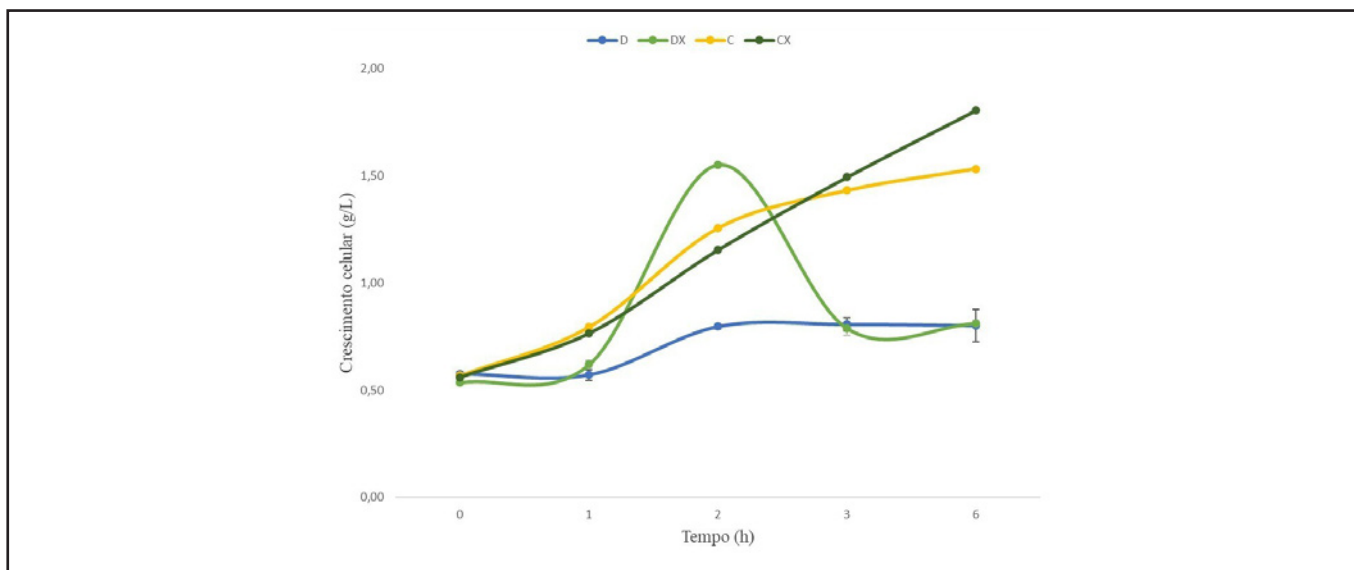


Figura 2. Concentração celular de *S. xylosus* durante 6 horas de fermentação nos meios C (caldo nutriente) e CX (caldo nutriente com 0,47 g/L de XOS₂₋₃), D (caldo nutriente diluído 4x) e DX (caldo nutriente diluído 4x com 0,64 g/L de XOS₂₋₃)

Em relação ao consumo dos oligossacarídeos para o tempo de 2 horas, quando os XOS_{2-3} estavam mais acessíveis no meio, causado pela menor disponibilidade de nutrientes do meio basal escasso (meio DX), a bactéria consumiu cerca de 63,0% de X2 e de 46,0% de X3 e apenas 19,6% e 5,0%, respectivamente, para os meios oligômeros no meio CX, indicando que os XOS_{2-3} são bons estimuladores de crescimento para esta bactéria *S. xylosus*, já que o consumo dos oligossacarídeos permitiu que a bactéria crescesse mais em relação aos meios basais com altas concentrações de carbono.

Já para as 6 horas de ensaio, a *S. xylosus* consumiu apenas 22,4% de X2 e de 9,7% de X3 no meio CX contra 64,4% e 46,8%, na devida ordem, para os mesmos oligossacarídeos do meio DX, ficando evidente que, para o meio basal rico em nutrientes, a bactéria consumiu primeiramente e preferencialmente, as fontes de carbono do meio basal em relação aos XOS_{2-3} . Além disso, enquanto a bactéria consome gradualmente os oligômeros ao longo do tempo no meio CX, para o meio DX, o consumo é feito bruscamente durante a primeira hora, o qual se correlaciona com o máximo crescimento após 2 horas de ensaio, como apresentado na **Figura 3**.

Muitos trabalhos afirmam que a inibição de bactérias patogênicas por bactérias probióticas esteja relacionada com produção de ácidos metabólicos, como os ácidos graxos de cadeias curtas, que impedem o crescimento dos microrganismos nocivos por competição, provocando uma queda característica no pH do meio^{26,48}. Entretanto, neste estudo, foi observado o aumento do pH de 7,2 para 8,5 no meio CX, e de 7,2 para 7,9 para o meio DX, após as 6 horas de ensaio.

Além da glicose, os microrganismos também são capazes de catabolizar outros carboidratos, lipídeos e proteínas para a produção de energia. Entre eles, as proteínas são formadas por unidades de grupos carboxilas de um aminoácido que se conectam, através das ligações peptídicas, com o grupo amina de outro aminoácido subsequente, sendo ótimas fontes tanto de carbono quanto de nitrogênio⁵⁰. Em meios complexos compostos por extratos de carne, extrato de leveduras e peptonas, formados principalmente por proteínas, o pH tende a aumentar devido à formação de íons amônio (NH_4^+) em solução a partir da liberação do grupo amina dos aminoácidos. Para que a bactéria consiga catabolizar as proteínas, primeiramente, enzimas são excretadas para decompor as macromoléculas em aminoácidos. Em seguida, estas são convertidas em moléculas aceitas pelo ciclo de Krebs. Um dos mecanismos envolvidos nesta

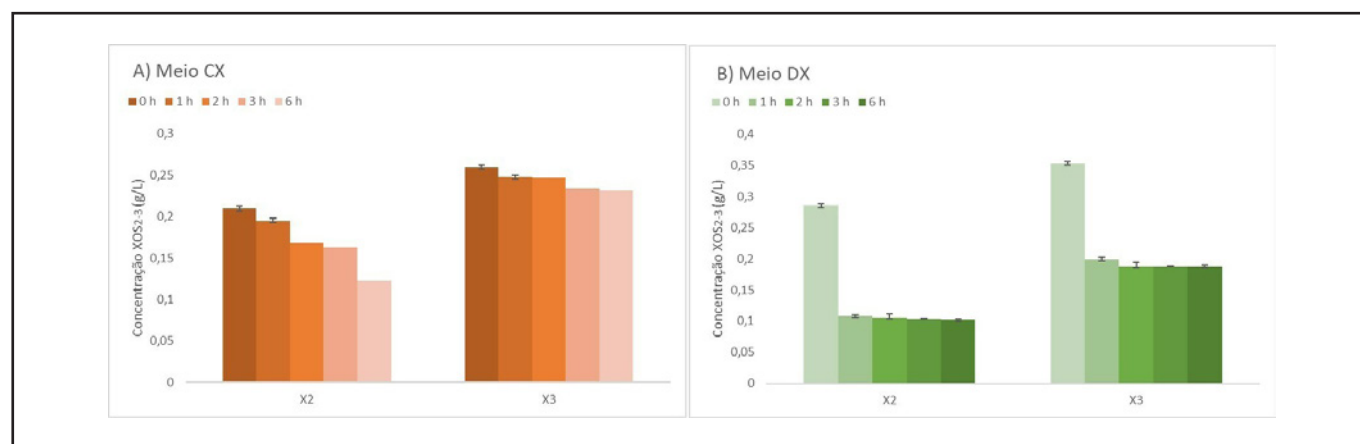


Figura 3. Perfil de consumo de xilobiose (X2) e xilotriose (X3) do hidrolisado durante 6 horas de fermentação da bactéria *Staphylococcus xylosus* para os meios A) CX (caldo nutriente com 0,47 g/L de X2+X3) e B) DX (caldo nutriente diluído 4x com 0,64 g/L de X2+X3)

segunda etapa é a desaminação, em que o grupo amina é removido do aminoácido para que somente o hidrocarboneto entre no ciclo. Por esta razão, também se nota que o pH do meio CX, o qual possui maiores concentrações dos nutrientes complexos, aumenta mais do que o do meio DX.

Para investigar o efeito probiótico da bactéria *S. xylosus* em pele através de mecanismos de excreção de moléculas antimicrobianas ácidas para combater espécies patogênicas, mais pesquisas seriam necessárias em meios menos complexos. Entretanto, Leroy et al²⁷ observaram que cepas dessa bactéria conseguiram inibir ou reduzir a formação de biofilmes pela espécie *Staphylococcus aureus*, bactéria patogênica da pele responsável por infecções hospitalares, a partir da excreção de peptídeos antimicrobianos. Neste presente estudo, os resultados de crescimento celular e consumo de X2 e X3 indicaram que os XOS do licor obtido dos resíduos de eucalipto apresentaram potencial prebiótico para a bactéria em questão, embora sua aplicação tópica ainda seja insuficientemente investigada.

CONCLUSÃO

A integração entre a destoxificação por adsorção de carvão ativado e a hidrólise enzimática aplicada no LB_{RE} de resíduos de eucalipto formou um licor rico em xilobiose e xilotriose com baixas concentrações de compostos inibidores. Apesar da carbonização do carvão ativado granulado (C_{G-CA}) gerar um material eficaz para a remoção dos compostos propostos, a adsorção com o C_{P6} foi empregada para obtenção do LD, pois além de evitar tratamentos prévios adicionais, adsorveu ligeiramente mais efetivamente os inibidores e gerou menores perdas de XOS na fase líquida. Os ensaios de crescimento da *S. xylosus* mostraram que, apesar da bactéria consumir, preferencialmente e primeiramente, as fontes de carbono do meio basal, na escassez dos mesmos, a bactéria se mostrou hábil em consumir XOS₂₋₃, pela maior acessibilidade dos oligossacarídeos no meio, e apresentou máximo crescimento evidenciando os XOS₂₋₃ como bons candidatos para estimulação da bactéria *S. xylosus*. Esse estudo também propõe uma abordagem sustentável que incentiva o uso de biomassas lignocelulósicas como fonte de potenciais ingredientes prebióticos com valor agregado e prestigiados pelas indústrias farmacêuticas e cosméticas.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não existir conflitos de interesse.

FINANCIAMENTO

Este trabalho foi apoiado pelo Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo – Fapesp [subvenção n°. 2015/50612-8].

AGRADECIMENTO

Ao laboratório de Engenharia Bioquímica, Biorrefinaria e Produtos de Origem Renovável (LEBBPOR) da Faculdade de Engenharia Química (FEQ) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) pela infraestrutura para execução das análises. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto de pesquisa.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Concepção, planejamento, desenvolvimento de metodologias experimentais, análises experimentais, interpretação dos dados, e escrita (rascunho original, revisão e edição): Mariana Gomes Moreira; Planejamento, desenvolvimento de metodologias e análises experimentais: Jenniffer Andrea Tamayo Pena; Concepção, validação de recursos, supervisão e escrita (revisão e edição): Telma Teixeira Franco.

NOTA DE APRESENTAÇÃO

Os resultados deste artigo integram a dissertação de mestrado de Mariana Gomes Moreira, do Programa de Pós-Graduação de Engenharia Química (FEQ) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

REFERÊNCIAS

1. Indústria Brasileira de Árvores – IBÁ. Relatório anual IBÁ 2021. [acesso 2022 Jul 18]. Disponível em: https://iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/relatorioiba2021-compactado.pdf?utm_source=akna&utm_medium=email&utm_campaign=iba-lanca-relatorio-anual-2021
2. Ávila PF, Martins M, Costa FAA, Goldbeck R. Xylooligosaccharides production by commercial enzyme mixture from agricultural wastes and their prebiotic and antioxidant potential. *Bioact Carbohydr Diet Fibre*. 2020;24:100234. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2020.100234>
3. Ahmad N, Zakaria MR. Oligosaccharide from hemicellulose. Chapter 8. In: Ariffin H, Sapuan SM, Hassan MA, Editors. *Lignocellulose for Future Bioeconomy*, Elsevier; 2019.p.135-52. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816354-2.00008-6>
4. Otieno DO, Ahring BK. A thermochemical pretreatment process to produce xylooligosaccharides (XOS), arabinooligosaccharides (AOS) and mannoooligosaccharides (MOS) from lignocellulosic biomasses. *Bioresour Technol*. 2012;112:285-92. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.162>
5. Gibson GR, Hutkins R, Sanders ME, Prescott SL, Reimer RA, Salminen SJ et al. The International scientific association for probiotics and prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;14(8):491-502. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>
6. Jia H, Shao T, Zhong C, Li H, Jiang M, Zhou H et al. Evaluation of xylitol production using corncob hemicellulosic hydrolysate by combining tetrabutylammonium hydroxide extraction with dilute acid hydrolysis. *Carbohydr Polym*. 2016;151:676-83. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.013>
7. Misra S, Raghuwanshi S, Saxena RK. Evaluation of corncob hemicellulosic hydrolysate for xylitol production by adapted strain of *Candida tropicalis*. *Carbohydr Polym*. 2013;92(2):1596-601. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.11.033>

8. Cao R, Xu Y. Efficient preparation of xylonic acid from xylonate fermentation broth by bipolar membrane electrodialysis. Appl Biochem Biotechnol. 2019;187(1):396-406.
<https://doi.org/10.1007/s12010-018-2827-y>
9. Antunes FAF, Santos JC, Chandel AK, Carrier DJ, Peres GFD, Milessi TSS et al. Repeated batches as a feasible industrial process for hemicellulosic ethanol production from sugarcane bagasse by using immobilized yeast cells. Cellulose. 2019;26(6):3787-800.
<https://doi.org/10.1007/s10570-019-02341-z>
10. Nascimento BF, Araujo CMB, Nascimento AC, Silva FLH, Melo DJN, Jaguaribe EF et al. Detoxification of sisal bagasse hydrolysate using activated carbon produced from the gasification of açai waste. J Hazard Mater. 2021;409:124494.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124494>
11. Mussatto SI, Roberto IC. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. Bioresour Technol. 2004;93(1):1-10.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.10.005>
12. van Zyl C, Prior BA, du Preez JC. Acetic acid inhibition of d-xylose fermentation by *Pichia stipitis*. Enzyme Microb Technol. 1991;13(1):82-6.
[https://doi.org/10.1016/0141-0229\(91\)90193-E](https://doi.org/10.1016/0141-0229(91)90193-E)
13. Arruda PV, Chaud LCS, Felipe MGA, Pivetta LR. Efeito da destoxificação do hidrolisado de bagaço de cana sobre a remoção de fenóis, a perda de açúcares e a bioconversão de xilose em xilitol. Nucleus. 2008;5(1):166-182.
<https://doi.org/10.3738/192-227869>
14. Nascimento RF, Lima ACA, Vidal CB, Melo DQ, Raulino GSC. Adsorção: aspectos teóricos e aplicações ambientais. E-book. 2. ed. Fortaleza (CE): Imprensa Universitária; 2020. [acesso em 2022 Jul 28]. Disponível em:
<http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/53271>
15. Bansal RC, Goyal M. Activated carbon adsorption. Roca Raton (NY): CRC Press; 2005.
<https://doi.org/10.1201/9781420028812>
16. Ramos PH, Guerreiro MC, Resende EC, Gonçalves M. Production and characterization of activated carbon prepared from PVA defect coffee. Quím Nova. 2009;32(5):1139-43.
<https://doi.org/10.1590/s0100-40422009000500011>
17. Yagmur E, Ozmak M, Aktas Z. A novel method for production of activated carbon from waste tea by chemical activation with microwave energy. Fuel. 2008;87(15-16):3278-85.
<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2008.05.005>

18. Costa-Trigo I, Paz A, Otero-Penedo P, Outeirino D, Oliveira RPS, Domínguez JM. Detoxification of chestnut burrs hydrolyzates to produce biomolecules. *Biochem Eng J*. 2020;159:107599.
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107599>
19. Alves LA, Felipe MGA, Silva JBAE, Silva SS, Prata AMR. Pretreatment of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. *Appl Biochem Biotechnol*. 1998;70:89-98.
<https://doi.org/10.1007/BF02920126>
20. Polizeli MLTM, Rizzatti ACS, Monti R, Terenzi HF, Jorge JA, Amorin DS. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2005;67(5):577-91.
<https://doi.org/10.1007/s00253-005-1904-7>
21. Zhang H, Han L, Dong H. An insight to pretreatment, enzyme adsorption and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: experimental and modeling studies. *Renew Sustain Energy Rev*. 2021;140:110758.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.110758>
22. Pesquisa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA. Xilanases microbianas e suas aplicações industriais. [acesso em 2022 Jul 28]. Disponível em:
<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1134008/1/Xilanases-microbianas-e-suas-aplicac807o771es-industriais-2021.pdf>
23. Brenelli LB, Figueiredo FL, Damasio A, Franco TT, Rabelo SC. An integrated approach to obtain xylo-oligosaccharides from sugarcane straw: from lab to pilot scale. *Bioresour Technol*. 2020;313:123637.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123637>
24. Krutmann J. Pre- and probiotics for human skin. *J Dermatol Sci*. 2009;54(1):1-5.
<https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2009.01.002>
25. Stavropoulou DA, Maere H, Berardo A, Janssens B, Filippou P, Vuyst L et al. Pervasiveness of *Staphylococcus carnosus* over *Staphylococcus xylosus* is affected by the level of acidification within a conventional meat starter culture set-up. *Int J Food Microbiol*. 2018;274:60-6.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.03.006>
26. Egert M, Simmering R, Riedel CU. The association of the skin microbiota with health, immunity, and disease. *Clin Pharmacol Ther*. 2017;102(1):62-9.
<https://doi.org/10.1002/cpt.698>
27. Leroy S, Lebert I, Andant C, Talon R. Interaction in dual species biofilms between *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus aureus*. *Int J Food Microbiol*. 2020;326:108653.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108653>

28. Tamayo-Pena JA, Felix TC, Pacheco LCA, Brenelli LB, Gonçalves AR, Franco TT. BBEST 2020-21/ Biofuture Summit II. Dezembro de 2020; São Paulo.
29. Heylmann KKA, Lopes BV, Afonso TF, Demarco CF, Cadaval Junior TR, Quadro MS et al. Produção, caracterização e aplicação de carvão ativado de caroço de pêssego no tratamento de efluente têxtil. Eng Sanit Ambient. 2021;26(3):485-94.
<https://doi.org/10.1590/S1413-415220190226>
30. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal Chem. 1959;31(3):426-8.
<https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
31. Rocha GJM, Gonçalves AR, Oliveira BR, Olivares EG, Rossell CEV. Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. Ind Crop Prod. 2012;35(1):274-9.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.07.010>
32. Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D. Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples: Laboratory Analytical Procedure (LAP). Technical Report NREL/TP-510-42623; 2006. Disponível em:
<https://www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42623.pdf>
33. Lian Z, Wang Y, Luo J, Lai C, Yong Q, Yu S. An integrated process to produce prebiotic xylooligosaccharides by autohydrolysis, nanofiltration and endo-xylanase from alkali-extracted xylan. Bioresour Technol. 2020;314:123685.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123685>
34. Antunes FAF, Thomé LC, Santos JC, Ingle AP, Costa CB, Anjos V et al. Multi-scale study of the integrated use of the carbohydrate fractions of sugarcane bagasse for ethanol and xylitol production. Renew Energy. 2021;163:1343-55.
<https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.08.020>
35. Wikandari R, Millati R, Syamsiyah S, Muriana R, Ayuningsih Y. Effect of furfural, hydroxymethylfurfural and acetic acid on indigeneous microbial isolate for bioethanol production. Agric J. 2010;5(2):105-9.
<https://doi.org/10.3923/aj.2010.105.109>
36. Ge L, Zhao C, Chen S, Li Q, Zhou T, Jiang H et al. An analysis of the carbonization process and volatile-release characteristics of coal-based activated carbon. Energy. 2022;257:124779.
<https://doi.org/10.1016/j.energy.2022.124779>
37. Sujiono EH, Zabrian D, Zurnansyah, Mulyati, Zharvan V, Samnur et al. Fabrication and characterization of coconut shell activated carbon using variation chemical activation for wastewater treatment application. Results Chem. 2022;4:100291.
<https://doi.org/10.1016/j.rechem.2022.100291>

38. Vargas DP, Giraldo L, Moreno-Piraján JC. Co₂ adsorption on granular and monolith carbonaceous materials. J Anal App Pyrolysis. 2012;96:146-52.
<https://doi.org/10.1016/j.jaap.2012.03.016>
39. Paniagua-García AI, Hijosa-Valsero M, Díez-Antolínez R, Sánchez ME, Coca M. Enzymatic hydrolysis and detoxification of lignocellulosic biomass are not always necessary for ABE fermentation : The case of *Panicum virgatum*. Biomass Bioenergy. 2018;116:131-9.
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.06.006>
40. Evstigneyev EI, Shevchenko SM. Structure, chemical reactivity and solubility of lignin: a fresh look. Wood Sci Technol. 2019;53:7-47.
<https://doi.org/10.1007/s00226-018-1059-1>
41. Horvath AL. Solubility of structurally complicated materials: I. Wood. J Phys Chem Ref Data. 2006;35:77-92.
<https://doi.org/10.1063/1.2035708>
42. Ahmedna M, Marshall WE, Rao RM. Granular activated carbons from agricultural by-products: preparation, properties, and application in cane sugar refining. Louisiana State University, LSU Digital Commons. Bulletin 869; 2000. p. 1-56. Disponível em:
https://digitalcommons.lsu.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1038&context=agcenter_bulletins
43. Adekola FA, Oba IA. Biosorption of formic and acetic acids from aqueous solution using activated carbon from shea butter seed shells. Appl Water Sci. 2016;7(6):2727-36.
<https://doi.org/10.1007/s13201-016-0491-3>
44. Pino MS, Rodríguez-Jasso RM, Michelin M, Flores-Gallegos A, Morales-Rodríguez R, Teixeira JA et al. Bioreactor design for enzymatic hydrolysis of biomass under the biorefinery concept. Chem Eng J. 2018;347:119-36.
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.04.057>
45. Santibáñez L, Henríquez C, Corro-Tejeda R, Bernal S, Armijo B, Salazar O. Xylooligosaccharides from lignocellulosic biomass: a comprehensive review. Carbohydr Polym. 2021;251:117118.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117118>
46. García-Ruiz A, Bartolomé B, Martínez-Rodríguez AJ, Pueyo E, Martín-Álvarez PJ, Moreno-Arribas MV. Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. Food Control. 2008;19(9):835-41.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.08.018>
47. Basak B, Jeon BH, Kim TH, Lee JC, Chatterjee PK, Lim H. Dark fermentative hydrogen production from pretreated lignocellulosic biomass: effects of inhibitory byproducts and recent trends in mitigation strategies. Renew Sustain Energy Rev. 2020;133:110338.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110338>

48. Boonchuay P, Wongpoomchai R, Jaturasitha S, Mahatheeranont S, Watanabe M, Chaiyaso T. Prebiotic properties, antioxidant activity, and acute oral toxicity of xylooligosaccharides derived enzymatically from corncob. Food Biosci. 2021;40:100895.
<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.100895>
49. Farfan JA. Química de proteínas: aplicada à ciência e tecnologia dos alimentos. 2. ed. Campinas (SP): Editora da UNICAMP; 1994.
50. Lehninger TM, Nelson DL, Cox MM. Princípios de bioquímica. 6. ed. Editora Artmed; 2014.



New occurrence of lepidopterism by *Hylesia nigricans* (Berg, 1875) (Lepidoptera: Saturniidae) in Rio Grande do Sul, Brazil

Nova ocorrência de lepidopterismo por *Hylesia nigricans* (Berg, 1875) (Lepidoptera: Saturniidae) no Rio Grande do Sul, Brasil

Diego Dutra Silveira¹ , Marco Antônio Barreto de Almeida¹ , Edmilson dos Santos¹ , Rosângela Brito² , Wilson Sampaio de Azevedo Filho³ , Jáder da Cruz Cardoso^{1*} 

¹ Divisão de Vigilância Ambiental em Saúde, Centro Estadual de Vigilância em Saúde, Secretaria de Saúde do Estado do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

² Embrapa Cerrados, Planaltina, Distrito Federal, DF, Brasil.

³ Museu de Ciências Naturais – Entomologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, Brasil.

*Corresponding author/Autor de correspondência: jader-cardoso@saude.rs.gov.br

Received/Recebido: 08.09.2022 – Accepted/Aceito: 20.04.2023

ABSTRACT

Adult forms of lepidopterans can cause health problems. This type of incident is known as Lepidopterism, which is caused by contact with urticating setae released by adults, such as those from the *Hylesia* Hübner (Saturniidae) genus. In this study, the objective is to document a new occurrence of lepidopterism caused by specimens of *Hylesia nigricans* (Berg, 1875) (Lepidoptera: Saturniidae). The outbreak took place in the summer of 2017 in the municipality of Três Coroas, Rio Grande do Sul, Brazil. During this period, approximately 300 people were affected by dermatitis in the municipality. The outbreak resulted from the release of two types of urticating setae by female moths in the area. We want to emphasize that in case of proliferation of this moth species, it is essential to instruct the population to avoid direct contact with these insects. Monitoring these groups of lepidopterans is fundamental in facilitating decision-making and ensuring public health.

Keywords. Dermatitis, Environmental Health Surveillance, Moths, Pruritus, Public Health.

RESUMO

Formas adultas de lepidópteros podem causar problemas de saúde. Esse tipo de acidente é conhecido como lepidopterismo, causado pelo contato com cerdas urticantes liberadas por adultos, como as do gênero *Hylesia* Hübner (Saturniidae). Neste estudo, o objetivo é registrar uma nova ocorrência de lepidopterismo causado por espécimes de *Hylesia nigricans* (Berg, 1875) (Lepidoptera: Saturniidae). O surto ocorreu no verão de 2017, no município de Três Coroas, Rio Grande do Sul, Brasil. No período, aproximadamente 300 pessoas foram acometidas por dermatite no município. O surto foi causado pela liberação de dois tipos de setas urticantes das mariposas fêmeas no ambiente. Ressaltamos que na ocorrência da proliferação dessa espécie de mariposa, é importante instruir a população a evitar o contato direto com esses insetos. O monitoramento desses grupos de lepidópteros é fundamental para facilitar a tomada de decisões e garantir a saúde pública.

Palavras-chave. Dermatite, Vigilância Ambiental em Saúde, Mariposas, Prurido, Saúde Pública.

INTRODUCTION

The lepidopterans (butterflies and moths), represent a group of insects relevant to public health. Some species of this order stand out due to the adverse reactions caused by direct or indirect contact with the larval forms (erucism) or with adult insects (lepidopterism)¹. The most relevant episodes of erucism in Brazil are often associated with accidents caused by some *Lonomia* (Saturniidae) species, from which the larvae venom affects blood clotting mechanisms in humans².

Adult forms of some lepidopterans can also cause health problems, although it is less common^{3,4}. This kind of accident is known as Lepidopterism, caused by contact with urticating setae released by adults, such as from the *Hylesia* Hübner (Saturniidae) genus^{1,5,6}. So far, studies suggest that only *Hylesia* females have urticating setae^{7,8}, normally used to cover and protect their eggs after laying^{3,6-8}. In contact with human skin or mucosa, these setae may cause several reactions, such as swelling, itching, erythema, pruritic spots, fever, and malaise⁹.

The *Hylesia* group presents around 110 species with neotropical distribution from Mexico to Argentina¹⁰. Outbreaks of lepidopterism are usually associated with the high density of these insects. Events of this nature have been described in Central and South America, in countries such as Mexico, Costa Rica, French Guiana, Suriname, Venezuela, Peru, Argentina and Uruguay¹¹⁻¹⁴.

In Brazil, the first record of an outbreak occurred officially in Amapá in May 1960¹⁵. The presence of *Hylesia* species adults in the region was related to several cutaneous reactions in the local population. In 1980, Mascarenhas et al¹⁶ described an outbreak in the municipality of Montes Claros, Minas Gerais State. In São Paulo State, 12 cities registered cases of dermatitis from December 1989 to December 1991. Bertioiga municipality stands out due to 612 hospital notifications where the local health authorities identified *Hylesia paulex* (Dognin, 1922) as the species causing the outbreak¹⁷.

In the Rio Grande do Sul State (RS), the first outbreak of lepidopterism was reported between December 1999 and January 2000. Specimens of the moth *Hylesia nigricans* (Berg, 1875) (Lepidoptera: Saturniidae) were identified as the cause of dermatitis in the municipalities of Três Coroas and Igrejinha in the Vale do Rio Paranhana, with the latter registering 168 cases³. A new outbreak occurred over the summer of 2017 in the Três Coroas municipality, which motivates the present report. In this context, this paper aims to record the occurrence of lepidopterism caused by *H. nigricans* and discuss morphological and ecological aspects involved in the event.

MATERIAL AND METHODS

The municipality of Três Coroas (29°31'3"S 50°46'16"W) is located in Rio Grande do Sul, covering an area of 185.5 km² distributed along the state highway RS-115, adjacent to the Serra Geral highway (RS-120). The city is situated 53 meters above sea level and is approximately 91 km from the state capital, Porto Alegre, with around 30,000 inhabitants. The municipality falls on the boundary of the humid subtropical warm and humid subtropical temperate climates, according to the Köppen classification. The average annual temperature is around 20 °C, and the average rainfall varies from 1,900 to 2,200 mm/year¹⁸.

In January 2017, the Municipal Health Secretariat of Três Coroas notified the State Center for Health Surveillance (CEVS), an organ of the State Health Secretariat, about a significant increase in cases of dermatitis in the local hospital.

On January 10, 2017, members of the Environmental Health Surveillance Division (DVAS) of CEVS went to Três Coroas to support the municipal Epidemiological and Environmental Surveillance team. During the investigation, some specimens of moths (males and females) were collected and placed in

containers containing 70% alcohol for identification. The taxonomic identification of the specimens took place in the Insect Morphology and Behavior Laboratory of the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS) using taxonomic references (e.g., Lemaire¹⁹, Specht et al²⁰, and Bonatto et al²¹).

RESULTS

According to the data made available to DVAS, 297 cases of dermatitis were recorded between December 15, 2016, and January 15, 2017. Of these, 275 were registered in urban areas and 21 patients were from rural areas. Notably, one of the reported cases had no description of the location of occurrence.

The moths collected in the municipality during the lepidopterism outbreak were identified as *Hylesia nigricans* (Figure Part A). The species has grayish-dark wings with a large number of golden yellow setae covering the ventral and lateral abdominal region. However, sexual dimorphism occurs in the species as males are lighter in color with a smaller wingspan than females. Many adult specimens were recorded resting on building facades in the urban area (Figure Part B). Moreover, several eggs covered with setae were laid in these locations (Figures Parts C-D). A total of 1.1% of the Três Coroas population was affected by dermatitis. Compared with the last outbreak in the state³, it represents a high number.

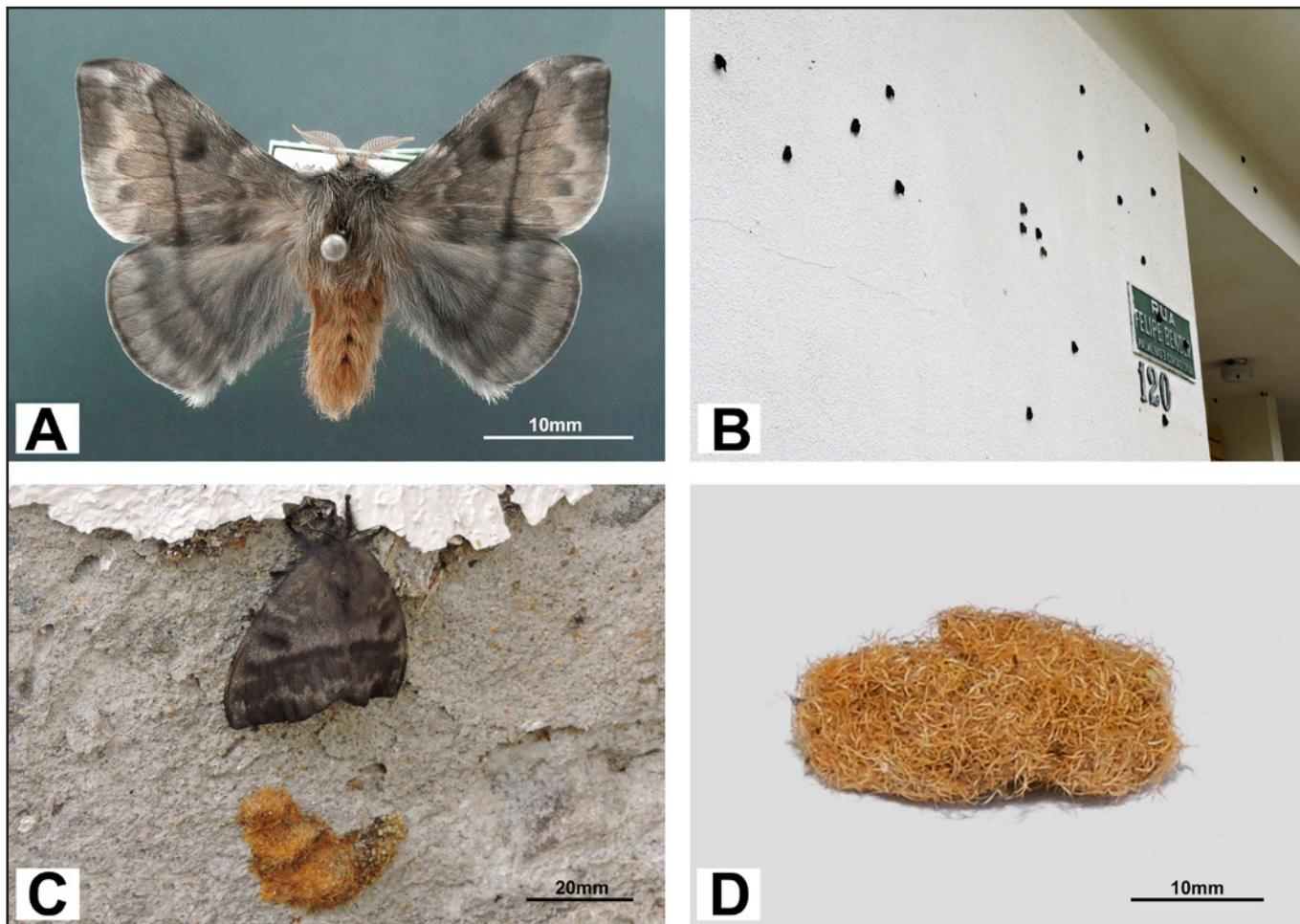


Figure. A. *Hylesia nigricans* (Berg, 1875), dorsal view (♂); B. Specimens occurring in urban area during lepidopterism outbreak; C. *H. nigricans* (♀) near the egg mass; D. Egg mass of *H. nigricans*

DISCUSSION

Hylesia nigricans is widely distributed from southeastern to southern Brazil, with occurrence in neighbouring countries like Argentina and Uruguay^{19,21}. The species exhibits a remarkable sexual dimorphism, with wingspan measurements – anterior wing ~36 mm (males) / ~49 mm (females) and hind wing ~19 mm (males) / ~25 mm (females), corroborating the morphology of the specimens collected in this study^{19,21}.

This moth species is considered univoltine, spending the winter or dry seasons in egg form and emerging between spring and summer^{8,20}. Moreover, climate variations can alter this species' life cycle, leading to earlier or later larvae hatching. The species was recorded in January, February, March, May, October, November and December, according to other studies in the state^{8,21}.

In the state, the first outbreak of lepidopterism caused by *H. nigricans* was recorded in early summer, coinciding with the outbreak period recorded in this study. The occurrence of lepidopterism outbreaks varies according to the period of the emergence of adults. In southern Brazil, adult specimens are usually observed between November and May²⁰.

The habit of *H. nigricans* is crepuscular and/or nocturnal, and the specimens are attracted by the light²². The nighttime illumination of the urban area of Três Coroas was possibly one of the factors responsible for attracting many *H. nigricans* specimens.

Scales are found on both females and males of *H. nigricans*. The scales appear to have no urticating action, unlike the setae, which have such properties⁸. The setae morphology resembles those described for *H. metabus* Cramer and *H. oratex* Dyar^{6,7}. The S3 seta, according to Rodriguez et al⁷ is cylindrical and has tiny barbs directed toward the distal end, possibly related to allergic reactions caused by penetration into human skin. The S4 seta is cylindrical at the base and flattened towards the apex, with numerous barbs and pores that may be associated with allergic reactions through penetration and contact with the irritating substance released by the seta⁶⁻⁸.

Lepidopterism by *Hylesia* does not necessarily involve direct contact with the moths; usually, the contact that triggers dermatitis is with the setae detached from the insect's body and present in the environment²³. Mechanical stimuli can easily promote the detachment of these setae, mainly during adult flight, possibly forming floating clouds carried by the wind until they come into contact with the skin or objects manipulated by humans^{15,24}. Moreover, people may come into direct contact with the urticating setae that cover the egg masses laid on the leaves of host plants²⁵. *Hylesia nigricans* uses more than 30 plant species to lay eggs and feed larvae²⁰.

The number of dermatitis cases in rural areas is considered low compared to that in urban areas. In the outbreak described here, 92.6% of the patients were reported in urban areas, and only 7.1% were from rural areas, corroborating other data in the literature¹⁷. Rural areas may serve as breeding grounds, and at opportune moments these insects may migrate to urban centres when attracted by brightness. However, this has not put rural areas at higher risk. Nevertheless, it may highlight the importance of better understanding the involvement of these municipalities in this type of mechanism. In this context, it is important to consider that whenever events of higher moth proliferation are detected, it is essential to instruct the population to avoid any direct contact with the insects or with their setae spread in the environment.

Iserhard et al³ had already recommended the monitoring of dermatitis records by the local authorities of Igrejinha and Três Coroas, as well as the adoption of primary preventive measures. As prophylactic methods, the manual destruction of egg masses, the washing of walls in buildings and residences, and the reduction of public lighting may reduce the number of dermatitis cases. However, it's important to note that these suggestions should only be implemented in an outbreak situation when there is an imbalance in the *Hylesia* populations, treating them as harmful synanthropic pests that can be controlled²⁶. We emphasize that these practices should only be carried out by professionals from health and surveillance agencies.

Some feasible measures can be recommended to the local population as a preventive method, external to an installed outbreak or in outbreak situations. For example, keeping doors and windows closed or protected with screens, especially during in the twilight when moths are more active; cleaning all surfaces in the house with a damp cloth and using gloved hands; handling bedding with care, washing it regularly, and keeping it in closed closets.

Moreover, when in direct contact with the setae, it is recommended to wash the affected area with fresh water and neutral soap and seek medical attention in case of worsening allergic reactions. Furthermore, if there is negligence regarding the care of this type of dermatitis/accident (lepidopterism) in humans, it is even greater in animals. Thus, it is also worth pointing out the importance of observing possible allergic processes in pets to seek the appropriate veterinary treatment.

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' CONTRIBUTIONS

All the authors contributed to the study delineation, writing the manuscript, analysis, data compilation and critical review. Diego Dutra Silveira, Jáder da Cruz Cardoso, Rosângela Brito and Wilson Sampaio de Azevedo Filho elaborated the figures and discussed the data. All authors approved the final content.

REFERENCES

1. Hossler EW. Caterpillars and moths. *Dermatol Therapy*. 2009;22(4):353-66.
<https://doi.org/10.1111/j.1529-8019.2009.01247.x>
2. Carrijo-Carvalho LC, Chudzinski-Tavassi AM. The venom of the *Lonomia* caterpillar: An overview. *Toxicon*. 2007;49(6):741-57.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.033>

3. Iserhard CA, Kaminski LA, Marchiori MO, Teixeira EC, Romanowski HP. Occurrence of Lepidopterism caused by the moth *Hylesia nigricans* (Berg) (Lepidoptera: Saturniidae) in Rio Grande do Sul State, Brazil. Neotrop entomol. 2007;36(4):612-5.
<https://doi.org/10.1590/S1519-566X2007000400022>
4. Moreira SC, Lima JC, Silva L, Haddad Junior V. Descrição de um surto de Lepidopterismo (dermatite associada ao contato com mariposas) entre marinheiros, ocorrido em Salvador, Estado da Bahia. Rev Soc Bras Med Trop. 2007;40(5):591-3. Available from:
<https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/DtWM6T89GH6zbwqXJVwczbs/?lang=pt&format=pdf>
5. Cardoso JLC. Erucismo e Lepidopterismo. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Malaque CMS, Haddad Junior V, organizadores. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. 1 ed. São Paulo: Editora Sarvier; 2003. p. 220-3.
6. Brito R, Specht A, Filho WSA, Fronza E, Mielke CGC. Abdominal macrochaetae of female *Hylesia oratex* Dyar, 1913 (Insecta: Lepidoptera: Saturniidae): external morphology and medical significance. An Acad Bras Cienc. 2015;87(3):1763-70.
<https://doi.org/10.1590/0001-3765201520130141>
7. Rodriguez J, Hernández JV, Fornés L, Lundberg U, Piñango CLA, Osborn F. External morphology of abdominal setae from male and female *Hylesia metabus* adults (Lepidoptera: Saturniidae) and their function. Fla Entomol. 2004;87(1):30-6.
[https://doi.org/10.1653/0015-4040\(2004\)087\[0030:EMOASF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1653/0015-4040(2004)087[0030:EMOASF]2.0.CO;2)
8. Specht A, Corseuil E, Abella HB. Lepidópteros de importância médica: principais espécies no Rio Grande do Sul. Specht A, editor. 1 ed. Pelotas: Editora USEB; 2008. 220 p.
9. Battisti A, Holm G, Fagrell B, Larsson S. Urticating hairs in arthropods: their nature and medical significance. Annu Rev Entomol. 2011;56:203-20.
<https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120709-144844>
10. Camargo AJA. A new species of de *Hylesia* Hübner (Lepidoptera, Saturniidae, Hemileucinae) from Brazilian Cerrado. Rev Bras Zool. 2007;24(1):199-202.
<https://doi.org/10.1590/S0101-81752007000100025>
11. Leger M, Mouzels P. Dermatose prurigineuse déterminée par des papillons saturnidés du genre *Hylesia*. Bull Soc Path Exot. 1918;11:104-7.
12. Fornés L, Hernández JV. Algunos aspectos de la biología de *Hylesia metabus* (Cramer 1775) (Lepidoptera: Saturniidae). Bol Entomol Venez. 2000;15:127-45.

13. Fornés L, Hernández JV. Reseña histórica e incidencia en la salud pública de *Hylesia metabus* (Cramer) (Lepidoptera: Saturniidae) en Venezuela. Entomotropica. 2001;16(2):137-41.
14. Willat G, Capdevila A, Martinez M, Benavides C, Carballo R. Brotes de dermatitis urticante por mariposas del género *Hylesia* em Uruguay. Rev Salud Pública. 2003;2:4-6.
15. Gusmão HH, Forattini OP, Roberg A. Dermatite provocada por lepidópteros do gênero *Hylesia*. Rev Inst Med Trop. 1961;3(3):114-120.
16. Mascarenhas CS, Vulcano MA, Pereira FS. Nova constatação de dermatite provocada por lepidópteros do gênero *Hylesia* Hubner. Lundiana. 1980;1:143-8.
17. Glasser CM, Cardoso JL, Carréri-Bruno GC, Domingos MF, Moraes RHP, Ciaravolo RMC. Surtos epidêmicos de dermatite causada por mariposas do gênero *Hylesia* (Lepidoptera: Hemileucinae) no Estado de São Paulo, Brasil. Rev Saúde Públ. 1993;27(3):217-20.
<https://doi.org/10.1590/S0034-89101993000300011>
18. Alvares CA, Stape JL, Sentelhas PC, Gonçalves JLM, Sparovek G. Köppen's climate classification map for Brazil. Meteorol Zeitschrift. 2013;22(6):711-28.
<https://doi.org/10.1127/0941-2948/2013/0507>
19. Lemaire C. The Saturniidae of America: Hemileucinae. Keltern: Goecke & Evers; 2002. Vol. 3, 1388 p.
20. Specht A, Formentini AC, Corseuil E. Biologia de *Hylesia nigricans* (Berg) (Lepidoptera, Saturniidae, Hemileucinae). Rev Bras Zool. 2006;23(1):248-55.
<https://doi.org/10.1590/S0101-81752006000100018>
21. Bonatto LD, Azevedo Filho WS, Fronza E. Saturnídeos: guia ilustrado das mariposas de Bento Gonçalves. Porto Alegre: Editora Evangraf; 2019. 158 p.
22. Cabrerizo S, Spera M, Roodt A. Accidentes por lepidópteros: *Hylesia nigricans* (Berg, 1875) o “mariposa negra”. Arch Argent Pediatr. 2014;112(2):179-82.
<https://doi.org/10.5546/aap.2014.179>
23. Salomon OD, Simon D, Rimoldi JC, Villaruel M, Perez O, Perez R et al. Lepidopterismo por *Hylesia nigricans* (mariposa negra). Investigación y acción preventiva en Buenos Aires. Medicina 2005; 65(3):241-6. Available from:
<http://sgc.anlis.gob.ar/handle/123456789/116>

24. Novak F, Pelissou V, Lamy M. Comparative morphological, anatomical and biochemical studies of the urticating apparatus and urticating hairs of some lepidoptera: *Thaumetopoea pityocampa* Schiff., *Th. processionea* L. (Lepidoptera, Thaumetopoeidae) and *Hylesia metabus* Cramer (Lepidoptera, Saturniidae). Comp Biochem Physiol. 1987;88(1):141-6.
[https://doi.org/10.1016/0300-9629\(87\)90112-5](https://doi.org/10.1016/0300-9629(87)90112-5)
25. Casalá A, Bianchi C, Sánchez Navarro JV, Bianchi O, Balsa R. Granuloma de las manos por nidos de lepidópteros (*Hylesia nigricans*). Arch Argent Dermat. 1967;17(4):307-13.
26. Ministério do Meio Ambiente (BR). Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Instrução Normativa nº 141, de 19 de dezembro de 2006. Regulamenta o controle e o manejo ambiental da fauna sinantrópica nociva. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 20 dez 2006. Seção 1(243):139-40.





Associação entre estado nutricional, indicadores socioeconômicos e quesito raça/cor em gestantes do Recôncavo da Bahia, Brasil

Association between nutritional status, socioeconomic indicators and race/color question in pregnant women in the Recôncavo da Bahia, Brazil

Larissa Ferreira de Oliveira^{*} , Clotilde Assis Oliveira , Jerusa da Mota Santana , Renata de Oliveira Campos 

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências da Saúde, Curso de Nutrição, Santo Antônio de Jesus, BA, Brasil.

*Autor de correspondência/Corresponding author: lariholiveira55@gmail.com

Recebido/Received: 06.01.2023 – Aceito/Accepted: 24.04.2023

RESUMO

O estado nutricional gestacional adequado constitui-se como elemento essencial para a saúde materna e fetal. Este estudo teve como objetivo identificar a associação entre determinantes sociais, quesito raça/cor e estado nutricional, em gestantes do Recôncavo da Bahia, Brasil. Trata-se de um estudo ecológico, com dados extraídos do Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional no ano de 2020, referente ao estado nutricional de gestantes adultas e adolescentes dos 19 municípios do Recôncavo da Bahia. Foi utilizada a regressão quantílica para a análise do desfecho do estado nutricional de gestantes, variável exposição principal, raça/cor autorreferida e covariáveis Coeficiente de Gini (CG) e Índice de Desenvolvimento Humano (IDHM). Foram acompanhadas 4.061 gestantes (14,35% eram adolescentes) com predominância daquelas que se autodeclararam pretas ou pardas (62,34%). Houve prevalência de excesso de peso em 53,36% das gestantes. Identificou-se associação positiva do excesso de peso com a raça/cor preta ou parda e inversamente ao CG. Este estudo revelou que o estado nutricional de gestantes é influenciado pela raça/cor preta e/ou parda e pelo CG. Tais resultados podem contribuir para o planejamento de programas e/ou projetos que incluam ações de alimentação e nutrição e visam o acompanhamento nutricional de gestantes, principalmente dos grupos socialmente vulnerabilizados.

Palavras-chave. Gestantes, Estado Nutricional, Insegurança Alimentar.

ABSTRACT

Adequate gestational nutritional status is an essential element for maternal and fetal health. The objective of this study was to identify the association between social determinants, race/color and nutritional status in pregnant women from Recôncavo da Bahia, Brazil. This ecological study, utilized data extracted from the 2020 Food and Nutrition Surveillance System, focusing on the nutritional status of adults and adolescents pregnant women across the 19 municipalities in the Recôncavo da Bahia. Quantile Regression was employed to analyze the nutritional status of pregnant women, considering the main exposure variable as self-reported race/color and covariates such as the Gini Coefficient and Human Development Index. In 2020, a total of 4,061 pregnant women were followed, with 14.35% being adolescents. The majority of pregnant women self-identified as black or brown (62.34%). The prevalence of overweight among pregnant women was 53.36%. The analysis revealed a positive association between overweight and black or brown race/color, while an inverse association was observed with the Gini Coefficient. These findings have implications for planning programs and projects that encompass food and nutrition interventions aimed at monitoring and improving the nutritional status of pregnant women, particularly those belonging to socially vulnerable groups.

Keywords. Pregnant Women, Nutritional Status, Food Insecurity.

INTRODUÇÃO

O estado nutricional gestacional adequado constitui-se como elemento essencial para a manutenção da saúde materna e infantil¹. Sendo assim, o acompanhamento nutricional no pré-natal torna-se imprescindível desde o início da concepção, pois evidências científicas mostram que o ganho de peso dentro da faixa recomendada constitui fator protetor contra complicações materno-fetais^{2,3}.

Tanto a desnutrição quanto o excesso de peso estão associados a desfechos gestacionais negativos para a mãe (hipertensão materna, diabetes gestacional e retenção ponderal pós-parto) e o feto (prematividade, baixo peso ou macrosomia e sofrimento fetal)^{2,4}. Assim, por meio da execução de ações de Vigilância Alimentar e Nutricional (VAN) nos serviços de saúde, é possível acompanhar e avaliar grupos de riscos, sobretudo em ciclos vulneráveis como o grupo materno e infantil⁵.

Desse modo, o acompanhamento pré-natal é de grande relevância, pois visa identificar previamente e tratar as intercorrências mais prevalentes no período gestacional, avaliar os hábitos alimentares, realizar orientações nutricionais e monitorar o ganho de peso durante toda a gestação⁶, permitindo assim, contribuir para o desenvolvimento saudável⁷.

A nutrição e saúde da gestante são influenciadas pela idade materna, estado nutricional pré-gestacional, preexistência de morbidades^{8,9}, bem como fatores psicológicos, econômicos e sociodemográficos que estão associados às alterações no consumo e qualidade nutricional e contribuem para o ganho de peso fora da faixa de recomendação¹⁰.

A Política Nacional de Alimentação e Nutrição (PNAN) visa melhorar as condições de vida da população e, para alcançar este propósito, estabeleceu sete diretrizes. A VAN constitui-se como a terceira diretriz da PNAN, a qual prevê a avaliação permanente das condições de saúde e nutrição da população e seus determinantes¹¹. Por meio da VAN é possível realizar ações de promoção da saúde com intuito de favorecer melhorias na qualidade de vida da população^{5,12}.

Na tentativa de apoiar as ações da VAN, foi instituído o Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional (SISVAN), o qual tem o objetivo de monitorar o consumo alimentar e o estado nutricional da população atendida na Atenção Primária à Saúde^{5,12}. Inicialmente estava associado apenas a programas sociais, e restrito ao acompanhamento do grupo materno-infantil, posteriormente foi ampliado para todas as fases da vida⁵.

Dentre os fatores que limitam a assistência à saúde da mulher no período gestacional estão as desigualdades social e racial. Estudos epidemiológicos revelam que gestantes negras realizam menos consultas pré-natais e recebem poucas instruções sobre o parto, o que reforça as disparidades sociais que perduram na sociedade, provenientes do processo de escravidão¹³. As mulheres negras também estão mais expostas à situação de Insegurança Alimentar e Nutricional (IAN) em comparação às mulheres brancas, com impacto no estado nutricional materno^{14,15}.

Portanto, considerando a influência da raça/cor no adequado estado nutricional, assim como a escassez de investigações científicas sobre a temática na região, este estudo teve como objetivo identificar a associação entre determinantes sociais, quesito raça/cor e estado nutricional em gestantes do Recôncavo da Bahia, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo ecológico, envolvendo dados secundários provenientes do SISVAN WEB, no ano de 2020, referente ao estado nutricional de gestantes adultas e adolescentes dos 19 municípios do Recôncavo da Bahia, Brasil.

O SISVAN WEB, versão *online*, é um sistema de informação em saúde que tem por finalidade consolidar dados referentes às ações da VAN, que incluem o registro de dados antropométricos e marcadores de consumo alimentar dos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS). Tais informações servem como orientador para o processo de tomada de decisão e contribuem para a implementação de ações voltadas para o controle dos problemas identificados e para a promoção da saúde e prevenção de possíveis agravos^{16,17}.

O Recôncavo da Bahia caracteriza-se como um território de identidade localizado na Mesorregião Metropolitana de Salvador, ocupando uma área de 4.570 km². É constituído pelo agrupamento dos municípios de Cabaceiras do Paraguaçu, Cachoeira, Castro Alves, Conceição do Almeida, Cruz das Almas, Dom Macedo Costa, Governador Mangabeira, Maragogipe, Muniz Ferreira, Muritiba, Nazaré, Salinas da Margarida, Santo Amaro, Santo Antônio de Jesus, São Felipe, São Félix, Sapeaçu, Saubara e Varzedo¹⁸. Segundo o censo demográfico realizado em 2011, 576.672 dos habitantes deste território, 69,2% residiam na área urbana¹⁸.

O desfecho deste estudo é o estado nutricional da gestante, classificado em baixo peso, eutrofia e excesso de peso, identificado por meio do Índice de Massa Corporal (IMC) = $\text{Peso(kg)}/\text{Altura}^2(\text{m})$, segundo idade gestacional e interpretado com base na curva de Atalah (1997), protocolo de atenção à saúde da gestante no SUS¹². As categorias sobrepeso e obesidade foram agrupadas e denominadas como excesso de peso¹².

A variável de exposição principal é a raça/cor autorreferida, segundo a classificação estabelecida pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), categorizada em branca, preta, parda, amarela e indígena¹⁹. As covariáveis são referentes ao município: Índice de Desenvolvimento Humano Municipal (IDHM) e o Coeficiente de Gini (CG).

O IDHM é um índice que avalia o desenvolvimento humano municipal, expresso entre 0 e 1, sendo classificado em: baixo (0,500-0,599); médio (0,600-0,699); e alto (0,700- 0,799)²⁰. Enquanto o CG revela a desigualdade na distribuição de renda e varia de 0 a 1, sendo 0 (igualdade), 0,5 (mediano) e 1 (desigual)²¹.

Após coleta, os dados foram digitados e analisados no *software Stata*, versão 14.0. Realizou-se análise descritiva apresentando as frequências absolutas e relativas para as variáveis categóricas. Para

quantificar o grau e a intensidade da associação entre as categorias do estado nutricional (baixo peso, eutrofia e excesso de peso) e as variáveis de exposição (raça/cor, CG), utilizou-se a Regressão Quantílica. Inicialmente, realizou-se análise bivariada entre as variáveis de exposição e desfecho. Por critério estatístico arbitrário, os autores selecionaram as variáveis para a análise multivariada que apresentaram coeficientes de determinação de mais de um aumento no número absoluto de mulheres na categoria de baixo peso, eutrofia e excesso de peso.

Este estudo utilizou dados secundários provenientes de banco de dados de acesso público, cuja informações das participantes não são identificadas, sendo, portanto, resguardada a identidade e a dispensa de aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP).

RESULTADOS

No ano de 2020, foram acompanhadas 4.061 gestantes no Recôncavo da Bahia, Brasil. Das gestantes acompanhadas, apenas 72,56% declararam a raça/cor no momento da consulta; destas, somente uma gestante se declarou indígena, sendo predominante as que se autodeclararam pretas ou pardas (62,34%), conforme revela a **Tabela 1**. O município com maior percentual de gestantes pretas/pardas foi Santo Antônio de Jesus (45,20%), enquanto Muniz Ferreira e Salinas da Margarida, apresentaram os menores percentuais (25%) (**Tabela 1**). A categoria indígena foi agregada à branca para a realização das análises por ter sido representada por apenas uma mulher.

No que se refere aos indicadores socioeconômicos avaliados, o IDHM de todos os municípios situa-se num índice considerado médio, exceto Varzedo e Cabaceiras do Paraguaçu que apresentam IDHM baixo (**Tabela 1**).

O CG, indicador da desigualdade na distribuição da renda dos municípios, revelou que Cabaceiras do Paraguaçu, Dom Macedo Costa e São Felipe apresentam coeficientes menores que 0,5 (**Tabela 1**).

Tabela 1. Características sociodemográficas de gestantes cadastradas no Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional e determinantes sociais dos municípios do Recôncavo da Bahia, Brasil, 2020

Município	Coefficiente de Gini	IDHM	Branca n (%)	Preta/Parda n (%)	Amarela n (%)	Faixa etária/ Adultas n (%)	Faixa etária/ Adolescentes n (%)
Cabaceiras do Paraguaçu	0,406	0,581	5 (4,27)	52 (44,44)	21 (17,94)	91 (77,77)	26 (22,22)
Cachoeira	0,545	0,647	2 (1)	91 (45,72)	34 (17,08)	169 (84,92)	30 (15,07)
Castro Alves	0,550	0,613	2 (1,94)	49 (47,57)	29 (28,15)	93 (90,29)	10 (9,70)
Conceição do Almeida	0,574	0,606	6 (6,81)	36 (43,40)	21 (23,86)	76 (86,36)	12 (13,63)
Cruz das Almas	0,546	0,699	42 (9,39)	194 (43,10)	98 (21,92)	385 (86,36)	62 (16,10)
Dom Macedo Costa	0,460	0,632	3 (4,83)	33 (53,22)	15 (24,19)	60 (96,77)	2 (3,22)
Governador Mangabeira	0,545	0,643	5 (4,54)	58 (52,72)	21 (19,09)	99 (90)	11 (10)
Maragogipe	0,580	0,621	23 (6,14)	141 (37,70)	76 (20,32)	317 (84,75)	57 (15,24)
Muniz Ferreira	0,563	0,617	5 (10,63)	25 (953,19)	6 (12,76)	41 (87)	6 (12,7)
Muritiba	0,563	0,660	10 (4,85)	104 (50,48)	46 (22,33)	167 (81,06)	39 (18,930)
Nazaré	0,611	0,641	14 (6,11)	109 (47,59)	63 (27,51)	189 (82,53)	40 (17,46)
Salinas da Margarida	0,547	0,617	2 (3,57)	25 (44,64)	6 (10,71)	45 (80,35)	11 (19,64)
Santo Amaro	0,570	0,646	4 (1,50)	132 (49,62)	48 (18,04)	230 (86,46)	36 (13,58)
Santo Antônio de Jesus	0,556	0,700	118 (9,3)	571 (45,20)	257 (20,34)	1105 (87,9)	158 (12,50)
São Felipe	0,493	0,616	11 (8,8)	54 (43,2)	27 (21,6)	100 (80)	25 (20)
São Félix	0,505	0,639	4 (5)	35 (43,75)	19 (23,75)	66 (82,5)	14 (17,5)
Sapeaçu	0,591	0,614	6 (7,40)	36 (44,44)	11 (13,58)	68 (83,95)	12 (14,81)
Saubara	0,503	0,617	1 (0,82)	52 (42,97)	30 (24,79)	103 (85,12)	18 (17,47)
Varzedo	0,524	0,586	5 (5,74)	41 (47,12)	13 (14,94)	73 (83,90)	14 (16,09)
Total	–	–	268 (9,0)	1.838 (62,34)	841 (28,52)	3.478 (85,64)	583 (14,35)

Fonte: SISVAN Web, 2020; IBGE Cidades; SEI 2016

Com relação ao estado nutricional, observou-se a prevalência de excesso de peso (sobrepeso e obesidade) em 53,36% das gestantes avaliadas (**Tabela 2**).

Tabela 2. Caracterização do estado nutricional das gestantes por município do Recôncavo da Bahia, Brasil, 2020

Municípios	Eutrofia (%)	Baixo Peso (%)	Sobrepeso (%)	Obesidade (%)	Total
Cabaceiras do Paraguaçu	44 (37,60)	15 (12,82)	36 (30,76)	22 (18,80)	117
Cachoeira	69 (34,67)	31 (15,57)	50 (25,12)	49 (24,62)	199
Castro Alves	25 (24,27)	22 (21,35)	26 (25,24)	30 (29,12)	103
Conceição do Almeida	34 (38,63)	11 (12,5)	26 (29,54)	17 (19,31)	88
Cruz das Almas	141 (31,54)	65 (14,54)	147 (32,88)	94 (21,02)	447
Dom Macedo Costa	21 (33,87)	4 (6,45)	20 (32,25)	17 (27,41)	62
Governador Mangabeira	35 (31,81)	10 (9,09)	36 (32,72)	29 (26,36)	110
Maragogipe	140 (37,43)	76 (20,32)	97 (25,93)	61 (16,31)	374
Muniz Ferreira	18 (38,29)	8 (17,02)	15 (31,91)	6 (12,76)	47
Muritiba	63 (30,58)	37 (17,96)	58 (28,15)	48 (23,30)	206
Nazaré	87 (37,99)	34 (14,84)	66 (28,82)	42 (18,34)	229
Salinas da Margarida	16 (28,57)	7 (12,5)	16 (28,57)	17 (30,35)	56
Santo Amaro	80 (30,45)	38 (14,28)	77 (28,94)	71 (26,69)	266
Santo Antônio de Jesus	415 (32,85)	139 (10,76)	395 (31,27)	314 (24,86)	1263
São Felipe	41 (32,8)	17 (13,6)	34 (27,2)	33 (26,4)	125
São Félix	24 (30)	9 (11,25)	23 (28,75)	24 (30)	80
Sapeaçu	22 (27,16)	12 (14,81)	23 (28,39)	24 (29,62)	81
Saubara	35 (28,92)	11 (9,09)	37 (30,57)	38 (31,40)	121
Varzedo	29 (33,33)	9 (10,34)	27 (31,03)	22 (25,28)	87
Total	1.339 (32,97)	555 (13,66)	1.209 (29,7)	958 (23,59)	4.061

Fonte: SISVAN Web, 2020

Quanto à faixa etária, houve predominância de gestantes adultas (85,64%) (**Tabela 1**). Ao analisar o estado nutricional de ambos os grupos, identificou-se maior prevalência de excesso de peso nas gestantes adultas (56,84%) (**Figura**).

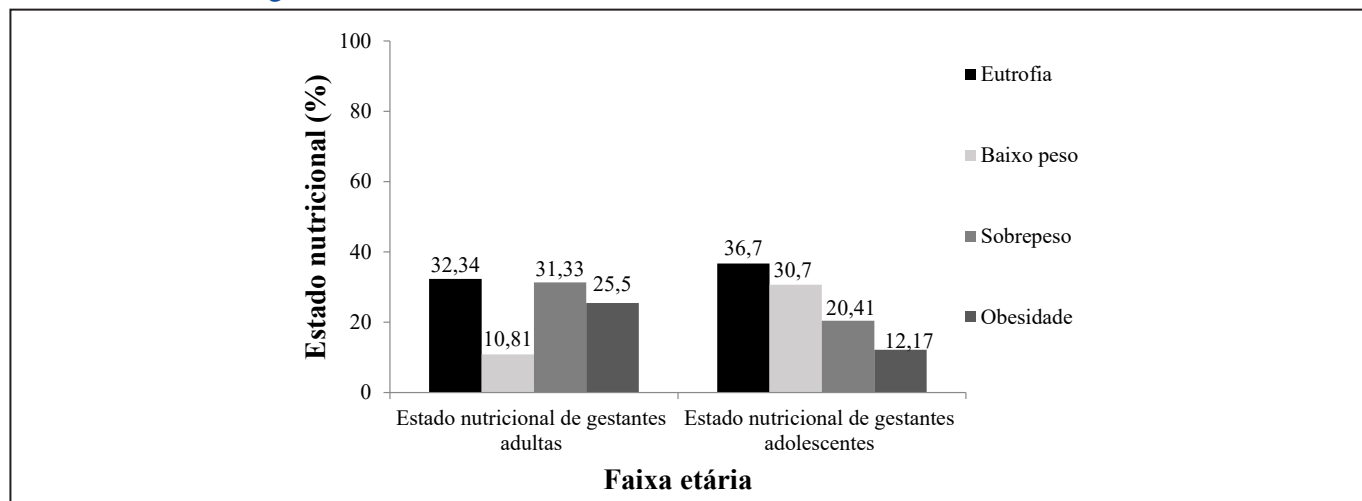


Figura. Caracterização segundo faixa etária e estado nutricional de gestantes do Recôncavo da Bahia, Brasil, 2020

Ao comparar o estado nutricional por município, observou-se que as gestantes de Saubara apresentaram o maior percentual de excesso de peso (61,97%), enquanto as gestantes de Castro Alves apresentaram o maior percentual de baixo peso (21,35%) (**Tabela 2**).

Neste estudo, foi observado que 14,35% das gestantes eram adolescentes, sendo que 30,7% tinham baixo peso. A **Figura** apresenta a caracterização das gestantes, de acordo com a faixa etária e estado nutricional.

Na **Tabela 3** estão dispostas as análises bivariadas entre as variáveis raça/cor, determinantes sociais do município e estado nutricional durante a gestação. Pode-se observar que as variáveis que implicaram em aumento de, aproximadamente, 1 na mediana do número de gestantes com eutrofia foram: raça/cor branca e amarela, CG e IDHM; para a categoria de baixo peso observou-se a relação com cor branca, CG e IDHM; enquanto para a categoria excesso de peso identificou-se relação com cor branca, preta ou/e parda e amarela, CG e IDHM.

Tabela 3. Análise bivariada entre as variáveis raça/cor e determinantes sociais dos municípios e estado nutricional de gestantes do território de identidade Recôncavo da Bahia, Brasil, 2020

Variáveis	n (%)	Coefficiente Quantílico
Eutrofia		
Branca	89 (6,64)	3.362832
Preta/Parda	586 (43,76)	7294776
Amarela	284 (21,20)	1.610169
CG	–	532.0946
IDH	–	1133.333
Baixo peso		
Branca	30 (45,40)	1.133929
Preta/Parda	222 (39,99)	2803738
Amarela	146 (26,30)	5258964
CG	–	211.1486
IDH	–	454.5455
Excesso de peso		
Branca	149 (13,44)	5.8
Preta/Parda	1.030 (95,19)	1.249071
Amarela	411 (37,93)	2.77686
CG	–	515.2027
IDH	–	1640

Fonte: SISVAN Web, 2020; Regressão quantílica bivariada

Na análise multivariada, segundo as categorias do estado nutricional das gestantes, identificou-se que as variáveis CG e raça/cor branca apresentaram associação positiva com o baixo peso gestacional. Assim, observou-se que o aumento em um ponto no CG promoveu aumento mediano no número de casos de baixo peso em gestantes, enquanto a raça/cor branca aumentou medianamente 1 gestante para esta categoria analisada.

Verificou-se associação positiva entre o CG e eutrofia gestacional, contribuindo para o aumento mediano nos números de casos de eutrofia nas gestantes. Com relação à categoria do estado nutricional de excesso de peso, registrou-se associação positiva com a variável raça/cor preta/parda e associação

inversa com CG. Assim, quanto maior o número de mulheres pretas e pardas, há um aumento mediano de 1 gestante com excesso de peso, e a cada aumento em um ponto na escala do CG estimou-se uma redução mediana no número de casos de excesso de peso nas gestantes (**Tabela 4**).

Tabela 4. Associação entre estado nutricional de gestantes segundo critério raça/cor ajustado por variáveis sociais do Recôncavo da Bahia, Brasil, 2020

Variáveis	Coefficiente Quantílico
Baixo peso	
CG	136.7697
Branca	1.089442
Eutrofia	
Branca	0.4222744
Amarela	0.0457343
CG	30.2509
Excesso de peso	
Branca	0.8375144
Amarela	-0.1545006
Preta/parda	1.139043
CG	-24.29093

Fonte: SISVAN Web, 2020; Regressão quantílica multivariada

DISCUSSÃO

Neste estudo, houve predominância de excesso de peso entre gestantes oriundas do Recôncavo da Bahia, acompanhadas pelo SISVAN no ano de 2020, sendo este resultado associado inversamente ao CG e positivamente à raça/cor preta ou parda na população avaliada.

A prevalência elevada de gestantes com sobrepeso e obesidade pode ser explicada, parcialmente, pelo aumento no número de mulheres em idade fértil com excesso de peso antes da gestação²². Em países ocidentais, cerca de 30% das gestantes apresentam obesidade e mais de 40% ultrapassam a faixa de ganho de peso recomendada, de acordo com o *Institute of Medicine* (IOM)²³. No Brasil, a obesidade é encontrada em 25% a 30% das gestações²⁴.

Em uma coorte prospectiva desenvolvida no município de Santo Antônio de Jesus, Bahia, constatou-se a prevalência de excesso de peso no período gestacional em 48,1% das 185 gestantes avaliadas, achado similar ao deste estudo (53,36%); além disso, 33,5% das gestantes apresentaram ganho ponderal inadequado²⁵.

Magalhães et al²⁶, ao avaliarem 328 gestantes no município de Vitória da Conquista, localizado no Sudoeste da Bahia, observaram uma maior prevalência de ganho ponderal semanal excessivo entre as mulheres que iniciaram a gestação com excesso de peso em relação àquelas com baixo peso ou eutrofia, bem como uma maior prevalência entre as gestantes com renda familiar inferior a um salário mínimo, quando comparadas às gestantes com renda igual ou superior a um salário mínimo ($p < 0,05$), destacando o impacto dos fatores socioeconômicos no *status* nutricional²⁶.

Gestantes com excesso de peso apresentam maiores riscos de complicações obstétricas e desfechos perinatais desfavoráveis, como síndromes hipertensivas, diabetes *mellitus* gestacional, macrossomia²³,

impacto no peso ao nascer²⁵, além de maior probabilidade de obesidade infantil, destacando a importância do estado nutricional adequado nesse grupo populacional²³.

Ao comparar o estado nutricional de gestantes adultas e adolescentes neste estudo, identificou-se que a prevalência de excesso de peso foi maior em gestantes adultas (56,84% *versus* 32,58%). Zuccolotto et al²⁷ observaram uma prevalência de excesso de peso em 57% das gestantes adultas avaliadas em Ribeirão Preto, São Paulo.

Na avaliação da prevalência de sobrepeso e obesidade em gestantes por município do Recôncavo da Bahia, observou-se que o município com maior prevalência de excesso de peso foi Saubara (61,97%). É possível que este fato esteja associado ao CG do município (0,503), pois quando acima de 0,5, maior é a desigualdade na distribuição de renda entre os habitantes^{18,21}.

Ademais, diversos fatores podem guardar relação com o excesso de peso durante a gestação, a saber: início tardio do pré-natal, baixa escolaridade, excesso de peso pré-gestacional, situação conjugal, idade materna, maior número de filhos e menor renda^{22,26}. Esses fatores são de grande relevância, porém não foram analisados neste estudo.

Outro fator que pode estar associado ao excesso no ganho de peso corporal de gestantes foi a disseminação global do vírus SARS-CoV-2, declarada como pandemia pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em março de 2020²⁸. Tendo em vista que as gestantes e puérperas até o 14º dia pós-parto passaram a integrar o grupo vulnerável à COVID-19, devido ao risco elevado de morbimortalidade²⁹, como medida de prevenção e controle da doença, muitas gestantes ficaram restritas ao ambiente doméstico³⁰. O isolamento social, na população brasileira em geral, contribuiu para mudanças no padrão alimentar e no nível de atividade física, aumento no tempo de exposição às telas e, conseqüentemente, do peso corporal^{31,32}.

Schall et al³³ realizaram um estudo qualitativo, entre os anos de 2020 e 2021, com 49 mulheres dos estados de Minas Gerais e São Paulo, Brasil, como parte integrante do projeto internacional “*Gender and COVID-19*”, que contempla temas relacionados aos impactos da pandemia na vida de mulheres e suas famílias³³. Dentre as entrevistadas, 81,6% das mulheres se identificaram como negras. Destas, 55,1% referiram ter o acesso aos alimentos prejudicado pela pandemia de COVID-19, devido à redução da renda e elevação dos preços dos alimentos, com conseqüente substituição de alimentos *in natura* e minimamente processados por alimentos ultraprocessados³³.

A insuficiência de recursos financeiros para a aquisição de alimentos nutricionalmente adequados e em quantidade suficiente pode resultar em situação de IAN³⁴. Nesse contexto, a busca por alimentos economicamente acessíveis e capazes de promover a saciedade, que, na maioria das vezes, são ultraprocessados e hipercalóricos, contribui para a etiologia do sobrepeso e da obesidade com aumento do risco do desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT)³⁵.

A IAN configura-se como um problema de saúde pública, pois retrata uma das conseqüências da pobreza e das disparidades sociais¹⁵. No Recôncavo da Bahia, foi observado que 30,0% dos municípios apresentaram IAN leve e 70,0% apresentaram IAN moderada, condição que reflete a precariedade do acesso, quantidade e qualidade de alimentos³⁶.

Dados da Pesquisa de Orçamentos Familiares – POF (2017-2018) evidenciaram que os domicílios com indivíduos autodeclarados pardos possuem maiores taxas de IAN em todos os níveis quando considerado o quesito raça/cor³⁷. Corroborando esses dados, uma revisão sistemática e metanálise revelou elevada ocorrência de IAN em gestantes pretas; em participantes de programas de transferência de renda e entre aquelas que apresentavam baixo nível de escolaridade³⁸.

Em um estudo prospectivo realizado nos municípios de Queimados e Petrópolis, no Rio de Janeiro, com 1.226 gestantes, identificou-se a prevalência do ganho excessivo de peso em 69% e 37% em gestantes pretas/pardas e brancas, respectivamente. Nesse estudo, a hipertensão arterial, o maior nível de escolaridade e o excesso de peso no período pré-gestacional, foram associados ao ganho de peso excessivo durante a gestação³⁹.

No Recôncavo da Bahia, a população é predominantemente negra⁴⁰, grupo que representa a minoria quanto à garantia de direitos, o que favorece os cenários de disparidades sociais¹⁵. Neste contexto, as mulheres negras configuram-se como um grupo socialmente vulnerabilizado, a partir da ótica de raça, gênero e classe, quando comparadas às mulheres brancas. Este grupo apresenta desvantagens no que tange às dimensões mercado de trabalho, distribuição de renda e condições de moradia, educação, violência e representação política, conforme aponta o Relatório das Desigualdades Raciais por Cor ou Raça no Brasil, refletindo condições de vida precárias que impactam a saúde⁴¹.

Além da desigualdade racial de renda, o preconceito e a discriminação são variáveis que afetam os serviços de saúde⁴². O reconhecimento do racismo como um dos fatores centrais na produção das iniquidades em saúde experimentadas por indivíduos negros, de todas as regiões do país, níveis educacionais e de renda, em todas as fases da vida, é fundamental para se enfrentar adequadamente os problemas, por meio de medidas que incluem a criação de programas específicos para esta população e o desenvolvimento de ações capazes de reduzir disparidades entre grupos⁴³.

Nesse contexto, surge a Política Nacional de Saúde Integral da População Negra (PNSIPN) como uma medida compensatória, na tentativa de minimizar os efeitos da discriminação e da exploração sofridas pelas pessoas negras ao longo da história brasileira⁴⁴. A atenção integral à saúde da população negra se justifica pela participação expressiva da população negra no conjunto da população brasileira; por sua presença majoritária entre usuários do SUS; por apresentarem os piores indicadores sociais e de saúde, verificáveis a partir da desagregação de dados segundo quesito raça/cor; pela necessidade de consolidação do compromisso do sistema com a universalidade, integralidade e equidade e pela existência de obrigação amparada em instrumentos legais⁴³.

Neste estudo houve apenas uma gestante que se autodeclarou indígena. De acordo com os dados do Primeiro Inquérito Nacional de Saúde e Nutrição dos Povos Indígenas (2008-2009)⁴⁵, a assistência pré-natal foi ofertada a 3.437 gestantes, com idade entre 14 a 49 anos; contudo, somente cerca de 30% das gestantes iniciaram o pré-natal no 1º trimestre e apenas 16% das gestantes indígenas realizaram sete ou mais consultas de pré-natal. Os percentuais de realização das ações de pré-natal das mulheres indígenas são mais baixos em comparação às mulheres não indígenas. Tais resultados enfatizam a persistência de desigualdades étnico-raciais que comprometem a saúde e o bem-estar destas mulheres⁴⁵.

De modo geral, o estado nutricional da mulher indígena é marcado pelo excesso de peso. Dentre as mulheres avaliadas no Inquérito Nacional de Saúde e Nutrição Indígena, 46% apresentaram sobrepeso ou obesidade; contudo, neste estudo a única gestante indígena encontrava-se eutrófica. Cabe destacar que as mulheres indígenas experimentam a maternidade precocemente e apresentam taxas de fecundidade total elevadas, não raramente ultrapassando oito filhos por mulher⁴⁶.

Os resultados deste estudo revelaram ainda que o excesso de peso e o baixo peso coexistem entre as gestantes adolescentes, com prevalências de 32,58% e 30,7%, respectivamente. A associação do baixo peso gestacional com o CG salienta a relação das desigualdades sociais com a IAN, ao influenciar a disponibilidade e consumo de alimentos, comprometendo o adequado estado nutricional¹⁵. Além disso,

os dados deste estudo confirmam que a gravidez na adolescência é um problema de saúde pública devido às intensas transformações fisiológicas e psicossociais específicas que podem comprometer gravemente o estado nutricional na gestação⁴⁷.

Embora os impactos negativos da gravidez na adolescência estejam bem elucidados na literatura, um estudo ecológico, no qual foram avaliados os dados das gestantes adolescentes beneficiárias do Programa Bolsa Família, extraídos dos relatórios públicos do SISVAN, mostrou que o número de observações anuais de gestantes adolescentes passou de 11.835 para 92.577, revelando um aumento de 682,2%, entre os anos de 2008 e 2018⁴⁸. Esses dados destacam a necessidade de investimentos em estratégias educativas relacionadas à saúde sexual e reprodutiva na adolescência, visando à prevenção da gravidez precoce neste grupo⁴⁸.

Lima et al⁴⁷, em estudo desenvolvido em Caxias, no estado do Maranhão, ao avaliarem a condição de IAN em 185 gestantes adolescentes, verificaram que 84,9% da amostra estudada possuía idade entre 15 e 17 anos; 67,3% das adolescentes apresentaram ensino médio incompleto e nenhuma referiu trabalhar. As características socioeconômicas das gestantes adolescentes encontram-se ligadas à situação de IAN, uma vez que a baixa renda e nível de escolaridade são fatores que favorecem os desvios nutricionais.

Nesta investigação, os indicadores socioeconômicos analisados foram o IDHM e o CG dos municípios do Recôncavo da Bahia. De acordo com o IDHM, todos os municípios situam-se num índice considerado médio (0,600 – 0,699), que reflete os avanços na melhoria da qualidade de vida da população. Os municípios Varzedo e Cabaceiras do Paraguaçu, apresentam um índice considerado baixo (0,500 – 0,599), embora Cabaceiras do Paraguaçu tenha apresentado o menor CG (0,406).

Esses achados confirmam a necessidade de maiores investimentos em saúde e educação da população, uma vez que Varzedo e Cabaceiras do Paraguaçu apresentam elevada prevalência de excesso de peso (56,31% e 48,80%, respectivamente)²⁰. Em contrapartida, o CG do Recôncavo da Bahia (0,569) revela a existência de desigualdade na distribuição de renda entre os habitantes e intensifica o cenário de vulnerabilidade social da região¹⁸.

Nesta pesquisa, as informações referentes ao estado nutricional obtidas por meio de fonte secundária pode ser um fator limitante, devido ao risco de subnotificação dos dados. As subnotificações podem comprometer o desenvolvimento de estratégias preventivas dos agravos em saúde. Desse modo, é de suma importância buscar quais são os fatores que favorecem a não notificação dos dados⁴⁹.

Cabe destacar que, embora a coleta do quesito raça/cor seja fundamental para o mapeamento de doenças, o acesso aos serviços, assim como o aperfeiçoamento da assistência e promoção da equidade em saúde, a autodeclaração de raça/cor depende da percepção das usuárias, bem como da inserção do quesito nos repositórios de informações do SUS, além da qualificação para coleta dos dados pelos profissionais de saúde⁵⁰.

Diante do exposto, pontua-se a necessidade de novos estudos sobre a temática na região do Recôncavo da Bahia, Brasil, que inclua outras variáveis que influenciam o estado nutricional das gestantes.

CONCLUSÃO

Este estudo revelou que o estado nutricional de gestantes do Recôncavo da Bahia é influenciado pela raça/cor preta e/ou parda e pelo CG. Dessa forma, o excesso de peso durante a gestação configura-se como uma condição que necessita de maior atenção durante o pré-natal, devido às possíveis complicações para o binômio mãe-filho.

Os resultados deste estudo podem contribuir para o planejamento de programas e/ou projetos que incluam ações de alimentação e nutrição e visam o acompanhamento nutricional de gestantes, além da prevenção de intercorrências na gestação, principalmente nos grupos socialmente vulnerabilizados.

Portanto, as ações integradas dos diferentes setores, são de grande relevância para promoção e fortalecimento de políticas públicas, que assegurem maior acesso desta população à educação, saúde e alimentação adequada e saudável.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não existir conflitos de interesse.

FINANCIAMENTO

Não declarado pelos autores.

AGRADECIMENTO

Não declarado pelos autores.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Larissa Ferreira de Oliveira: coleta de dados, revisão da literatura e redação do artigo. Jerusa da Mota Santana: análises estatísticas e interpretação dos dados. Clotilde Assis Oliveira: revisão de texto. Renata de Oliveira Campos: coordenação do estudo, interpretação dos dados e revisão de texto.

NOTA DE APRESENTAÇÃO

Os resultados deste artigo integram o trabalho de conclusão de curso, intitulada “Associação entre estado nutricional, indicadores socioeconômicos e critério raça/cor em gestantes do Recôncavo da Bahia”, defendido no ano de 2021.

REFERÊNCIAS

1. Institute of Medicine (US). National Research Council (US) Committee to Reexamine IOM Pregnancy Weight Guidelines. Weight gain during pregnancy: Reexamining the guidelines. Rasmussen KM, Yaktine AL, editors. Washington (DC): National Academies Press (US); 2009. PMID: 20669500.
<https://doi.org/10.17226/12584>
2. LifeCycle Project-Maternal Obesity and Childhood Outcomes Study Group. Association of gestational weight gain with adverse maternal and infant outcomes. JAMA. 2019;321(17):1702-15.
<https://doi.org/10.1001/jama.2019.3820>
3. Alves ICR, Souza TF, Leite MTS, Pinho L. Limites e possibilidades do Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional na Atenção Primária à Saúde: relatos de profissionais de enfermagem. Demetra: Alimentação, Nutrição & Saúde. 2018;13(1):69-81.
<https://doi.org/10.12957/demetra.2018.31077>

4. Lisboa CS, Bittencourt LJ, Santana JM, Santos DB. Assistência nutricional no pré-natal de mulheres atendidas em unidades de saúde da família de um município do Recôncavo da Bahia: um estudo de coorte. *Demetra: Alimentação, Nutrição & Saúde*. 2017;12(3):713-31.
<https://doi.org/10.12957/demetra.2017.28439>
5. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Marco de referência da vigilância alimentar e nutricional na atenção básica. Brasília (DF); 2015. [acesso 2021 Mai 15]. Disponível em:
https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/marco_referencia_vigilancia_alimentar.pdf
6. Santos LAV, Lara MO, Lima RCR, Rocha AF, Rocha MR, Gloria JCR et al. História gestacional e características da assistência pré-natal de puérperas adolescentes e adultas em uma maternidade do interior de Minas Gerais, Brasil. *Ciênc Saúde Colet*. 2018;23(2):617-25.
<https://doi.org/10.1590/1413-81232018232.10962016>
7. Gomes CB, Vasconcelos LG, Cintra RMGC, Dias LCGD, Carvalhaes MABL. Hábitos alimentares das gestantes brasileiras: revisão integrativa da literatura. *Ciênc Saúde Colet*. 2019;24(6):2293-306.
<https://doi.org/10.1590/1413-81232018246.14702017>
8. Lucindo ALMMM, Souza GS. A nutrição materna como ponto chave na prevenção de doenças e no desenvolvimento fetal. *BJHR*. 2021;4(2):5489-97.
<https://doi.org/10.34119/bjhrv4n2-119>
9. Silva Júnior AE, Macena ML, Vasconcelos LGL, Almeida NB, Praxedes DRS, Pureza IROM et al. Tendência do estado nutricional de gestantes adolescentes beneficiárias do programa de transferência condicionada de renda brasileiro Bolsa Família no período 2008-2018. *Ciênc Saúde Colet*. 2021;26(7):2613-24.
<https://doi.org/10.1590/1413-81232021267.08172021>
10. Farias DR, Carrilho TRB, Freitas-Costa NC, Batalha MA, Gonzalez M, Kac G. Maternal mental health and gestational weight gain in a Brazilian Cohort. *Sci Rep*. 2021;11:10787.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-90179-6>
11. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Política Nacional de Alimentação e Nutrição. Brasília (DF); 2013. [acesso 2021 Mai 26]. Disponível em:
https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_alimentacao_nutricao.pdf
12. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Orientações para a coleta e análise de dados antropométricos em serviços de saúde: Norma Técnica do Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional – SISVAN. [acesso 2021 Mai 15]. Brasília (DF); 2011. Disponível em:
https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/orientacoes_coleta_analise_dados_antropometricos.pdf

13. Batista MAL. Desigualdades assistenciais sob o enfoque étnico-racial e suas repercussões à saúde da mulher. *BJHR*. 2021;4(2):4922-36.
<https://doi.org/10.34119/bjhrv4n2-075>
14. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Coordenação de Trabalho e Rendimento. Pesquisa nacional por amostra de domicílios: síntese de indicadores 2013. [acesso 2021 Out 21]. Rio de Janeiro: IBGE 2015. Disponível em:
<https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv94414.pdf>
15. Fernandes RC, Manera F, Boing L, Hofelmann DA. Desigualdades socioeconômicas, demográficas e obstétricas na insegurança alimentar em gestantes. *Rev Bras Saúde Mater Infant*. 2018;18(4):815-24.
<https://doi.org/10.1590/1806-93042018000400008>
16. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Manual operacional para uso do sistema de vigilância alimentar e nutricional. Brasília (DF); 2017. [acesso 2021 Out 21]. Disponível em:
<http://sisaps.saude.gov.br/sisvan/public/file/ManualDoSisvan.pdf>
17. Mourão E, Gallo CO, Nascimento FA, Jaime PC. Tendência temporal da cobertura do Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional entre crianças menores de 5 anos da região Norte do Brasil, 2008-2017. *Epidemiol Serv Saúde*. 2020;29(2):e2019377.
<https://doi.org/10.5123/S1679-49742020000200026>
18. Governo do Estado da Bahia (BA). Superintendência de Estudos Econômicos e Sociais da Bahia. Perfil dos Territórios de Identidade da Bahia. 2016; 2. [acesso 2021 Jul 13]. Disponível em:
https://sei.ba.gov.br/images/publicacoes/download/perfil_dos_territorios/territorio_identidade_vol02.pdf
19. Ministério da Saúde (BR). Guia de implementação do quesito raça/cor/etnia. Brasília (DF); 2018. [acesso 2021 Jul 13]. Disponível em:
https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_implementacao_raca_cor_etnia.pdf
20. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada – IPEA. Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento (PNUD). Índice de Desenvolvimento Humano Municipal Brasileiro. Brasília (DF); 2013. [acesso 2021 Jul 13]. Disponível em:
https://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/2375/1/Livro_O%20%C3%8Dndice%20de%20Desenvolvimento%20Humano%20Municipal%20Brasileiro.pdf
21. Helene O, Mariano L. Educação e desigualdade na distribuição de rendas. *Cad Educ Soc*. 2021;41:e223485.
<https://doi.org/10.1590/ES.223485>

22. Manera F, Hofelmann DA. Excesso de peso em gestantes acompanhadas em unidades de saúde de Colombo, Paraná, Brasil. *Demetra: Alimentação, Nutrição & Saúde*. 2019;14:e36842.
<https://doi.org/10.12957/demetra.2019.36842>
23. Ferreira LAP, Piccinato CA, Cordioli E, Zlotnik E. Índice de massa corporal pré-gestacional, ganho de peso na gestação e resultado perinatal: estudo descritivo retrospectivo. *Einstein*. 2020;18:eAO4851.
https://doi.org/10.31744/einstein_journal/2020AO4851
24. Schiavetto PCF, Tavares, BB. Índice de massa corporal de gestantes atendidas na unidade de saúde da família. *Enferm glob*. 2018;17(52):137-165. [acesso 2021 Jul 13]. Disponível em:
https://scielo.isciii.es/pdf/eg/v17n52/pt_1695-6141-eg-17-52-137.pdf
25. Santana JM, Assis AMO, Alves WPO, Santos DB. Association between gestational weight gain and birth weight: NISAMI Cohort. *Rev Bras Saúde Mater Infant*. 2020;20(2):411-20.
<https://doi.org/10.1590/1806-93042020000200005>
26. Magalhães EIS, Maia DS, Bonfim CFA, Netto MP, Lamounier JA, Rocha DS. Prevalência e fatores associados ao ganho de peso gestacional excessivo em unidades de saúde do sudoeste da Bahia. *Rev Bras Epidemiol*. 2015;18(4):858-69.
<https://doi.org/10.1590/1980-5497201500040014>
27. Zuccolotto DCC, Crivellenti LC, Franco LJ, Sarotelli DS. Padrões alimentares de gestantes, excesso de peso materno e diabetes gestacional. *Rev Saúde Pública* 2019;53:52.
<https://doi.org/10.11606/S1518-8787.2019053000909>
28. Dashraath P, Wong JLJ, Lim MXK, Lim LM, Li S, Biswas A et al. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic and pregnancy. *AJOG*. 2020;222(6):521-31.
<https://doi.org/10.1016/j.ajog.2020.03.021>
29. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Atenção Primária à Saúde. Departamento de Ações Programáticas e Estratégicas. Manual de recomendações para a assistência à gestante e puérpera frente à pandemia de Covid-19. 2ª edição. Brasília, DF; 2021. [acesso 2023 Mai 23]. Disponível em:
https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_assistencia_gestante_puerpera_covid-19_2ed.pdf
30. Almeida MO, Portugal TM, Assis TJCF. Pregnant women and COVID-19: isolation as a physical and psychic impact factor. *Rev Bras Saúde Mater Infant*. 2020;20(2):599-602.
<https://doi.org/10.1590/1806-93042020000200015>
31. Costa CS, Steele EM, Leite MA, Rauber F, Levy RB, Monteiro CA. Body weight changes in the NutriNet Brasil cohort during the covid-19 pandemic. *Rev Saúde Pública*. 2021;55:1.
<https://doi.org/10.11606/s1518-8787.2021055003457>

32. Sandes MF, Guedes TR, Meneses KCB. Avaliação do uso de telas digitais por crianças e adolescentes em tempos de pandemia. *Braz J Develop*. 2022;8(9):64081-113.
<https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/52476>
33. Schall B, Gonçalves FR, Valente PA, Rocha M, Chaves BS, Porto P et al. Gênero e insegurança alimentar na pandemia de COVID-19 no Brasil: a fome na voz das mulheres. *Ciênc Saúde Colet*. 2022;27(11):4145-54.
<https://doi.org/10.1590/1413-812320222711.07502022>
34. Trivellato PT, Morais DC, Lopes SO, Miguel ES, Franceschiniet SCC, Priore SE. Insegurança alimentar e nutricional em famílias do meio rural brasileiro: revisão sistemática. *Ciênc Saúde Colet*. 2019;24(3):865-874, 2019.
<https://doi.org/10.1590/1413-81232018243.05352017>
35. Bezerra MS, Jacob MCM, Ferreira MAF, Vale D, Mirabal IRB, Lyra CO. Insegurança alimentar e nutricional no Brasil e sua correlação com indicadores de vulnerabilidade. *Ciênc Saúde Colet*. 2020;25(10):3833-46.
<https://doi.org/10.1590/1413-812320202510.35882018>
36. Grupo Governamental de Segurança Alimentar e Nutricional 2 GGSAN. Diagnóstico da segurança alimentar e nutricional do Estado da Bahia. 2015. [acesso 2021 Jul 31]. Disponível em:
<http://www.casacivil.ba.gov.br/arquivos/File/GGSanDiagnosticodaSegurancaAlimentareNutricionaldoEstadodaBahia2015.pdf>
37. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Coordenação de Trabalho e Rendimento. Pesquisa de orçamentos familiares 2017-2018: análise da segurança alimentar no Brasil. [acesso 2021 Jul 31]. Rio de Janeiro: IBGE 2020. Disponível em:
<https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/bibliotecacatalogo?view=detalhes&id=2101749>
38. Demétrio F, Teles CAS, Santos DB, Pereira M. Food insecurity in pregnant women is associated with social determinants and nutritional outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Ciênc Saúde Colet*. 2020;25(7):2663-76.
<https://doi.org/10.1590/1413-81232020257.24202018>
39. Araujo DMR. Fatores associados ao estado nutricional gestacional e desfechos perinatais em usuárias do Sistema Único de Saúde (SUS), em dois municípios do estado do Rio de Janeiro (RJ) [tese de doutorado]. Rio de Janeiro (RJ): Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca; 2012. 147 p. Disponível em:
<https://bvssp.icict.fiocruz.br/lildbi/docsonline/get.php?id=3285>

40. Cotrim IA, Silva LJ, Souza R. Cenários da saúde da população negra no Brasil. *Cad Saúde Pública*. 2017;33(10):e00143517.
<https://doi.org/10.1590/0102-311X00143517>
41. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. *Desigualdades sociais por cor ou raça no Brasil*. 2 ed. 2022. Rio de Janeiro. [acesso 2023 Mai 23]. Disponível em:
https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv101972_notas_tecnicas.pdf
42. Iriart JAB, Castellanos MEP. Preconceito, discriminação e exclusão em saúde. *Ciênc Saúde Colet*. 2023;28(1):e237.
<https://doi.org/10.1590/1413-81232023281.16802022>
43. Werneck J. Racismo institucional e saúde da população negra. *Saúde Soc*. 2016;25(3):535-49.
<https://doi.org/10.1590/S0104-129020162610>
44. Chehuen Neto JA, Fonseca GM, Brum IV, Santos JLCT, Rodrigues TCGF, Paulino KR et al. Política Nacional de Saúde Integral da População Negra: implementação, conhecimento e aspectos socioeconômicos sob a perspectiva desse segmento populacional. *Ciênc Saúde Colet*. 2015;20(6):1909-16.
<https://doi.org/10.1590/1413-81232015206.17212014>
45. Cardoso AM, Horta BL, Coimbra CEA, Follér ML, Souza MC, Santos RV. (Coords.). *Inquérito Nacional de Saúde e Nutrição dos Povos Indígenas. Relatório final (Análise de dados) nº 7*. Rio de Janeiro: FUNASA, 2009. [acesso 2023 Mai 23]. Disponível em:
<https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/handle/icict/56846/Inquerito-Nacional-de-Saude-e-Nutricao-dos-povosIndigenas2009.pdf?sequence=2&isAllowed=y>
46. Coimbra CEA. Saúde e povos indígenas no Brasil: reflexões a partir do I Inquérito Nacional de Saúde e Nutrição Indígena. *Cad Saúde Pública*. 2014;30(4):855-9.
<https://doi.org/10.1590/0102-311X00031214>
47. Lima ACS, Assunção, MJSM. Insegurança alimentar em gestantes adolescentes atendidas na atenção primária da rede pública de saúde. *Res Soc Dev*. 2020;9(11):1-14. [acesso 2021 Jul 30]. Disponível em:
<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/download/10364/9355/143020>
48. Silva AE, Macena ML, Vasconcelos LGL, Almeida NB, Praxedes DRS, Pureza IROM et al. Tendência do estado nutricional de gestantes adolescentes beneficiárias do programa de transferência condicionada de renda brasileiro Bolsa Família no período 2008-2018. *Ciênc Saúde Colet*. 2021;26(7):2613-24.
<https://doi.org/10.1590/1413-81232021267.08172021>

49. Melo MAS, Coleta MFD, Coleta JAD, Bezerra JCB, Castro AM, Melo ALS et al. Percepção dos profissionais de saúde sobre os fatores associados à subnotificação no Sistema Nacional de Agravos de Notificação. Rev Adm Saúde. 2018;18(71).

<http://dx.doi.org/10.23973/ras.71.104>

50. Alves MC, Jesus JP, Diaz LAF. Autodeclaração da raça/cor no SUS: reflexões conceituais a partir da campanha realizada pelo estado do Rio Grande do Sul. Identidade! 2017;22(1):5-15. Disponível em:

https://revistas.est.edu.br/periodicos_novo/index.php/Identidade/article/view/1335



Caracterização morfológica e morfométrica de estágios larvares de *Strongyloides* spp., ancilostomídeos e *Angiostrongylus* spp.: subsídios para identificação em amostras ambientais

Morphological and morphometric characterization of larval stages of *Strongyloides* spp., hookworms and *Angiostrongylus* spp.: subsidies for identification in environmental samples

Lais Fernanda de Pauli-Yamada^{1*} , Pedro Luiz Silva Pinto² 

¹ Núcleo de Morfologia e Microscopia, Centro de Alimentos, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil.

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

*Autor de correspondência/Corresponding author: lais.yamada@ial.sp.gov.br

Recebido/Received: 10.02.2023 – Aceito/Accepted: 10.05.2023

RESUMO

A identificação precisa de nematódeos de interesse médico-veterinário em amostras de solo ou alimentos é uma ação complexa, devido à grande diversidade de nematódeos no ambiente. O objetivo do estudo foi realizar a caracterização morfológica e morfométrica de diferentes estágios larvários de ancilostomídeos, *Strongyloides stercoralis*, *Strongyloides venezuelensis*, *Angiostrongylus cantonensis* e *Angiostrongylus costaricensis*, e desenvolver um estudo de similaridade entre espécies do mesmo gênero, a fim de orientar o diagnóstico diferencial com os nematódeos ambientais. As larvas foram fixadas e diversos parâmetros corporais foram mensurados, para os quais foi realizada estatística descritiva e estudo de similaridade. Os resultados médios das larvas padrões foram compatíveis com os descritos para as espécies, com variabilidade em alguns parâmetros. *S. stercoralis* e *S. venezuelensis* demonstraram similaridade de 59% para L1 e 79% para L3, com maior diferenciação entre os grupos em relação à extremidade anterior e ao primórdio genital. No *pool* de larvas de ancilostomídeos, verificou-se uma grande variação nos parâmetros avaliados, especialmente quanto ao comprimento total do corpo. *A. cantonensis* e *A. costaricensis* apresentaram 48% de similaridade entre L1 e 76% para L3. Por meio da análise morfométrica e de similaridade verificou-se a possibilidade do aprimoramento do diagnóstico diferencial de nematódeos de origem ambiental.

Palavras-chave. Larva Nematódeos, Helmintos, Achados Morfológicos e Microscópicos.

ABSTRACT

Due to the enormous diversity of nematodes in the environment, identifying nematodes of medical and veterinary significance within soil or food samples can be challenging. To facilitate the differential diagnosis with environmental nematodes, this study aimed morphologically and morphometrically characterize various larval stages of hookworms, *Strongyloides stercoralis*, *Strongyloides venezuelensis*, *Angiostrongylus cantonensi* and *Angiostrongylus costaricensis*. Additionally, a similarity study was conducted among species within the same genus. The larvae were fixated and several body parameters were measured for the analysis, which included a comparison using descriptive statistics. Despite some parameter fluctuation, the average results for standard larvae were consistent with those of the respective species as a whole. The similarity between *S. stercoralis* and *S. venezuelensis* was 59% for L1 and 79% for L3, with more pronounced differences observed in the anterior extremity and the genital primordium. The examined parameters exhibited significant variation among the pool of hookworm larvae, particularly concerning the total length of the body. The similarities between *A. cantonensis* and *A. costaricensis* larvae ranged from 48% for L1 to 76% for L3. Analyses of morphometric and similarity data provided support for the potential improvement of differentiation between nematodes with environmental origins. This research contributes to enhancing the accuracy of identifying medically and veterinary relevant nematodes present in soil.

Keywords. Larvae, Nematodes, Helminths, Morphological and Microscopic Findings.

INTRODUÇÃO

Os nematódeos (Filo Nematoda) constituem um grupo altamente diverso, abundante e especializado de vermes cilíndricos e não segmentados, que vivem em ambientes variados incluindo o solo, desde que haja umidade suficiente para sua sobrevivência^{1,2}. A diversidade deste grupo está presente não somente na sua morfologia, como também em relação aos ciclos de vida, formas de reprodução, além da complexa ecologia^{3,4}.

Há mais de 23.000 espécies descritas, sendo a maioria de vida livre, porém há espécies parasitas de plantas (fitoparasitas), que causam prejuízos econômicos e uma ameaça à segurança alimentar em diversos países, além das espécies parasitas de animais vertebrados e invertebrados (zooparasitas) que determinam um forte impacto à saúde pública^{2,3,5,6}.

Dentre os nematódeos de importância médica ou veterinária, algumas espécies estão associadas à contaminação de alimentos, solo e água por apresentarem alguma fase de seu ciclo de vida no solo, geralmente entre as mudanças de fases larvárias e transferência de hospedeiros^{7,8}. Embora, nesse grupo, haja outros mecanismos de transmissão ambiental, há relatos da contaminação de vegetais frescos por larvas de *Strongyloides* spp. e ancilostomídeos⁹⁻¹³, além de evidências da transmissão de *Angiostrongylus* spp. associadas ao consumo de saladas na Jamaica^{14,15}.

A precisa identificação e diferenciação entre os nematódeos de amostras ambientais, como solo ou alimentos, é uma ação complexa, devido à grande diversidade de espécimes presentes e, em diferentes estágios evolutivos. Portanto, o diagnóstico diferencial de larvas de nematódeos de interesse médico-veterinário constitui uma importante abordagem metodológica na prevenção e controle das doenças parasitárias⁶.

O objetivo deste estudo foi realizar a caracterização morfológica e morfométrica de espécies mantidas em modelos experimentais ou isoladas de amostras clínicas, entre elas *Strongyloides stercoralis*, *Strongyloides venezuelensis*, ancilostomídeos, *Angiostrongylus cantonensis* e *Angiostrongylus costaricensis*, utilizadas como padrões morfológicos, e desenvolver um estudo de similaridade fenotípica entre espécies do mesmo gênero, a fim de orientar o diagnóstico diferencial com nematódeos isolados de amostras ambientais.

MATERIAL E MÉTODOS

As larvas padrões de *A. cantonensis* e *A. costaricensis* utilizadas para o estudo foram obtidas de ciclo experimental mantido no Núcleo de Enteroparasitas do Instituto Adolfo Lutz. As larvas padrões de *S. venezuelensis* foram cedidas pelo do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, obtidas também de ciclo experimental. As larvas de *S. stercoralis* originam-se da coleção de espécimes isolados e preservados pelo Núcleo de Enteroparasitas do Instituto Adolfo Lutz. As larvas de ancilostomídeos foram obtidas a partir do cultivo, pelo método de Harada e Mori¹⁶, de ovos encontrados em fezes de cães infectados, cedidas pelo Laboratório de Zoonoses e Doenças Transmitidas por Vetores do Centro de Controle de Zoonoses da cidade de São Paulo.

Todos os estágios larvários foram fixados a quente (56 °C) em AFA (álcool, formol e ácido acético) ou álcool 70%, e conservados em álcool 70% até a montagem de lâminas para a realização do estudo

morfométrico. As lâminas contendo os nematódeos foram montadas em solução alcóolica a 70%, cobertas com lamínula e vedadas utilizando esmalte a fim de evitar a evaporação do conteúdo por cerca de 48 horas, tempo suficiente para conservação do material até a finalização do estudo.

As análises morfológica e morfométrica dos espécimes foram realizadas em microscópio óptico de campo claro modelo Zeiss®, em aumento de 100 a 400 X, utilizando o programa Axio Vision LE®, para captura das imagens e aferição das medidas. Foram considerados os aspectos morfológicos relacionados à extremidade cefálica (vestíbulo bucal), tipo de esôfago, presença ou ausência de poro excretor e de primórdio genital, extremidade caudal e cutícula. Quanto aos parâmetros morfométricos (**Figura 1**), foram considerados para todos os gêneros: comprimento total do corpo (CTC); comprimento do esôfago (CE); largura do corpo, medida na altura da junção esôfago intestino (LC); distância do poro excretor a extremidade anterior (DPE); distância do ânus a cauda (DAC); distância do primórdio genital a cauda (DPGC), com algumas variações de parâmetros conforme o estágio larval ou a espécie analisada. Especificamente para o gênero *Strongyloides* e para os ancilostomídeos, foram adicionados os parâmetros: comprimento do vestíbulo bucal (CVB), largura da extremidade anterior (LEA), comprimento do primórdio genital (CPG) e largura do primórdio genital (LPG).



Figura 1. Medidas morfométricas demonstradas em larvas de terceiro estágio de *Angiostrongylus cantonensis* (A-F) e em larvas de primeiro estágio de *Strongyloides stercoralis* (G-I): (A) comprimento total do corpo (CTC); (B) comprimento do esôfago (CE); (C) distância do poro excretor a extremidade anterior (DPE); (D) largura do corpo (LC); (E) distância do primórdio genital a cauda (DPGC); (F) distância do ânus a cauda (DAC); (G) comprimento do vestíbulo bucal (CVB), largura da extremidade anterior (LEA); (H) comprimento do primórdio genital e (I) largura do primórdio genital. Escala = 50 μm

As medidas, obtidas em micrometros, foram tabuladas em programa Microsoft Excel® para cálculo de médias, medianas, desvio padrão, coeficiente de variação, relação entre largura do corpo e comprimento total do corpo (LC/CTC), relação entre comprimento do esôfago e comprimento total do corpo (CE/CTC), relação entre o comprimento do vestíbulo bucal e a largura da extremidade anterior (CVB/LEA) e relação entre comprimento do primórdio genital e largura do primórdio genital (CPG/LPG).

O estudo de similaridade fenotípica realizado foi baseado nos trabalhos de Rocco¹⁷ e Mota¹⁸, e consistiu em uma análise multivariada entre grupos de larvas de espécies diferentes com características morfológicas comuns. As medidas registradas para cada parâmetro morfométrico foram comparadas entre as espécies, considerando o intervalo de valores máximos e mínimos dos mesmos parâmetros da espécie padrão, e transformados em uma matriz binária com atribuição de valores 0 ou 1. Desta forma, adotou-se como escore 1 a medida que se encontrou dentro do intervalo de valores máximos e mínimos, e escore 0 a medida que estava fora deste intervalo. A somatória destes valores, ou seja, o número de parâmetros coincidentes em relação ao padrão foi dividido pelo número total de parâmetros avaliados (n) e convertida em percentual de similaridade, segundo Yamada¹⁹, considerando uma escala de 0 a 100%.

Para o gênero *Strongyloides*, os dados morfométricos da espécie *S. stercoralis* foram comparados com os dados de *S. venezuelensis*, de forma separada para o estágio rabditoide e o estágio filarioide. No gênero *Angiostrongylus*, os dados da espécie *A. cantonensis* foram comparados com os dados de *A. costaricensis*, para cada estágio larvar (L1 e L3). Não foi realizado estudo de similaridade entre os ancilostomídeos por não serem originados de cepas padrões.

RESULTADOS

Caracterização morfológica e morfométrica de larvas de *S. stercoralis* e *S. venezuelensis*

As larvas rabditoides e filarioides de *S. stercoralis* e *S. venezuelensis* examinadas apresentaram características morfológicas semelhantes como demonstrado na **Figura 2**. Especificamente para *S. venezuelensis*, as larvas rabditoides de primeiro (L1) e segundo (L2) estágios se mostraram morfológicamente análogas, porém as L2 apresentaram um alongamento de todo o corpo. As larvas rabditoides (L1) de *S. stercoralis* apresentaram valores aproximados de média e mediana, com desvio padrão inferior a 10% para todos os parâmetros avaliados, indicando pouca variabilidade morfométrica entre os exemplares analisados para esse estudo. Foi observada pouca variação entre os valores médios nos parâmetros morfométricos das larvas rabditoides L1 e L2 de *S. venezuelensis*, com exceção da DPGC, cujo desvio padrão foi discretamente superior a 10%, em ambos os grupos. Como esperado, as larvas rabditoides L2 apresentaram-se maiores em todas as dimensões, em relação às larvas rabditoides L1, e as relações LC/CTC e CE/CTC foram inferiores, devido ao aumento expressivo do comprimento médio das larvas L2. Os dados morfométricos das larvas rabditoides e filarioides do gênero *Strongyloides* estão apresentados na **Tabela 1**.

A comparação morfométrica entre *S. stercoralis* e *S. venezuelensis* demonstrou similaridade de 59% para larvas rabditoides (L1) e de 79% para larvas filarioides (L3). Os parâmetros relacionados à extremidade anterior (CVB e LEA) e ao primórdio genital (CPG e LPG) foram os que apresentaram maior diferenciação entre os grupos.

Caracterização morfológica e morfométrica de larvas de ancilostomídeos

As características morfológicas das larvas rabditoídes e filarióides de ancilostomídeos estão apresentadas na **Figura 2**, comparativamente com as larvas de *Strongyloides*. Em virtude de ter sido analisado um *pool* de larvas de ancilostomídeos, de diferentes origens, verificou-se uma grande variação entre valores máximos e mínimos na maioria dos parâmetros avaliados, especialmente em relação ao CTC, indicando pouca uniformidade entre os espécimes. Porém, com exceção do CTC, os valores medianos de ambos se mantiveram aproximados e o desvio padrão se apresentou em torno de 10% para a maioria dos parâmetros. Para as larvas filarióides foram incluídos os valores de comprimento e largura da muda. Os dados morfométricos das larvas de ancilostomídeos estão apresentados na **Tabela 1**.

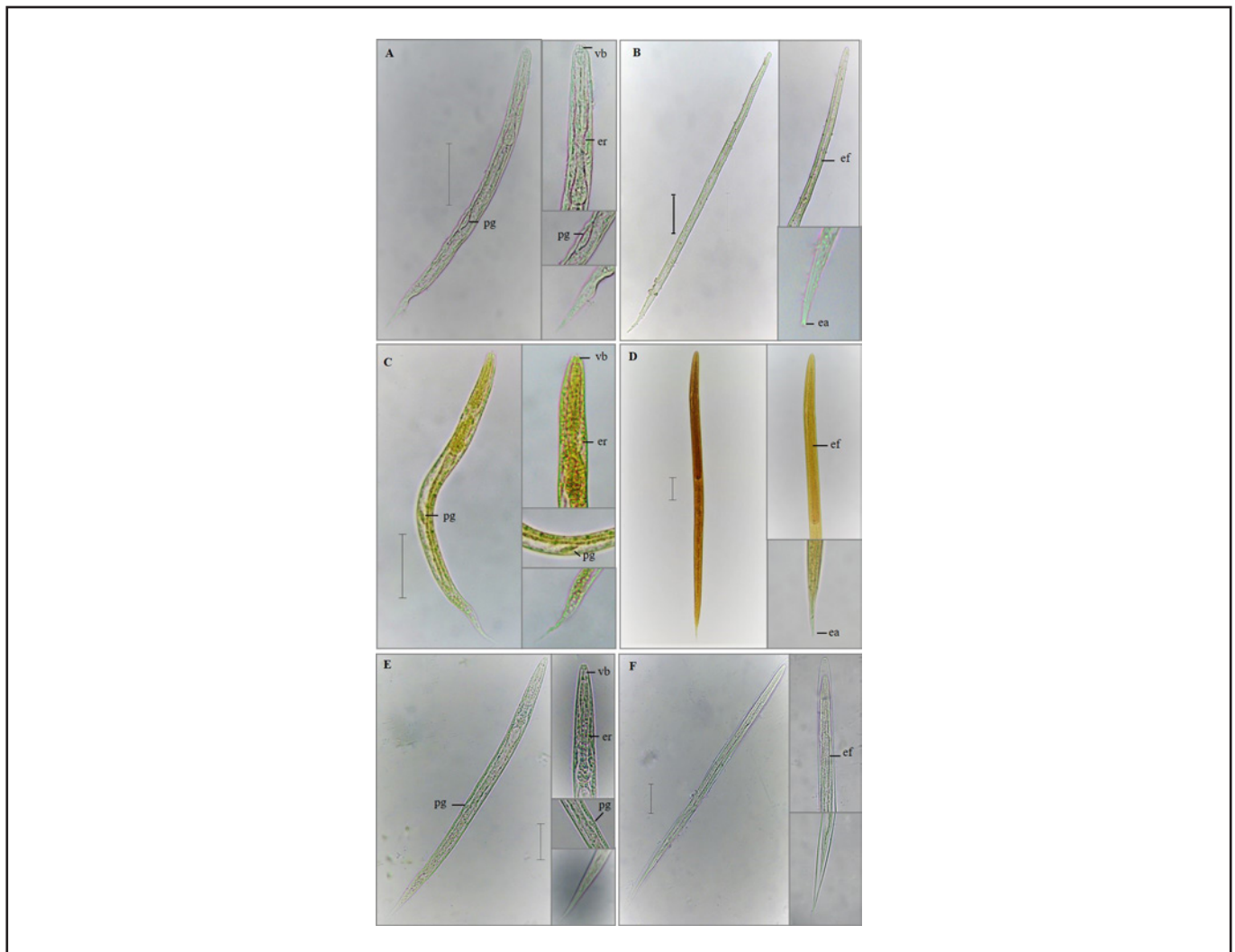


Figura 2. Larvas rabditoídes e filarióides de *S. stercoralis* (A) e (B), *S. venezuelensis* (C) e (D) e ancilostomídeo (E) e (F), demonstrando detalhes da extremidade anterior com vestíbulo bucal (vb), esôfago do tipo rabditoíde (er), composto de corpo (c), istmo (i) e bulbo (b), esôfago do tipo filarióide (ef); primórdio genital (pg) e extremidade posterior, indicando o entalhe apical (ea). Escala = 50 μ m

Tabela 1. Dados morfológicos e morfométricos (μm) de larvas rabditoides e filarioides de *S.stercoralis*, *S. venezuelensis* e ancilostomídeos

	<i>Strongyloides stercoralis</i>		<i>Strongyloides venezuelensis</i>			Ancilostomídeos	
	L1	L3	L1	L2	L3	L1	L3
Extremidade anterior	arredondada	arredondada	arredondada	arredondada	arredondada	arredondada	arredondada
Vestíbulo bucal	curto	ausente	curto	curto	ausente	longo	ausente
Tipo de esôfago	rhabditiforme	filariforme	rhabditiforme	rhabditiforme	filariforme	rhabditiforme	filariforme
Cutícula	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	finas estrias	finas estrias
Extremidade posterior	reta, afilada	reta, afilada	reta, afilada	reta, afilada	reta, afilada	longa, afilada	afilada, com bainha
Terminação da cauda	pontiaguda	com entalhe apical	pontiaguda	pontiaguda	com entalhe apical	pontiaguda	pontiaguda
Primórdio genital	alongado, oval, visível	pouco evidente	alongado, oval, visível	alongado, oval, pouco evidente	não evidente	pequeno, oval, pouco evidente	pouco evidente
CTC	236,77 – 299,92	425,68 – 483,73	201,22 – 265,67	442,49 – 576,91	433,21 – 547,78	328,00 – 695,78	480,76 – 685,59
CE	70,91 – 86,07	123,83 – 211,09	68,08 – 86,14	90,01 – 120,48	160,87 – 196,69	80,24 – 147,43	103,69 – 167,85
LC	13,61 – 17,01	11,01 – 14,24	10,99 – 15,88	16,78 – 23,77	12,95 – 19,26	16,03 – 29,89	11,02 – 28,64
DAC	37,65 – 47,84	44,07 – 64,05	29,20 – 37,84	55,10 – 77,35	40,89 – 66,67	65,95 – 105,47	55,83 – 92,78
DPGC	88,96 – 123,17	148,35 – 204,84	87,46 – 117,98	172,04 – 264,54	–	253,05 – 283,02	224,29 – 267,99
CVB	2,73 – 4,98	–	2,95 – 6,07	3,41 – 6,30	–	10,18 – 18,06	–
LEA	7,36 – 9,57	6,02 9,12	5,87 – 8,04	6,20 – 8,66	5,25 – 7,08	9,02 – 15,87	6,50 – 17,18
CPG	11,84 – 20,73	–	2,12 – 3,49	11,85 – 24,29	–	8,82 – 11,03	–
LPG	3,55 – 6,07	–	2,55 – 5,19	2,12 – 8,12	–	2,68 – 3,62	–

CTC – comprimento total do corpo; CE – comprimento do esôfago; LC – largura do corpo; DAC – distância do ânus a cauda; DPGC – distância do primórdio genital a cauda; CVB – comprimento do vestibulo bucal; LEA – largura da extremidade anterior; CPG – comprimento do primórdio genital e LPG – largura do primórdio genital

Caracterização morfológica e morfométrica de larvas de *A. cantonensis* e *A. costaricensis*

Larvas de primeiro e terceiro estágio de *A. cantonensis* e *A. costaricensis* estão demonstradas na **Figura 3** e seus dados morfológicos e morfométricos estão apresentados na **Tabela 2**. Ambas apresentaram pouca variabilidade quanto aos parâmetros avaliados, com pequeno desvio padrão e valores médios extremamente aproximados, ou até mesmo sem diferença em parâmetros como LC/CTC e CE/CTC. L1 de *A. costaricensis* apresentaram valores de CTC, CE e LC menores do que as L1 de *A. cantonensis*, porém as relações LC/CTC e CE/CTC foram numericamente iguais. Larvas de terceiro estágio de *A. cantonensis* e *A. costaricensis* apresentaram pouca ou nenhuma variabilidade nos parâmetros morfométricos analisados, principalmente para DPGC, DAC, LC/CTC e CE/CTC, nos dois grupos individualmente. L3 de *A. costaricensis* ainda apresentaram valores médios iguais para CE e LC, demonstrando tratar-se de um padrão bem homogêneo. A comparação morfométrica entre *A. cantonensis* e *A. costaricensis* indicou 48% de similaridade entre as larvas L1, com menor similaridade para os parâmetros de CTC e CE e 76% de similaridade para as larvas L3, com menor similaridade para DAC e ausência de similaridade para CE.

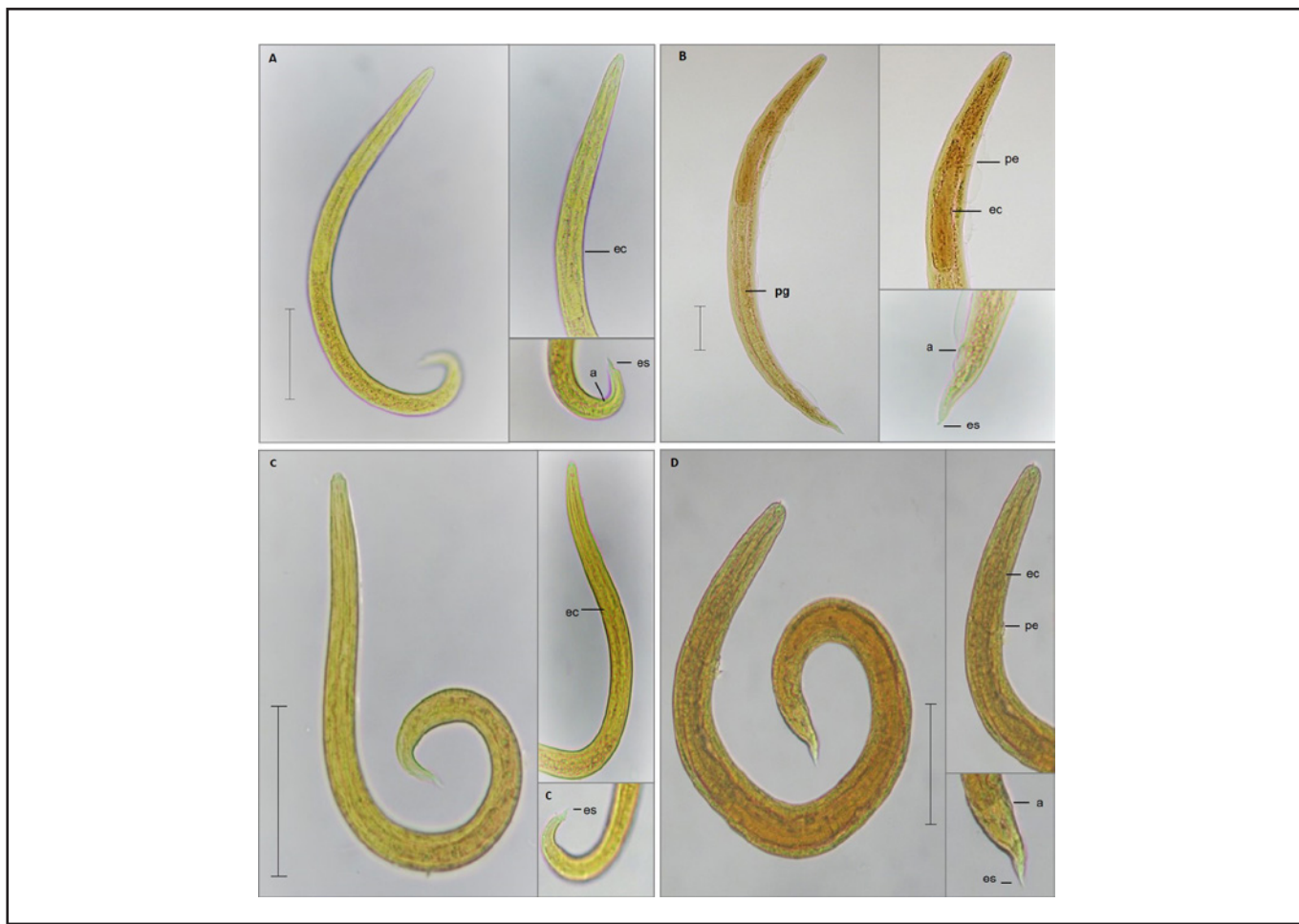


Figura 3. Larvas de primeiro e de terceiro estágio de *A. cantonensis* (A) e (B) e *A. costaricensis* (C) e (D), demonstrando o esôfago do tipo claviforme (ec), poro excretor (pe), primórdio genital (pg) e extremidade posterior, indicando o ânus (a) e a espícula (es). Escala = 50 µm

Tabela 2. Dados morfológicos e morfométricos (μm) de larvas de primeiro (L1) e terceiro estágio (L3) de *A. cantonensis* e *A. costaricensis*

	<i>Angiostrongylus cantonensis</i>		<i>Angiostrongylus costaricensis</i>	
	L1	L3	L1	L3
Extremidade anterior	arredondada	arredondada	arredondada	arredondada
Vestíbulo bucal	ausente	ausente	ausente	ausente
Tipo de esôfago	reto, longo, claviforme	reto, longo, claviforme	reto, longo, claviforme	reto, longo, claviforme
Extremidade posterior (cauda)	curta, curva	curta, curva	curta, curva	curta, curva
Terminação da cauda	ponta fina com espícula	ponta fina com espícula	ponta fina com espícula	ponta fina com espícula
Primórdio genital	não evidente	oval, evidente	não evidente	oval evidente
Cutícula	finas estrias transversais	finas estrias transversais	finas estrias transversais	finas estrias transversais
CTC	206,73 – 291,35	434,04 – 482,66	201,99 – 243,96	413,69 – 489,92
CE	101,33 – 136,12	162,17 – 182,68	97,8 – 114,40	143,8 – 160,24
LC	10,67 – 13,81	22,76 – 32,99	9,38 – 12,91	22,45 – 28,53
DPE	–	81,11 – 97,78	–	75,7 – 95,31
DAC	14,86 – 25,19	31,36 – 46,92	17,69 – 25,12	19,89 – 36,92
DPGC	–	136,02 – 174,52	–	132,66 – 166,39

CTC – comprimento total do corpo; CE – comprimento do esôfago; LC – largura do corpo; DPE – distância do poro excretor; DAC – distância do ânus a cauda; e DPGC – distância do primórdio genital a cauda

DISCUSSÃO

Os nematódeos são reconhecidos entre os helmintos por apresentarem ciclos biológicos complexos e grande diversidade de formas evolutivas. A literatura é vasta no que se refere à morfologia de vermes adultos, tanto de vida livre como fitonematóides ou espécies de interesse médico. Contudo a identificação dos seus estágios larvares, infectantes ou intermediários, ainda é um grande desafio, principalmente no caso de amostras ambientais^{2,20,21}. Portanto, a adoção de critérios precisos de identificação em relação aos caracteres morfológicos e morfométricos das larvas de nematódeos é determinante para o diagnóstico diferencial dos espécimes. Diversos autores recorreram à combinação de dados morfométricos como ferramenta para a diferenciação de larvas de diferentes gêneros de nematódeos isoladas de hospedeiros vertebrados e invertebrados^{20,22-25}.

No presente estudo, as larvas filarioides de *S. stercoralis* apresentaram medidas morfométricas inferiores as apresentadas por Little²⁰, no entanto se mantiveram dentro do intervalo de variação descrito para o gênero *Strongyloides*. Da mesma forma, larvas de *S. stercoralis* isoladas de pacientes com strongiloidíase, tanto por Teixeira²⁶ quanto por Miné²¹, apresentaram valores médios superiores às larvas padrões desse estudo. Já as larvas padrão de *S. venezuelensis* se apresentaram dentro do intervalo de variação apresentado por Little²⁰ para a espécie, em relação aos parâmetros CTC e DAC, e inferiores quanto ao CE e LC. Em comparação aos dados obtidos por Tobar et al²⁷, as larvas rabditoides L1 e filarioides L3 do padrão apresentaram valores médios de CTC e LC inferiores, enquanto as larvas L2 apresentaram esses valores médios superiores. Entre as hipóteses possíveis para as diferenças nos dados morfométricos dos estudos, destaca-se a dificuldade de padronização exata dos estágios larvares, uma vez que as larvas permanecem em processo de desenvolvimento e crescimento contínuo.

Little²⁰ e Vieira et al²⁸ ressaltaram a dificuldade de diferenciação de espécies por características morfológicas dentro do gênero *Strongyloides*. No entanto, os dados da avaliação de similaridade por escores do presente estudo sugerem que há uma possibilidade de diferenciação entre larvas de *S. stercoralis* e *S. venezuelensis* pelas características da largura da extremidade anterior (LEA), e pelas medidas de comprimento e largura do primórdio genital (CPG e LPG), principalmente para larvas rabditoides L1, que não foram adotadas por esses autores. No caso das larvas filarioides, o parâmetro LEA se mostrou promissor, embora sejam necessárias maiores investigações para uma conclusão efetiva.

Com relação aos ancilostomídeos, o padrão morfométrico foi desenvolvido a partir de um *pool* de larvas obtidas de material fecal canino. A semelhança nas médias dos parâmetros CTC, LC e DAC das larvas filarioides do padrão com as larvas infectantes de *A. caninum* descritas por Nichols²⁹ permitem sugerir que essa seja a espécie mais provável das larvas padrão. Porém, por se tratar de *pool* de larvas, pode haver outras espécies envolvidas, como *A. brasilienses* ou *A. ceylanicum*³⁰. No entanto, ao se comparar os resultados médios das larvas filarioides do presente estudo com os dados apresentados por Yoshida³¹, para larvas infectantes de *A. brasilienses*, *A. ceylanicum* e *A. duodenale*, originadas de cães experimentalmente infectados, as larvas padrões apresentaram medidas morfométricas inferiores para CTC, CTM e CE e semelhante aos de LC, em relação a todas as espécies. Devido à ausência de larvas de ancilostomídeos de origem humana no período do estudo, não foi realizada avaliação de similaridade fenotípica para esse

gênero, porém as larvas filarioides do padrão apresentaram valores médios também inferiores às larvas filarioides de *A. duodenale* e *Necator americanus*, extraídas de fezes humanas, para os parâmetros de CTC e LC, descritos por Corrêa et al³².

No gênero *Angiostrongylus*, os dados morfométricos obtidos de larvas L3 de *A. cantonensis* estão em concordância com os isolados de referência de Ash²⁴ e Mota et al²⁵, para todos os parâmetros avaliados. Os valores médios foram concordantes com o intervalo de variação das larvas infectantes identificadas por Mota et al²⁵, obtidas de infecção natural de moluscos. Igualmente, os dados dos padrões de larvas L3 de *A. costaricensis* foram compatíveis com os das cepas de referência apresentados por Rocco¹⁷ e por Mota¹⁸.

A análise de similaridade por escore é um sistema binomial que tem sido utilizado para comparações de características distintas, por exemplo, na avaliação da diversidade genética pela técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)³³, aplicada para diferentes organismos como cepas de bactérias³⁴, protozoários³⁵, plantas³⁶ e artrópodes³⁷. Esta análise também tem sido utilizada na avaliação da diversidade morfológica entre os mesmos estágios evolutivos de parasitos, como as larvas de metastrongilídeos, para comparar populações de larvas infectantes (L3) isoladas de moluscos terrestres, com angiostrongilídeos de importância médica (*A. cantonensis* e *A. costaricensis*), estabelecidos em modelos experimentais^{17,18}.

Nesse estudo, essa técnica foi aplicada para comparação de múltiplos parâmetros morfométricos, o que demonstrou ser eficiente na diferenciação entre espécies do mesmo gênero. O percentual de similaridade encontrado entre *A. cantonensis* e *A. costaricensis*, de 48% para larvas L1 e de 76% para larvas L3, demonstrou diferenças morfométricas importantes entre elas, principalmente quanto ao comprimento do esôfago (CE) das L3, que se destacou por não apresentar nenhuma similaridade entre as duas espécies comparadas. Mota¹⁸ detectou similaridade entre 85% a 99% com isolados de referência L3 de *A. cantonensis* e baixa similaridade para outras espécies do gênero, como *A. costaricensis*. Houve concordância de 100% entre o diagnóstico morfológico e molecular de *A. cantonensis*, nos casos com similaridade superior a 85%, confirmando a aplicabilidade diagnóstica da análise de similaridade por escore para esse gênero. A correspondência do diagnóstico molecular com a avaliação da similaridade validado por Souza et al³⁸, reforça a perspectiva de utilização deste método como um recurso para a identificação e diagnóstico diferencial de larvas de origem ambiental, contribuindo para uma identificação mais precisa.

CONCLUSÃO

Os resultados médios das larvas padrões foram compatíveis com os descritos para as espécies, com variabilidade em alguns parâmetros morfométricos.

Estudos morfológicos e morfométricos de nematódeos de interesse médico-veterinário, em diferentes estágios larvares, podem contribuir para o diagnóstico diferencial de nematódeos de origem ambiental, incluindo amostras de alimentos, pois permitem uma comparação mais detalhada entre os espécimes.

Verificou-se que há uma perspectiva de aplicação da análise de similaridade para realizar a diferenciação específica entre larvas de *A. cantonensis* e *A. costaricensis*, e entre larvas de *S. stercoralis* e *S. venezuelensis* quando adicionados parâmetros morfométricos relacionados ao vestibulo bucal e ao

primórdio genital. A utilização de dados de múltiplos parâmetros e analisados em conjunto foi eficiente, conferindo maior segurança para a diferenciação dessas espécies.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não existir conflitos de interesse.

FINANCIAMENTO

Não declarado pelos autores.

AGRADECIMENTOS

A William Henry Roldán Gonzáles, doutorando do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, por disponibilizar larvas de *Strongyloides venezuelensis* para este estudo.

Ao Laboratório de Zoonoses e Doenças Transmitidas por Vetores do Centro de Controle de Zoonoses da cidade de São Paulo, pela disponibilização de material para obtenção de larvas ancilostomídeos.

A Augusta Mendes da Silva, Márcia Dimov Nogueira e Maria Aparecida Moraes Marciano, pesquisadoras do Núcleo de Morfologia e Microscopia do Instituto Adolfo Lutz, e a Antonio Roberto de Souza Ferreira, técnico de apoio à pesquisa da mesma instituição, pelas contribuições e apoio técnico para a realização deste estudo.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Laís Fernanda de Pauli-Yamada participou da concepção e planejamento do estudo, análise e interpretação dos dados e redação do manuscrito. Pedro Luiz Silva Pinto atuou na concepção e planejamento do estudo, análise e interpretação dos dados, revisão crítica do conteúdo e aprovação da versão final do manuscrito.

NOTA DE APRESENTAÇÃO

Os resultados deste artigo integram a dissertação de mestrado de Laís Fernanda de Pauli-Yamada, intitulada “Detecção de nematódeos em alfaces (*Lactuca sativa* L.) comercializadas em São Paulo: diagnóstico diferencial com padrão de larvas de risco à saúde”, defendida no ano de 2021, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

REFERÊNCIAS

1. De Ley P. A quick tour of nematode diversity and the backbone of nematode phylogeny [Internet]. WormBook: The Online Review of *C. elegans* Biology. WormBook; 2006. [acesso 2020 Fev 09]. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19684/>
2. Ferraz LCCB, Brown DJF, editores. Nematologia de plantas: fundamentos e importância. Manaus: Norma Editora; 2016. p. 251. [acesso 2020 Jul 27]. Disponível em:
<https://www.nematologia.com.br/files/livros/1.pdf>

3. Blaxter M. Nematodes: the worm and its relatives. PLoS Biology. 2011;9(4):e1001050.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001050>
4. Ferraz LCCB. Nematoides. In: Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. São Paulo: Agronômica Ceres; 2018. p. 1-18. Disponível em:
<https://www.researchgate.net/publication/324391159>
5. Seesao Y, Gay M, Merlin S, Viscogliosi E, Aliouat-Denis CM, Audebert C. A review of methods for nematode identification. J Microbiol Methods. 2017;138:37-49.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.05.030>
6. Bogale M, Baniya A, DiGennaro P. Nematode identification techniques and recent advances. Plants. 2020;9(10):1260.
<https://doi.org/10.3390/plants9101260>
7. Amoah ID, Singh G, Stenström TA, Reddy P. Detection and quantification of soil-transmitted helminths in environmental samples: a review of current state-of-the-art and future perspectives. Acta Trop. 2017;169:187-201.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.02.014>
8. Bethony J, Brooker S, Albonico M, Geiger SM, Loukas A, Diemert D et al. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. Lancet. 2006;367(9521):1521-32.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68653-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68653-4)
9. Adenusi AA, Abimbola WA, Adewoga TO. Human intestinal helminth contamination in pre-washed, fresh vegetables for sale in major markets in Ogun State, southwest Nigeria. Food Control. 2015;50:843-9.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.10.033>
10. Luz JGG, Barbosa MV, Carvalho AG, Resende SD, Dias JVL, Martins HR. Contamination by intestinal parasites in vegetables marketed in an area of Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. Rev Nutr. 2017;30(1):127-36.
<https://doi.org/10.1590/1678-98652017000100012>
11. Silva LGB, Silva LMB, Arrais FMA, Melanda GCS, Ferreira RJ. Prevalência de estruturas parasitárias de protozoários e de helmintos em hortaliças comercializadas em barracas de rua no município de Crato-CE, Brasil. Revista Saúde (Santa Maria). 2018;44(3).
<https://doi.org/10.5902/2236583429982>

12. Rodrigues AC, Silva MDC, Pereira RAS, Pinto LC. Prevalence of contamination by intestinal parasites in vegetables (*Lactuca sativa* L. and *Coriandrum sativum* L.) sold in markets in Belém, northern Brazil. J Sci Food Agric. 2020;100:2859-65.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.10265>
13. Amer OH, Ras R, El-Alfy SA, Raef A. Prevalence and morphological characters of *Strongyloides stercoralis* contaminating some fresh raw vegetables in Sharkia province, Egypt. EVMSPJ. 2020;16:158-71.
<https://doi.org/10.21608/evmspj.2020.132894>
14. Waugh CA, Lindo JF, Lorenzo-Morales J, Robinson RD. An epidemiological study of *A. cantonensis* in Jamaica subsequent to an outbreak of human cases of eosinophilic meningitis in 2000. Parasitology. 2016;143(9):1211-17.
<https://doi.org/10.1017/S0031182016000640>
15. Kramer KJ, Posner J, Gosnell WL. 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>
16. Harada YAOM, Mori O. A New Method for culturing Hook Worm. Yonago Acta Med. 1955;1(3):177-9.
17. Rocco SC. Infecção natural de nematódeos parasitas em *Achatina fulica* Ferussac (Gigante Africano) (gastropoda: Pulmonata: Stylommatophora) relacionada com as condições sanitárias em vida livre e em criações comerciais no Estado de São Paulo. [tese de doutorado]. São Paulo (SP): Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo; 2007. Disponível em:
<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/sus-19498>
18. Mota DJG. Infecção natural por larvas de metastrongilídeos em moluscos terrestres de diferentes regiões do estado de São Paulo [tese de doutorado]. São Paulo (SP): Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo; 2018. Disponível em:
https://docs.bvsalud.org/biblioref/2019/08/1008307/dan-tese-final_.pdf
19. Yamada LFP. Detecção de nematódeos em alfaces (*Lactuca sativa* L.) comercializadas em São Paulo: diagnóstico diferencial com padrão de larvas de risco à saúde [dissertação de mestrado]. São Paulo (SP): Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo; 2021. Disponível em:
<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1358837>
20. Little MD. Comparative morphology of six species of *Strongyloides* (Nematoda) and redefinition of the genus. J Parasitol. 1966;52(1):69-84.
<https://doi.org/10.2307/3276396>

21. Miné JC. Caracterização de cepas de *Strongyloides stercoralis* (Bavay, 1876) Stiles & Hassal, 1902 (Rhabditida, Strongyloididae) isoladas de pacientes com e sem sintomatologia da região de Araraquara-SP. [tese de doutorado]. Araraquara (SP): Universidade Estadual Paulista; 2009. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/104538>
22. Joachim A, Dülmer N, Dauschies A. Differentiation of two *Oesophagostomum* spp. from pigs, *O. dentatum* and *O. quadrispinulatum*, by computer-assisted image analysis of fourth-stage larvae. Parasitol Int. 1999;48(1):63-71. [https://doi.org/10.1016/S1383-5769\(99\)00003-3](https://doi.org/10.1016/S1383-5769(99)00003-3)
23. van Wyk JA, Cabaret J, Michael LM. Morphological identification of nematode larvae of small ruminants and cattle simplified. Vet Parasitol. 2004; 119(4):277-306. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.11.012>
24. Ash LR. Diagnostic morphology of the third-stage larvae of *Angiostrongylus cantonensis*, *Angiostrongylus vasorum*, *Aelurostrongylus abstrusus*, and *Anafilaroides rostratus* (Nematoda: Metastrongyloidea). J Parasitol. 1970; 56(2):249-53. <https://doi.org/10.2307/3277651>
25. Mota DJG, Melo LCV, Pereira-Chioccola 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>
26. Teixeira ATLS. *Strongyloides stercoralis*: frequência em exames parasitológicos do Hospital de Clínicas da UNICAMP e análise morfométrica das larvas. Rev Soc Bras Med Trop. 1997;30(1):75-6. <https://doi.org/10.1590/S0037-86821997000100016>
27. Tobar J, Sarmiento DR, Tayupanta D, Rodríguez M, Aguilar F. Microscopic and molecular evaluation of *Strongyloides venezuelensis* in an experimental life cycle using Wistar rats. Biomédica. 2021;41(Supl. 1):35-46. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5650>
28. Vieira FM, Lima SS, Bessa ECA. Morfologia e biometria de ovos e larvas de *Strongyloides* sp. Grassi, 1879 (Rhabditoidea: Strongyloididae), parasito gastrointestinal de *Hydrochaeris hydrochaeris* (Linnaeus, 1766) (Rodentia: Hydrochaeridae), no Município de Juiz de Fora, Minas Gerais. Rev Bras Parasitol Vet. 2006;15(1):7-12. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/3978/397841457002.pdf>

29. Nichols RL. The etiology of visceral larva migrans: II. Comparative larval morphology of *Ascaris lumbricoides*, *Necator americanus*, *Strongyloides stercoralis* and *Ancylostoma caninum*. J Parasitol. 1956;42(4):363-99.
<https://doi.org/10.2307/3274519>
30. Burrows RB. Comparative morphology of *Ancylostoma tubaeforme* (Zeder, 1800) and *Ancylostoma caninum* (Ercolani, 1859). J Parasitol. 1962;48(5):715-18.
<https://doi.org/10.2307/3275261>
31. Yoshida Y. Comparative Studies on *Ancylostoma braziliense* and *Ancylostoma ceylanicum*. II. The infective larval stage. J Parasitol. 1971;57(5):990-2.
<https://doi.org/10.2307/3277852>
32. Corrêa LL, Silva MIPG, Silva RM, Dias RMDS. *Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus*: diagnóstico diferencial das larvas infestantes e prevalência em amostras fecais provenientes da grande São Paulo. Rev Inst Adolfo Lutz. 1979;39(2):145-53. Disponível em:
<https://periodicos.saude.sp.gov.br/index.php/RIAL/article/view/37309>
33. Babu KN, Rajesh MK, Samsudeen K, Minoos D, Suraby EJ, Anupama K et al. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and derived techniques. Methods Mol Biol. 2014;1115:191-209.
https://doi.org/10.1007/978-1-62703-767-9_10
34. Gzyl A, Augustynowicz E. Technical aspects of random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique in genotyping of bacterial strains. Acta Microbiol Pol. 1999;48(3):243-59. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10756711>
35. Howard J, Carlton JMR, Walliker D, Jensen JB. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique in inheritance studies of *Plasmodium falciparum*. J Parasitol. 1996;82(6):941-6.
<https://doi.org/10.2307/3284203>
36. Ezzat SM, El Sayed AM, Salama MM. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique to study the genetic diversity of eight aloe species. Planta Med. 2016;82(15):1381-6.
<https://doi.org/10.1055/s-0042-108208>
37. Fraga J, Rodriguez J, Fuentes O, Fernandez-Calienes A, Castex M. Optimization of random amplified polymorphic DNA techniques for use in genetic studies of cuban triatominae. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2005;47(5):295-300.
<https://doi.org/10.1590/S0036-46652005000500010>

38. Souza F, Santos MA, Alves DA, Melo LCVM, Mota DJG, Pertile AC et al. *Angiostrongylus cantonensis* in urban populations of terrestrial gastropods and rats in an impoverished region of Brazil. Parasitology. 2021;148(8):994-1002.

<https://doi.org/10.1017/S0031182021000597>





Impacto na qualidade de antissépticos e desinfetantes com álcool 70% (p/p) utilizados no enfrentamento da pandemia provocada pelo SARS-CoV-2

Impacts on the quality of antiseptic and disinfectant products with 70% alcohol (w/w) used in the SARS-CoV-2 pandemic

Fernanda Fernandes Farias^{1*} , Helena Miyoco Yano² , Valéria Adriana Pereira Martins² , Luz Marina Trujillo² , Ellen Gameiro Hilinski³ , Kátia Cristina da Silva Rodrigues³ , Adriana Aparecida Buzzo Almodovar⁴ , Maria Cristina Santa Bárbara¹ 

¹ Núcleo de Ensaios Físicos e Químicos em Cosméticos e Saneantes, Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil.

² Núcleo de Ensaios Físicos e Químicos em Medicamentos, Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil.

³ Núcleo de Ensaios Biológicos e de Segurança, Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil.

⁴ Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil.

*Autor de correspondência/Corresponding author: fernanda.farias@ial.sp.gov.br

Recebido/Received: 24.01.2023 – Aceito/Accepted: 16.06.2023

RESUMO

Formulações contendo álcool etílico 70% (p/p) podem ser classificadas como cosméticos, medicamentos ou saneantes, dependendo da apresentação e local de uso. Foram largamente empregadas como antisséptico na forma líquida e gel no combate à pandemia provocada pelo SARS-CoV-2. O presente estudo teve como objetivo avaliar a qualidade de 60 produtos em relação ao teor e rotulagem, destinados à higienização das mãos, superfícies e de uso hospitalar comercializadas em São Paulo. Realizou-se a avaliação do teor de álcool etílico por determinação direta em densímetro digital e comparação das informações da rotulagem com as da legislação de referência e com o rótulo aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Os resultados demonstraram que 48,3% das amostras apresentaram resultados inferiores aos limites regulatórios e às concentrações descritas no rótulo do produto para o teor de álcool etílico. Além disso, 5% apresentaram prazo de validade informado no rótulo acima de 180 dias, em desacordo com a RDC 350/20. Os níveis de insatisfatoriedade encontrados neste estudo indicam a necessidade de monitoramento da qualidade dos produtos disponíveis no mercado brasileiro com o propósito de apoiar as autoridades sanitárias nas atividades de fiscalização.

Palavras-chave. Álcool Etilico, Higienização das Mãos, Rotulagem de Produtos, Diretrizes Normativas.

ABSTRACT

Formulations containing 70% ethyl alcohol (w/w) can be classified as cosmetics, medicines, or sanitizers depending on the presentation and place of use. These formulations were widely used as an antiseptic in the fight against the SARS-CoV-2 pandemic, available in both liquid and gel forms. The present study aimed to assess the quality of 60 products, intended for hand and surface hygiene and hospital use, sold in São Paulo. The ethyl alcohol content was evaluated by direct determination using a digital densimeter, and the labeling information was compared with the reference legislation and the label approved by ANVISA (Brazil's National Health Surveillance Agency). The results showed that 48.3% of the products had ethyl alcohol content below the regulatory limits and concentrations specified on the product label. Additionally, 5% of the products had an expiration date on the label that exceeded 180 days, contrary to RDC 350/20 regulations. The levels of unsatisfactory products found in this study indicate the need for continuous monitoring of the quality of products available in the Brazilian market. Such monitoring is crucial to support health authorities in their inspection activities and ensure the efficacy and safety of antiseptic and disinfectant products used in the context of public health.

Keywords. Ethanol, Hand Hygiene, Product Labeling, Guidelines.

INTRODUÇÃO

O termo desinfecção, dentre as diversas definições encontradas na literatura, é o processo físico ou químico que destrói a maioria dos micro-organismos de objetos inanimados e superfícies, com exceção de esporos bacterianos¹. Os desinfetantes são utilizados para superfície fixa, geralmente devido à sua toxicidade e classificados como saneantes. Os antissépticos de uso em humano são produtos ativos contra a microbiota residente e transitória da pele íntegra e de outros tecidos vivos, sendo capazes de reduzir o número de micro-organismos por remoção mecânica, ação química ou ambas, podendo ser classificados como cosméticos ou medicamentos, sendo os últimos de uso hospitalar, principalmente para antisepsia da pele pré-operatória².

O desinfetante mais utilizado no Brasil é o álcool etílico devido ao baixo custo e maior disponibilidade frente a outros insumos da mesma categoria, como a clorexidina e o álcool isopropílico, este, por questões culturais e de custo, é regularmente comum nos EUA³. O álcool etílico é um líquido incolor, fórmula molecular C_2H_6O , e de baixa toxicidade⁴. Como antisséptico, o álcool etílico a 70% tem capacidade de suprimir os micro-organismos de maior frequência nas infecções e produz efeito aproximadamente em 30 segundos⁵. Seu uso na história data de longo tempo em diversas finalidades como para higienizar vestimentas e roupas de soldados que voltavam da guerra⁶.

Na rotulagem de produtos, a concentração de álcool etílico obrigatoriamente deve ser reportada em °INPM, ou seja, (p/p). Caso o fabricante opte, poderá acrescentar a informação °GL (v/v) no rótulo. A solução de álcool etílico 70 °INPM (70% p/p) corresponde a aproximadamente 77 °GL (77% v/v)⁷, sendo considerada desinfetante de nível intermediário, e sua ação, segundo a classificação do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC)⁸, está relacionada com a desnaturação proteica e com a interferência no metabolismo microbiano. O álcool etílico 93,84 °INPM ou 96 °GL apresenta atividade desidratante e de menor efetividade antimicrobiana quando comparado ao álcool etílico 70 °INPM⁹.

A legislação que regulamenta os produtos à base de álcool, tanto para uso saneante quanto para uso cosmético, é a RDC nº 691 de 2022¹⁰, que dispõe sobre a industrialização, exposição à venda ou entrega ao consumo do álcool etílico anidro ou hidratado, nas suas graduações, bem como em produtos destinados à limpeza de superfície, desinfecção e antisepsia da pele ou substância. Esta resolução revoga as resoluções anteriores: RDC 46/2002¹¹, RDC 219/2002¹², RDC 322/2002¹³ e RDC 490/2021¹⁴.

A concentração de álcool etílico nos produtos de higiene pessoal antissépticos (cosméticos) não pode ter valor que represente variação superior a 10% em relação à concentração 70% (p/p). A concentração de álcool etílico nos saneantes desinfetantes hospitalares para superfícies fixas e artigos não críticos deve respeitar o teor mínimo de 68,25% (p/p) e máximo de 71,75% (p/p) (variação aceitável de 2,5%, conforme preconiza a resolução para saneantes RDC nº 59/2010)^{1,15}.

Para a determinação do teor de álcool etílico, a Farmacopeia Brasileira⁷ contempla dois métodos: o método clássico por destilação, seguida pela determinação do teor de álcool pela densidade (picnometria), e por determinação por cromatografia a gás. Na literatura são encontrados exemplos destes métodos com otimizações¹⁶ e também propostas de métodos por outras técnicas, como infravermelho¹⁷, destinados à quantificação do teor de álcool etílico em formulações de álcool gel antisséptico para as mãos. O emprego de densímetro digital é uma técnica simples, rápida e de determinação direta para quantificação de álcool etílico por correlação com a densidade.

Além da avaliação físico-química, a análise de rotulagem é extremamente relevante, pois este é o meio que o usuário possui para fazer o uso correto do produto e obter as informações necessárias, considerando o risco associado ao uso do álcool etílico.

Diante desse quadro, este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade de produtos destinados à higienização das mãos e superfícies, frente à flexibilização de normativas, por meio da determinação do teor de álcool etílico e análise de rotulagem em 60 amostras que continham álcool etílico como ativo em sua formulação, comercializadas na cidade de São Paulo nos anos de 2020 a 2021, durante o cenário da pandemia por COVID-19.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Durante o período de pandemia, nos anos 2020 a 2021, o Instituto Adolfo Lutz (IAL), por meio do Núcleo de Ensaios Físicos e Químicos em Cosméticos e Saneantes, analisou 60 amostras com álcool etílico como ativo, dentre elas, álcool gel antisséptico para as mãos, álcool líquido para uso hospitalar, álcool gel e líquido para uso geral e álcool etílico 92 °GL para uso como matéria-prima (**Tabela**). Dentre estas, 29 amostras foram relacionadas à análise fiscal, sendo 16 enviadas pela Coordenadoria de Vigilância em Saúde (COVISA) da Secretaria Municipal da Saúde (n = 16) por meio de um programa de monitoramento, para avaliar a qualidade dos produtos destinados à higienização das mãos e das superfícies e 13 amostras foram encaminhadas pelas Unidades de Vigilância Sanitária com o objetivo de atender denúncia por suspeita de desvio de qualidade (**Figura**). Trinta e uma (31) amostras, pertencentes às categorias de cosméticos, saneantes, medicamentos e uma (1) de matéria-prima foram adquiridas no comércio varejista de São Paulo.

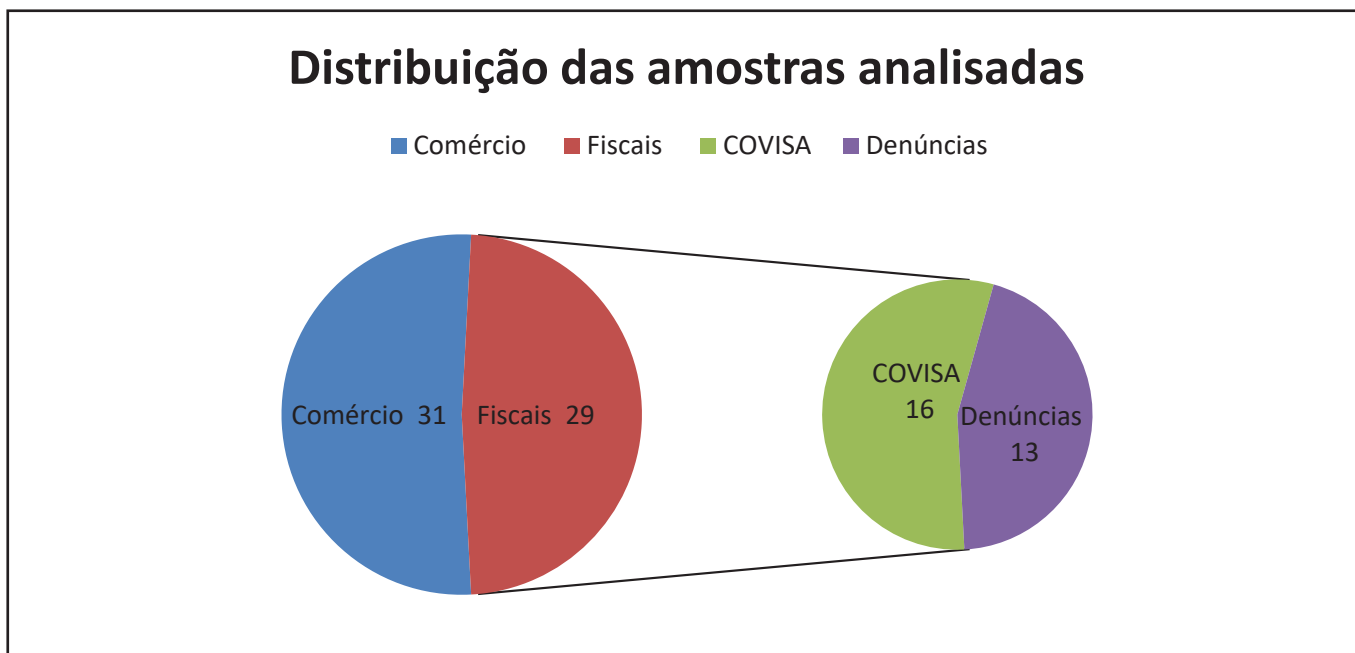


Figura. Distribuição das amostras analisadas conforme origem

Determinação da densidade e teor de álcool etílico

A determinação do teor de álcool etílico por meio da densidade nas 60 amostras foi realizada empregando o densímetro digital DDM 2911 (Rudolph Research Analytical®), cuja técnica fundamenta-se no movimento de vibração, através do período de oscilação do tubo em U, obtendo-se a medida da densidade por relação direta, expressa em teor de álcool etílico, conforme tabelas correspondentes à porcentagem em massa ou °INPM na Farmacopeia Brasileira⁷. Utilizou-se água ultrapura obtida no equipamento purificador de água, modelo Elgastat Máxima UF, para calibração do densímetro. Como amostra controle de referência para a realização dos ensaios, utilizaram-se amostras de álcool gel e líquido de concentração previamente determinadas e aprovadas, obtidas no comércio.

Análise de rotulagem

Os rótulos das amostras de álcool gel foram avaliados quanto ao atendimento às legislações específicas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em comparação às informações obrigatórias que devem constar na rotulagem. Para a avaliação, foi considerada a resolução vigente na data de fabricação de cada produto: RDC 46/2002¹¹, RDC 199/2006¹⁸, RDC 42/2010¹⁹, RDC 350/2020²⁰, RDC 422/2020²¹ e RDC 490/2021¹⁴. Para os produtos que continham registro, foram solicitados junto à Gerência de Produtos de Higiene, Perfumes, Cosméticos e Saneantes (GHCOS) da ANVISA, os documentos referentes ao registro do produto e a arte gráfica de rótulo no ato de registro do produto, para que fosse realizada a avaliação por comparação com o rótulo da amostra.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com a pandemia provocada pelo coronavírus causador da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV-2), prevaleceu, entre outras medidas, o uso de agentes químicos saneantes empregados na higienização frequente das mãos, objetos e superfícies. A grande procura por produtos à base de álcool, como álcool gel antisséptico para as mãos, álcool líquido para uso hospitalar, álcool gel e álcool líquido para uso geral, causou indisponibilidade de estoque destes no varejo. Deste modo, a ANVISA, por meio da RDC nº 350/2020²⁰, permitiu temporariamente, a fabricação e comercialização de preparações alcoólicas sem registro ou notificação, por estabelecimentos fabricantes de cosméticos, saneantes e medicamentos, desde que estes atendessem os critérios técnicos de qualidade e parâmetros de rotulagem com prazo de validade máximo de 180 dias²⁰. Nesse período, houve ocorrência de aumento de diferentes empresas e marcas de produtos de álcool (70% p/p) líquido ou gel, em circulação no mercado.

Posteriormente, a resolução foi alterada pela RDC nº 422/2020²¹, que define os critérios e os procedimentos extraordinários e temporários para a fabricação e comercialização de preparações antissépticas ou desinfetantes sem prévia autorização da ANVISA. Conforme estabelecida nesta legislação, as empresas devem possuir Autorização de Funcionamento (AFE), alvará ou licença sanitária emitida pelo órgão de saúde competente dos Estados, Distrito Federal e Municípios, e as demais outorgas públicas para funcionamento, inclusive, para fabricação e armazenamento de substância inflamável, sendo permitida a fabricação somente dos produtos referentes à categoria para a qual se encontram regularizadas

(medicamentos, cosméticos e/ou saneantes). Com a publicação da RDC nº 641/2022²², as resoluções RDC 350/2020²⁰ e RDC 422/2020²¹ foram revogadas.

Com o fim da Emergência em Saúde Pública de Importância Nacional, a RDC nº 641/2022²² também foi revogada. Desta forma, com a publicação na RDC nº 691/2022¹⁰, normativa atual, a fabricação de preparações antissépticas (cosméticos) e desinfetantes para a superfície fixa (saneantes) à base álcool etílico na fração ou percentual de 70% (p/p) não puderam mais ocorrer sem regularização (registro ou notificação) na ANVISA. O álcool gel destinado à higienização das mãos, produto cosmético classificado como grau 2, voltou a exigir registro na ANVISA para ser comercializado. Entretanto, mesmo com a flexibilização das regras autorizada pela ANVISA, enquanto perdurasse a situação de emergência em saúde pública, os fabricantes deveriam atender critérios técnicos de qualidade e parâmetros de rotulagem.

Na **Tabela**, são apresentadas a distribuição quanto à classificação das amostras analisadas e os resultados correspondentes à avaliação da rotulagem, com os desvios apresentados. Do total de 60 amostras, 39 corresponderam a gel antisséptico para as mãos, 17 saneantes destinados à limpeza de superfície, 3 álcool etílico 70 °INPM para uso hospitalar e 1 álcool 92 °INPM matéria-prima.

Tabela. Distribuição das amostras conforme sua classificação na legislação e os desvios apresentados na avaliação da rotulagem

Classificação	Origem	Total	Resolução/Rotulagem
Gel antisséptico para as mãos (Cosméticos)	Programa COVISA	16	3 amostras: insatisfatórias, validade acima de 180 dias, em desacordo com a RDC nº 350/2020 ²⁰
	Amostras fiscais para atender denúncia	2	RDC nº 350/2020 ²⁰ Análise de rótulo: satisfatória
	Amostras adquiridas no comércio	21	RDC nº 350/2020 ²⁰ Registrados Análise de rótulo: satisfatória
Saneantes	Amostras fiscais para atender denúncia	11	Todos notificados – produto grau 1 destinado à limpeza de superfície Análise de rótulo: satisfatória
	Amostras adquiridas no comércio	6	Todos notificados – produto grau 1 destinado à limpeza de superfície Análise de rótulo: satisfatória
Medicamento	Amostras de uso hospitalar	3	RDC nº 199/2006 ¹⁸ – notificação simplificada Análise de rótulo: satisfatória
Matéria- prima	Amostra adquirida no comércio	1	De acordo com a especificação do rótulo RDC nº 46/2002 ¹¹

Quanto ao teor de álcool etílico nas 60 amostras analisadas, 29 apresentaram resultados inferiores aos limites regulatórios e às concentrações descritas no rótulo do produto, correspondendo a 48,3% de amostras insatisfatórias. Destas, 18 eram gel antisséptico para as mãos e 11 eram produtos saneantes destinados à limpeza de superfície.

Outros estudos avaliaram a qualidade de álcool líquido em amostras comerciais, como Macario et al (2021)²³, que determinaram o grau alcoólico e a eficácia antimicrobiana de 10 diferentes marcas do município de Maringá. Dentre as amostras analisadas, 70% (n = 7) apresentaram resultados inferiores à faixa de aceitação regulatória para o teor de álcool (76,9 °GL a 81,4 °GL) e uma amostra apresentou resultado superior ao limite regulatório.

No estudo realizado por Rodrigues et al²⁴ durante o período de pandemia, foram avaliadas seis marcas de álcool em gel com maior venda, encontradas nas farmácias da cidade de Mafra-SC, as quais foram categorizadas em concordância com os padrões esperados. Entretanto, deve-se considerar que o teor alcoólico das amostras foi calculado de forma aproximada, utilizando-se um refratômetro portátil digital. Os resultados obtidos são qualitativos, sendo que para uma amostra foi obtido o teor alcóólico de aproximadamente 60% p/p (INPM).

Em 17 investigações efetuadas em amostras de álcool gel e líquidas adulteradas pelo Núcleo de Química Forense (NUQFO) da Perícia Forense do Estado do Ceará (Pefoce), no período de março de 2020 até as primeiras semanas de abril de 2021, com o auxílio de um densímetro digital, foi verificado que a totalidade dos resultados obtidos em relação à concentração alcoólica não atendeu as especificações exigidas pela ANVISA. Com relação ao rótulo dos produtos analisados, o NUQFO enfatizou a necessidade de constar o teor de álcool com a descrição: 70 °INPM de álcool, o que difere em v/v (GL). Outro apontamento está relacionado à verificação da procedência dos locais de compra, idôneos conhecidos, como supermercados, farmácias e lojas especializadas²⁵.

Quanto à análise de rotulagem do presente estudo, foi observado que todas as amostras apresentaram as advertências obrigatórias no rótulo do produto. Entretanto, três amostras de gel antisséptico para as mãos, fabricadas para atender a RDC 350/2020²⁰, apresentaram prazo de validade superior a 180 dias, prazo máximo permitido pela ANVISA, e dentre estas, duas amostras foram fabricadas anteriormente à RDC nº 350/2020²⁰. Gel antisséptico para as mãos são produtos sujeitos ao procedimento de registro como forma de regularização pela ANVISA para a comercialização; entretanto esses dois produtos estavam erroneamente regularizados, estando apenas notificados na ANVISA.

Observou-se ainda que das 18 amostras de gel antisséptico para as mãos recebidas como amostras fiscais, 11 foram fabricadas de acordo com a RDC 350/2020²⁰, ou seja, sem a necessidade de registro ou notificação na ANVISA, e 7 foram produtos registrados na ANVISA, procedentes de fabricantes de álcool gel. Três produtos à base de álcool 70 °INPM destinados ao uso hospitalar apresentaram avaliação satisfatória para os ensaios de teor de álcool e rotulagem. Ainda, com relação a este aspecto, as autoridades sanitárias alertaram os fabricantes quanto ao risco da autorização temporária para a livre fabricação do álcool 70 °INPM, por ter sido observado, dentre as amostras analisadas, que fornecedores de bebidas envazaram álcool 70 °INPM na forma líquida em recipientes de água mineral, propiciando confundir produtos contendo álcool 70 °INPM com alimento (bebida), o que, pelo Código de Defesa do Consumidor Lei nº 8.078/1990²⁶, é proibido comercializar produtos com características que possam induzir o consumidor ao erro.

Sempre haverá ameaça de enfrentamento de agravos de saúde em termos globais, como surto, epidemia ou pandemia, para os quais o uso do álcool é considerado o produto universalmente de escolha para a antisepsia das mãos, seja de crianças, adolescentes e adultos, pelas autoridades internacionais e nacionais. Ainda assim, é importante observar alguns critérios quanto ao uso de produtos isentos de controle. Apesar da permissão de isenção de registro para certos produtos, o fabricante deve sempre estar atento às legislações específicas de rotulagem e às boas práticas de fabricação. Com relação ao consumidor, ao adquirir um produto saneante ou para higienização, cabe a conferência atenta do rótulo, bem como a verificação das informações de utilização correta do produto, advertências e riscos associados.

É relevante ressaltar que a simples presença de uma substância ativa não é suficiente para garantir a eficácia do produto utilizado. É necessário que a mesma esteja em concentrações adequadas para o uso pretendido.

CONCLUSÃO

Dentre as amostras analisadas (n = 60), 48,3% (n = 29) apresentaram resultados inferiores aos limites regulatórios e às concentrações descritas no rótulo do produto para o teor de álcool. O elevado nível de insatisfatoriedade serve como alerta para o estabelecimento de ações de monitoramento e de fiscalização por parte das autoridades sanitárias para estes produtos no país. Considerando, adicionalmente, a criticidade do momento vivenciado durante a pandemia, garantir a qualidade, eficácia e segurança de uso destes produtos, em instituições públicas, comerciais, residenciais e hospitais, torna-se ainda mais relevante para a saúde pública.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não existir conflitos de interesse.

FINANCIAMENTO

Não declarado pelos autores.

AGRADECIMENTO

Não declarado pelos autores.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Os autores contribuíram substancialmente para a concepção e planejamento, ou análise e interpretação dos dados; contribuíram significativamente na elaboração do rascunho ou na revisão crítica do conteúdo e participaram da aprovação final do mesmo.

REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 59, de 17 de dezembro de 2010. Dispõe sobre os procedimentos e requisitos técnicos para a notificação e o registro de produtos saneantes e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 22 dez 2010. Seção 1(244):80-2.

2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Proposta de harmonização do (re)enquadramento de antissépticos de uso em humano na Anvisa. Documento para contextualizar a Consulta Dirigida. 2021. p. 23. [acesso 2022 Abr 22]. Disponível em:
https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/regulamentacao/participacao-social/consultas-dirigidas/arquivos/documento_cd_gt_antissepticos_01mar2021.pdf
3. Sequinel R, Lenz GF, Silva FJLB, Silva FR. Soluções a base de álcool para higienização das mãos e superfícies na prevenção da COVID-19: compêndio informativo sob o ponto de vista da química envolvida. Quim Nova. 2020;43(5):679-84.
<https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170553>
4. Ficha de Informação de Produto Químico – FISPQ. Álcool etílico. [acesso 2022 Dez 10]. Disponível em:
<https://sites.ffclrp.usp.br/cipa/fispq/etanol.pdf>
5. União Nacional da Bioenergia. PB: Usinas atingem metade da meta com doação de 17 mil litros de álcool a 70% para abastecimento de hospitais. 2020. [acesso 2022 Nov 15]. Disponível em:
<https://www.udop.com.br/noticia/2020/04/30/pb-usinas-atingem-metade-da-meta-com-doacao-de-17-mil-litros-de-alcool-a-70-para-abastecimento-de-hospitais.html>
6. Andrade D, Santos LS, Oliveira BA, Beraldo CC. Álcoois: a produção do conhecimento com ênfase na sua atividade antimicrobiana. Medicina Ribeirao Preto. 2002;35(1):7-13.
<https://doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v35i1p7-13>
7. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Brasil. Farmacopeia Brasileira. 2019. 6ª ed. v.1. Disponível em:
<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira/volume-1-fb6-com-capa.pdf>
8. Center of Diseases Control and Prevention – CDC. Guidelines for environmental infection control in health-care facilities. Recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). US Dep Heal Hum Serv Centers Dis Control Prev. Atlanta, GA 30329; 2003. Disponível em:
<https://www.cdc.gov/infectioncontrol/pdf/guidelines/environmental-guidelines-P.pdf>
9. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. Clin Microbiol Rev. 1999;12(1):147-79.
<https://doi.org/10.1128/CMR.12.1.147>
10. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 691, de 13 de maio de 2022. Dispõe sobre a industrialização, exposição à venda ou entrega ao consumo, em todas as suas fases, do álcool etílico hidratado em todas as graduações e do álcool etílico anidro, como produto destinado a limpeza de superfície, desinfecção e antisepsia da pele ou substância. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 18 mai 2022. Seção 1(93):186.

11. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 46, de 20 de fevereiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico para álcool etílico hidratado em todas as graduações e álcool etílico anidro, comercializados por atacadistas e varejistas. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 21 fev 2002. Seção 1(35):107.
12. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 219, de 2 de agosto de 2002. Altera a Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 46, de 20 de fevereiro de 2002, que dispõe sobre Regulamento Técnico para álcool etílico hidratado em todas as graduações e álcool etílico anidro, comercializados por atacadistas e varejistas. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 06 ago 2002. Seção 1(150):557.
13. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 322, de 22 de novembro de 2002. Altera a Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 46, de 20 de fevereiro de 2002, que dispõe sobre Regulamento Técnico para álcool etílico hidratado, em todas as graduações, e álcool etílico anidro comercializados por atacadistas e varejistas. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 25 nov 2002. Seção 1(228):172.
14. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 490, de 8 de abril de 2021. Altera a Resolução de Diretoria Colegiada – RDC nº 46, de 20 de fevereiro de 2002. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 14 abr 2021. Seção 1(69):204.
15. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 766, de 8 de dezembro de 2022. Autoriza, extraordinária e temporariamente, a venda livre e a doação de álcool etílico na concentração de 70% p/p (setenta por cento, expresso em peso por peso), na forma física líquida, devidamente regularizado na Anvisa. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 14 dez 2022. Seção 1(234):156.
16. Lacerda JPA, Oliveira SS, Marcante A. A rapid and effective method for determination of ethanol content in hand sanitizers (alcohol gel). Rev IPT Tecnol e Inovação. 2020;4(14):57-64. Disponível em: <https://revista.ipt.br/index.php/revistaIPT/article/view/118>
17. Fonseca Jr FS, Brito LR, Pimentel MF, Leal LB. Determination of ethanol in gel hand sanitizers using mid and near infrared spectroscopy. J Braz Chem Soc. 2020;31(9):1759-63. <https://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20200115>
18. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 199, de 26 de outubro de 2006. Dispõe sobre os medicamentos de notificação simplificada. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 30 out 2006. Seção 1(208):167-81.
19. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 42, de 25 de outubro de 2010. Dispõe sobre a obrigatoriedade de disponibilização de preparação alcoólica para fricção antisséptica das mãos, pelos serviços de saúde do País, e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 26 out 2010. Seção 1 (205):27-8.

20. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 350, de 19 de março de 2020. Define os critérios e os procedimentos extraordinários e temporários para a fabricação e comercialização de preparações antissépticas ou sanitizantes oficinais sem prévia autorização da Anvisa e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 20 mar 2020. Seção 1(55):154-5.
21. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 422, de 16 de setembro de 2020. Altera a Resolução de Diretoria Colegiada – RDC nº 350, de 19 de março de 2020, que define os critérios e os procedimentos extraordinários e temporários para a fabricação e comercialização de preparações antissépticas. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 17 set 2020. Seção 1 (179):133-4.
22. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 641, de 24 de março de 2022. Define os critérios e os procedimentos extraordinários e temporários para a fabricação e comercialização de preparações antissépticas ou sanitizantes oficinais sem prévia autorização da Anvisa e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 30 mar 2022. Seção 1(61):308.
23. Macario L, Teston APM, Chierrito D, Romanichen FMDF, Araújo DCM. Determinação do teor alcoólico e da eficácia antimicrobiana de diferentes marcas de álcool 70% INPM. Conjecturas. 2021;(5):23-35.
<https://doi.org/10.53660/CONJ-221-706>
24. Rodrigues SK, Grossel LA, Fritsch M, Munhoz ACM. Análise físico-química e da eficácia microbiológica de álcool em gel comercializados em farmácias de Mafra (Santa Catarina). Saúde Meio Ambient. 2022;(11):99-113.
<https://doi.org/10.24302/sma.v11.3537>
25. Governo do Estado do Ceará. Secretaria da Segurança Pública e Defesa Social. Perícia Forense do Estado do Ceará (PEFOCE). Após um ano de pandemia, Pefoce segue identificando substâncias ineficazes contra o vírus e tóxicas à saúde. [acesso 2023 Jun 07]. Disponível em:
<https://www.pefoce.ce.gov.br/2021/04/20/apos-um-ano-de-pandemia-pefoce-segue-identificando-substancias-ineficazes-contr-o-virus-e-toxicas-a-saude/>
26. Brasil. Atos do Poder Legislativo. Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1990. Dispõe sobre a proteção do consumidor e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 12 Set 1990. Seção 1(Suplemento ao Nº 176):1-8.



Irregularidades registradas durante inspeções sanitárias em restaurantes e similares

Irregularities recorded during sanitary inspections in restaurants and similar

Patrícia Vitória Olmedo^{1,2} , Caroline Opolski Medeiros^{2,3} , Sila Mary Rodrigues Ferreira^{2,3} , Lize Stangarlin-Fiori^{2,3*} 

¹ Secretaria Municipal da Saúde, Vigilância Sanitária, Distrito Sanitário Bairro Novo, Curitiba, Paraná, Brasil.

² Programa de Pós-Graduação em Alimentação e Nutrição, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

³ Departamento de Nutrição, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

* Autor de correspondência/Corresponding author: lize.stangarlin@ufpr.br

Recebido/Received: 09.03.2023 – Aceito/Accepted: 18.07.2023

RESUMO

Identificar irregularidades em restaurantes pode auxiliar a minimizar riscos de contaminação. O objetivo desse estudo foi analisar as irregularidades registradas em inspeções sanitárias de restaurantes e similares em Curitiba, Brasil, entre 2005 a 2017. A descrição das irregularidades foi organizada seguindo as categorias e os itens da legislação de Boas Práticas (BP) para serviços de alimentação do Brasil e as cinco chaves para uma alimentação mais segura, definidas pela Organização Mundial da Saúde. Do total de 4.098 registros, houve a descrição de 8.327 irregularidades. Em relação às BP, houve a prevalência da descrição de irregularidades nos anos de 2005, 2006 e 2013, e das categorias: edificações, instalações, equipamentos, móveis e utensílios (42,80%); preparação do alimento (11,54%); documentação e registro (9,92%) e matéria-prima, ingredientes e embalagens (9,06%). Em relação às cinco chaves para uma alimentação mais segura, apenas 3.209 (38,53%) descrições correspondiam a esse tema, com destaque a: manter a limpeza (40,70%) e usar água e matérias-primas seguras (34,71%). Houve uma tendência decrescente na descrição das irregularidades no período estudado, porém ainda é um desafio implementar as BP em restaurantes e similares no Brasil, o que pode favorecer a ocorrência de doenças e aumentar o risco à saúde da população.

Palavras-chave. Inocuidade dos Alimentos, Boas Práticas de Manipulação, Higiene dos Alimentos, Restaurantes, Inspeção dos Alimentos, Qualidade dos Alimentos.

ABSTRACT

Identifying irregularities in restaurants can help minimize contamination risks. The objective of this study was to analyze the irregularities recorded in sanitary inspections of restaurants and similar establishments in Curitiba, Brazil, between 2005 and 2017. The description of the irregularities was categorized following the items and criteria outlined in the Good Practices (GP) legislation for food services of Brazil and the Five Keys to Safer Food, defined by the World Health Organization. Out of the total of 4,098 records, 8,327 irregularities were documented. Concerning GP, there was a prevalence of irregularities described in the years 2005, 2006 and 2013, mainly in the following categories: buildings, installations, equipment, furniture and utensils (42.80%); food preparation (11.54%); documentation and registration (9.92%) and raw materials, ingredients and packaging (9.06%). Regarding the Five Keys to Safer Food, only 3,209 (38.53%) corresponded to this theme, with particular emphasis on maintaining cleanliness (40.70%) and using safe water and raw materials (34.71%). The study observed a declining trend in the description of irregularities over the study period. However, the successful implementation of GP in restaurants and similar establishments in Brazil remains a challenge, potentially favoring the occurrence of foodborne diseases and increasing the risk to public health.

Keywords. Food Safety, Good Manipulation Practices, Food Hygiene, Restaurants, Food Inspection, Food Quality.

INTRODUÇÃO

As transformações decorrentes do desenvolvimento do sistema agroalimentar, da globalização e da urbanização crescente, determinaram um novo modo de viver, que impôs diferentes padrões de consumo, o que contribuiu com o aumento do número de serviços de alimentação, como restaurantes e similares e, com o aumento dos gastos com a alimentação fora do lar. Dados estimam que restaurantes norte-americanos venderam US\$ 863 bilhões no ano de 2019, o que representa um gasto médio de 51% com alimentação fora de casa pela população¹. Enquanto no Brasil, os últimos dados oficiais indicaram que as despesas com alimentação fora do lar chegaram a 32,8% em 2019, representando um terço dos gastos com alimentação².

Diante do crescimento do número de estabelecimentos de serviços de alimentação, cresceu também a preocupação acerca dos riscos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA)³. De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde, cerca de 600 milhões de pessoas no mundo são acometidas por DTHA (1 em cada 10) após consumirem alimentos contaminados a cada ano, resultando na morte de 420.000 pessoas⁴. No Brasil, esses dados também são elevados, sendo registradas 6.347 notificações de surtos alimentares no período de 2012 a 2021, totalizando 610.684 pessoas expostas, 104.839 doentes e 89 óbitos. Desse total, 15,1% das notificações foram registradas em restaurantes e similares, sendo considerado o segundo local de maior ocorrência dos surtos de DTHA⁵.

Apesar do elevado número de DTHA no Brasil e no mundo, essas doenças poderiam ser evitadas em restaurantes e similares, se fossem implementadas ferramentas de segurança dos alimentos, dentre elas, as Boas Práticas (BP)⁶. As BP são consideradas um programa de segurança dos alimentos que estabelece os requisitos a serem aplicados nas etapas de manipulação dos alimentos, com o intuito de padronizar procedimentos e melhorar seus critérios higiênicos-sanitários⁷. O programa é de implementação obrigatória em serviços de alimentação no Brasil, sendo exigido por meio de legislações vigentes publicadas em nível nacional pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), e em nível estadual e municipal pela Vigilância Sanitária (VISA)⁶.

A VISA tem como objetivo proteger a saúde da população, por meio de ações que previnam os riscos relacionados a toda cadeia de produção dos alimentos, inclusive fiscalizar os restaurantes e similares quanto à implementação das BP^{8,9}. As equipes de VISA realizam inspeções sanitárias para avaliar os locais quanto à estrutura, condições higiênico-sanitárias, fluxos de produção, rotinas técnico-operacionais e documentos, para verificar se os produtos e serviços prestados estão em conformidade com as normas e as legislações sanitárias vigentes⁹. Como parte do processo de trabalho, as irregularidades e medidas adotadas durante as inspeções são registradas em sistemas de informação próprios de cada município⁷.

Também como parte de uma estratégia global para diminuir a incidência de DTHA, a Organização Mundial da Saúde publicou em 2006, o manual das “cinco chaves para uma alimentação mais segura”, no qual estabeleceu os critérios de maior risco sanitário durante a manipulação de alimento¹⁰. Esses critérios, apesar de não serem específicos para serviços de alimentação, servem como base para os procedimentos a serem priorizados durante as etapas de preparação, e recentemente, começaram a ser incluídos nas inspeções sanitárias em restaurantes e similares^{10,11}.

Apesar dos critérios de BP e de maior risco sanitário durante a manipulação de alimentos já estarem bastante consolidados em documentos nacionais e internacionais¹⁰⁻¹², estudos demonstraram que os restaurantes e similares ainda apresentam dificuldades na sua aplicação^{6,7,13}. Além disso, não existe a obrigatoriedade de profissionais da área de alimentos como responsáveis técnicos nesse segmento, como

o Nutricionista, o que poderia auxiliar nesse processo, bem como não há uma padronização em relação à exigência desses critérios durante as inspeções sanitárias em serviços de alimentação^{9,14}, o que dificulta ainda mais a sua implantação nesse segmento.

Assim, esse estudo teve como objetivo analisar as irregularidades registradas durante as inspeções sanitárias em restaurantes e similares, de acordo com as BP e as “cinco chaves para uma alimentação mais segura”.

MATERIAL E MÉTODOS

Tipo de estudo e comitê de ética

Esse estudo, caracterizado como quantitativo, longitudinal, retrospectivo e analítico, foi desenvolvido a partir do levantamento das irregularidades encontradas em inspeções sanitárias realizadas em restaurantes e similares, registradas no Sistema de Informação da Vigilância Sanitária e Ambiental do município, denominado “e-saúde”, de acesso exclusivo aos servidores da Secretaria de Saúde do município de Curitiba, Paraná, Brasil. De acordo com a Classificação Nacional de Atividades Econômicas (CNAE)¹⁵, o ramo de atividade “restaurantes e similares”, classificado na subclasse nº 5611-02/01, compreende “todas as atividades de vender e servir comida preparada, com ou sem bebidas alcóolicas ao público geral, com serviço completo”. Nesse grupo estão inseridos 15 tipos de estabelecimentos, entre eles: churrascarias, pizzarias, trattorias, restaurante a quilo, rotisseria, *self service*, entre outros.

O acesso aos dados foi permitido após aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde de Curitiba (protocolo nº 60/2015). A pesquisa também foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Paraná (UFPR) (CAAE: 45138215.3.0000.0102), seguindo todos os preceitos éticos.

Amostra do estudo

Para determinação da amostra foram estabelecidos como critérios de inclusão, os registros das inspeções sanitárias realizados no período de 1º de janeiro de 2005 a 31 de dezembro de 2017, em estabelecimentos ativos, classificados como “restaurantes e similares” de acordo com a Classificação Nacional de Atividades Econômicas¹⁵, nos quais constavam irregularidades descritas. Esse período foi determinado em decorrência da vigência da legislação nacional de BP para serviços de alimentação no Brasil¹².

Com base nesses critérios, a amostra final foi de 4.098 registros preenchidos com irregularidades.

Análise da descrição das irregularidades

Para identificar as irregularidades de BP registradas nos restaurantes e similares, a descrição foi organizada seguindo as categorias e os itens da ANVISA RDC nº 216/2004 – legislação nacional de BP para serviços de alimentação no Brasil¹².

Em relação às “cinco chaves para uma alimentação mais segura” da OMS, as descrições das irregularidades registradas durante as inspeções sanitárias, foram agrupadas em cinco grandes categorias: 1) manter a limpeza; 2) separar alimentos crus de cozidos; 3) cozinhar bem os alimentos; 4) manter os alimentos a temperaturas seguras; 5) usar água e matérias-primas seguras¹⁰.

Análise estatística

Os dados tabulados por dupla digitação foram analisados por meio de estatística descritiva, com o auxílio do cálculo da taxa de variação geométrica, para padronizar as discrepâncias numéricas entre os anos e os tipos de irregularidades¹⁶. Para analisar o comportamento das irregularidades ao longo dos anos, foram utilizadas medidas de associação, regressão linear e ANOVA. Para avaliar a relação entre as variáveis estudadas, foram realizados testes binomiais, todos com significância de $p < 0,05$ (95%), utilizando o Software SAS® (*Statistical Analysis System*), versão 9.6.

RESULTADOS

Análise da descrição das irregularidades de acordo com as Boas Práticas

Do total de 4.098 registros analisados, verificou-se a descrição de 8.327 irregularidades em restaurantes e similares, quanto aos requisitos de BP (**Tabela 1**). Esse resultado representou uma média de 2,03 irregularidades descritas por registro, ao longo do período estudado, e média geral de 640,54 irregularidades descritas, por ano.

Houve a prevalência na descrição de irregularidades da categoria de edificações, instalações, equipamentos, móveis e utensílios (42,80%); seguida da categoria preparação do alimento (11,54%); documentação e registro (9,92%); e da categoria de matérias-primas, ingredientes e embalagens (9,06%). Por outro lado, com menor descrição de irregularidades estavam as categorias de armazenamento e transporte do alimento preparado (0,16%); de responsabilidade (1,27%); e a categoria outros (1,80%) (**Tabela 1**). A categoria “outros” diz respeito a itens que não têm relação com a RDC 216/2004 como, por exemplo, ausência de Alvará, e de Projeto Arquitetônico.

Os anos em que houve maior descrição de irregularidades no sistema foram: 2005 (12,41%), 2006 (11,14%) e 2013 (11,26%). Já os que apresentaram menos descrições foram: 2014 (5,22%), 2016 (4,73%) e 2017 (5,32%) (**Tabela 1**).

As principais irregularidades descritas na categoria edificações, instalações, equipamentos, móveis e utensílios foram referentes aos revestimentos de pisos, paredes e tetos (13,68%), ausência de telas em portas e janelas (13,48%), ausência de manutenção de equipamentos (10,90%) e material inadequado de superfícies de equipamentos, móveis e utensílios (10,82%). O item relacionado ao dimensionamento de caixa de gordura e esgotamento sanitário foi o que apresentou o menor número de descrições de irregularidades (0,50%).

Na categoria preparação do alimento, as principais irregularidades descritas foram referentes aos alimentos preparados e armazenados sob refrigeração ou congelamento sem a devida identificação (32,04%); ausência de identificação nas matérias-primas e ingredientes utilizados no processo de produção do alimento (9,05%); e contato direto entre alimentos crus, semipreparados e prontos para consumo (contaminação cruzada) (6,03%). O item ausência de higienização de embalagens primárias de matérias-primas e ingredientes antes de iniciar a preparação (0,10%) foi o que se apresentou com menor descrição de irregularidade nessa categoria.

Com relação à categoria documentação e registro, as principais irregularidades descritas foram ausência de Manual de Boas Práticas (80,38%), ausência dos Procedimentos Operacionais Padronizados (POP) (10,77%) e falta de registros de controle de qualidade nos estabelecimentos (4,84%).

Tabela 1. Frequência e porcentagem de irregularidades registradas pela vigilância sanitária do município de Curitiba – PR, durante as inspeções realizadas no período de 2005 a 2017, em restaurantes e similares de Curitiba, Brasil, 2017

Ano	Número de Registros com irregularidade	Número de irregularidades por Categorias ^a													Total ^b	%
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Outros		
2005	291	514	48	29	38	28	45	131	71	3	13	34	15	64	1033	12,41
2006	305	431	45	28	20	18	63	136	73	2	2	34	42	34	928	11,14
2007	303	257	11	24	26	29	67	53	62	0	17	39	4	11	600	7,21
2008	299	214	30	29	14	8	27	64	56	2	10	119	10	9	592	7,11
2009	302	349	41	16	23	33	45	60	76	0	13	49	0	0	705	8,47
2010	319	280	28	29	23	9	22	42	47	1	14	99	8	9	611	7,34
2011	327	283	50	16	18	27	46	58	66	0	31	46	0	0	641	7,70
2012	317	245	17	9	13	20	31	38	76	0	30	40	0	0	519	6,23
2013	332	391	33	33	38	36	91	41	161	2	39	73	0	0	938	11,26
2014	298	169	22	12	20	6	29	33	81	1	19	43	0	0	435	5,22
2015	286	184	29	15	20	10	34	24	98	2	31	41	0	0	488	5,86
2016	360	112	22	8	7	11	21	27	47	0	20	99	11	9	394	4,73
2017	359	137	7	13	9	14	8	48	47	0	20	110	16	14	443	5,32
Total	4098	3566	383	261	269	249	529	755	961	13	259	826	106	150	8327	100,00
	%	42,80	4,60	3,13	3,23	3,00	6,35	9,06	11,54	0,16	3,11	9,92	1,27	1,80	100,00	
Tendência (R²)	0,3054	0,5394	0,2147	0,377	0,1914	0,066	0,1158	0,5665	0,0795	0,0803	0,2868	0,057	0,055	0	0,4409	
Significância do modelo (p)	0,0292	0,0026	0,0629	0,0151	0,0758	0,2009	0,1371	0,0018	0,7399	0,1802	0,0344	0,2143	0,2174	0	0,0079	

^a 1 – Edificação, instalações, equipamentos, móveis e utensílios; 2 – Higienização de edificações, instalações, móveis e utensílios; 3 – Controle integrado de vetores e pragas urbanas; 4 – Abastecimento de água; 5 – Manejo de resíduos; 6 – Manipuladores; 7 – Matérias-primas, ingredientes e embalagens; 8 – Preparação do alimento; 9 – Armazenamento e transporte do alimento preparado; 10 – Exposição ao consumo do alimento preparado; 11 – Documentação e registro; e 12 – Responsabilidade

^b Número total de irregularidades descritas por ano, por categoria

Na categoria matérias-primas, ingredientes e embalagens, as irregularidades mais descritas foram: falta de procedimento quanto às matérias-primas, ingredientes ou embalagens reprovadas ou com prazos de validade vencidos (42,25%) e o armazenamento inadequado dos alimentos (34,70%). O item recepção das matérias-primas (3,17%) foi o que apresentou menor número de descrições de irregularidade.

As análises estatísticas demonstraram a tendência decrescente na descrição de irregularidades ao longo dos anos, tanto na análise geral ($R^2 = 0,4409$ e $p = 0,0079$), como nas categorias de edificações, instalações, equipamentos, móveis e utensílios ($R^2 = 0,5394$ e $p = 0,0026$), controle integrado de vetores e pragas urbanas ($R^2 = 0,3770$ e $p = 0,0151$) e matérias-primas, ingredientes e embalagens ($R^2 = 0,5665$ e $p = 0,0018$) (Figura 1). Em contrapartida, houve uma tendência crescente, ao longo dos anos, na descrição das irregularidades na categoria exposição ao consumo do alimento preparado ($R^2 = 0,2868$ e $p = 0,0344$) (Figura 1).

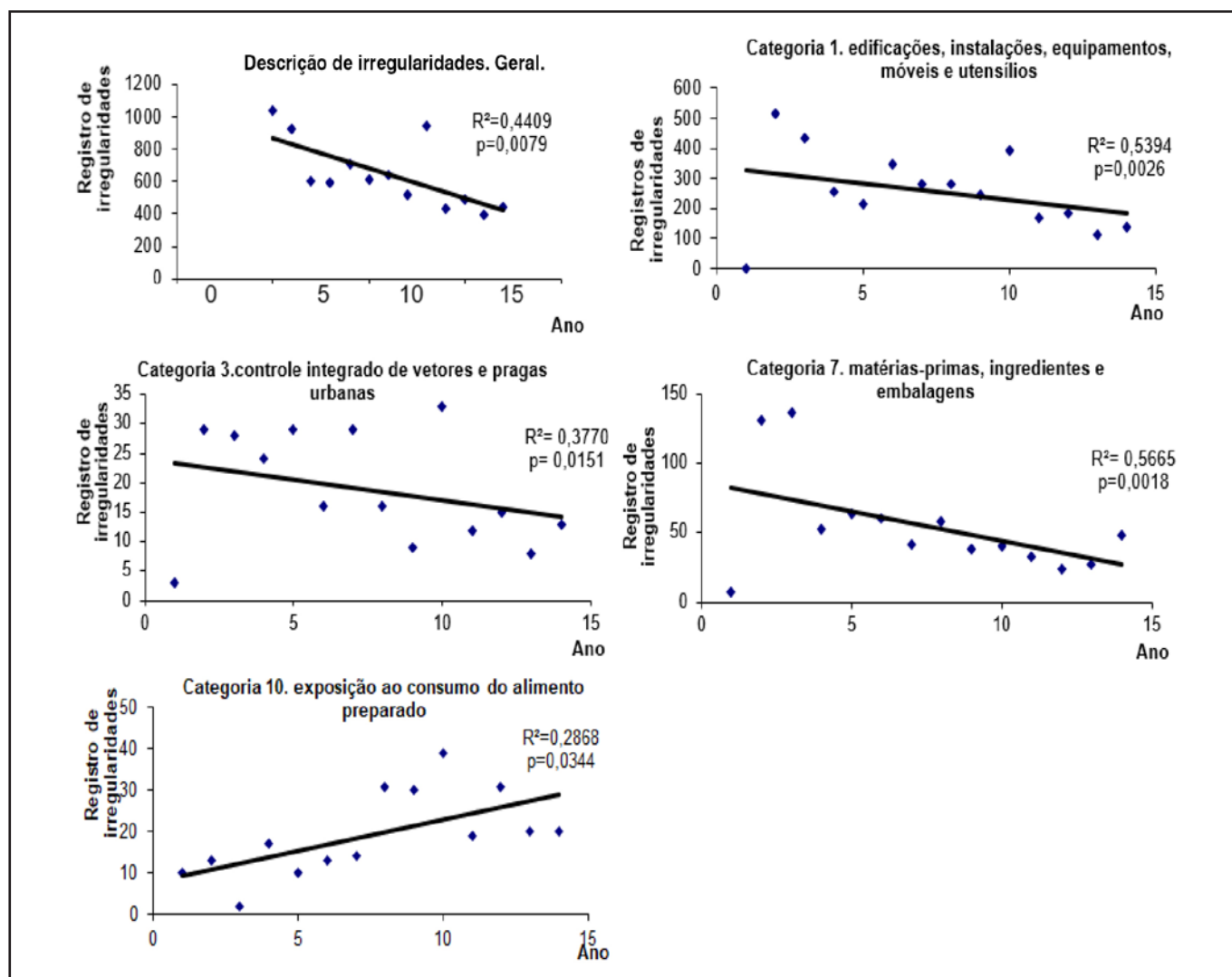


Figura 1. Tendência da descrição de irregularidades registradas pela vigilância sanitária durante as inspeções realizadas no período de 2005 a 2017, em restaurantes e similares, no geral e nas categorias de: edificações, instalações, equipamentos, móveis e utensílios; controle integrado de vetores e pragas urbanas; matérias-primas, ingredientes e embalagens; e exposição ao consumo do alimento preparado

Análise da descrição das irregularidades referente às “cinco chaves para uma alimentação mais segura”

Do total de 8.327 descrições de irregularidades observadas no período estudado, apenas 3.209 (38,53%) estavam relacionadas aos critérios de maior risco sanitário estabelecidos pelas “cinco chaves para uma alimentação mais segura”. Desses critérios, os que apresentaram a maior frequência de ocorrência foram: manter a limpeza (40,70%) e usar água e matérias-primas seguras (34,71%), enquanto cozinhar bem os alimentos obteve a menor frequência de ocorrência (1,28%) (**Tabela 2**).

Tabela 2. Distribuição da descrição das irregularidades registradas pela vigilância sanitária do município de Curitiba – PR, durante as inspeções realizadas no período de 2005 a 2017, em restaurantes e similares, conforme as “cinco chaves para uma alimentação mais segura”. Curitiba, Brasil, 2017

Ano	Número total de registros	Número total de irregularidades	Número de irregularidades por Chaves ^a						
			1	2	3	4	5	Total ^b	%
2005	291	1033	115	16	0	44	172	357	11,12
2006	305	928	101	14	0	46	166	326	10,16
2007	303	600	116	34	1	25	79	255	7,95
2008	299	592	83	14	2	22	95	216	6,73
2009	302	705	120	43	0	21	80	266	8,29
2010	319	611	89	9	0	22	81	201	6,26
2011	327	641	134	48	0	12	76	270	8,41
2012	317	519	92	40	3	20	52	207	6,45
2013	332	938	186	93	16	38	79	412	12,84
2014	298	435	68	37	4	28	57	194	6,05
2015	286	488	98	49	7	26	47	227	7,07
2016	360	394	50	14	1	12	54	131	4,08
2017	359	443	54	5	7	16	76	158	4,92
TOTAL	4098	8327	1306	416	41	332	1114	3209	100,00
%		40,70	12,96	1,28	10,35	34,71			
Tendência (R²)	0,4409	0,04925	0,0585	0,2031	0,2413	0,5428			
Significância do modelo (p)	0,0079	0,22911	0,57353	0,069	0,0505	0,0024			

^aChaves: 1 – Manter a limpeza; 2 – Separar alimentos crus de cozidos; 3 – Cozinhar bem os alimentos; 4 – Manter os alimentos a temperaturas seguras; 5 – Usar água e matérias-primas seguras

^bNúmero total de irregularidades descritas por chave, por ano

As principais irregularidades descritas nos registros de inspeção em relação à chave manter a limpeza foram: presença de vetores e pragas urbanas (16,12%); ausência de coletores de resíduos nas áreas de preparação e armazenamento de alimentos com tampa acionada sem contato manual (14,66%);

ausência de supervisão e capacitação dos manipuladores dos alimentos (13,28%); e número insuficiente, uso incorreto, mau estado de conservação e limpeza e armazenamento inadequado dos utensílios e equipamentos utilizados na higienização (12,74%).

Na chave referente a usar água e matérias-primas seguras, as principais irregularidades foram: armazenamento inadequado dos alimentos; ausência de identificação das matérias-primas, ingredientes e embalagens; matérias-primas e ingredientes utilizados em desacordo com o seu respectivo prazo de validade (39,86%); e inadequado estado de conservação do reservatório de água (21,90%).

Os anos em que mais houve descrições de irregularidades conforme critérios das “cinco chaves para uma alimentação mais segura”, foram, respectivamente, 2005 (11,12%), 2006 (10,16%) e 2013 (12,84%). Já com menor descrição de irregularidades foram 2014 (6,05%), 2016 (4,08%) e 2017 (4,92%) (**Tabela 2**).

As análises estatísticas demonstraram existir apenas uma tendência decrescente na descrição das irregularidades em relação à chave usar água e matérias-primas seguras, ao longo dos anos (**Figura 2**).

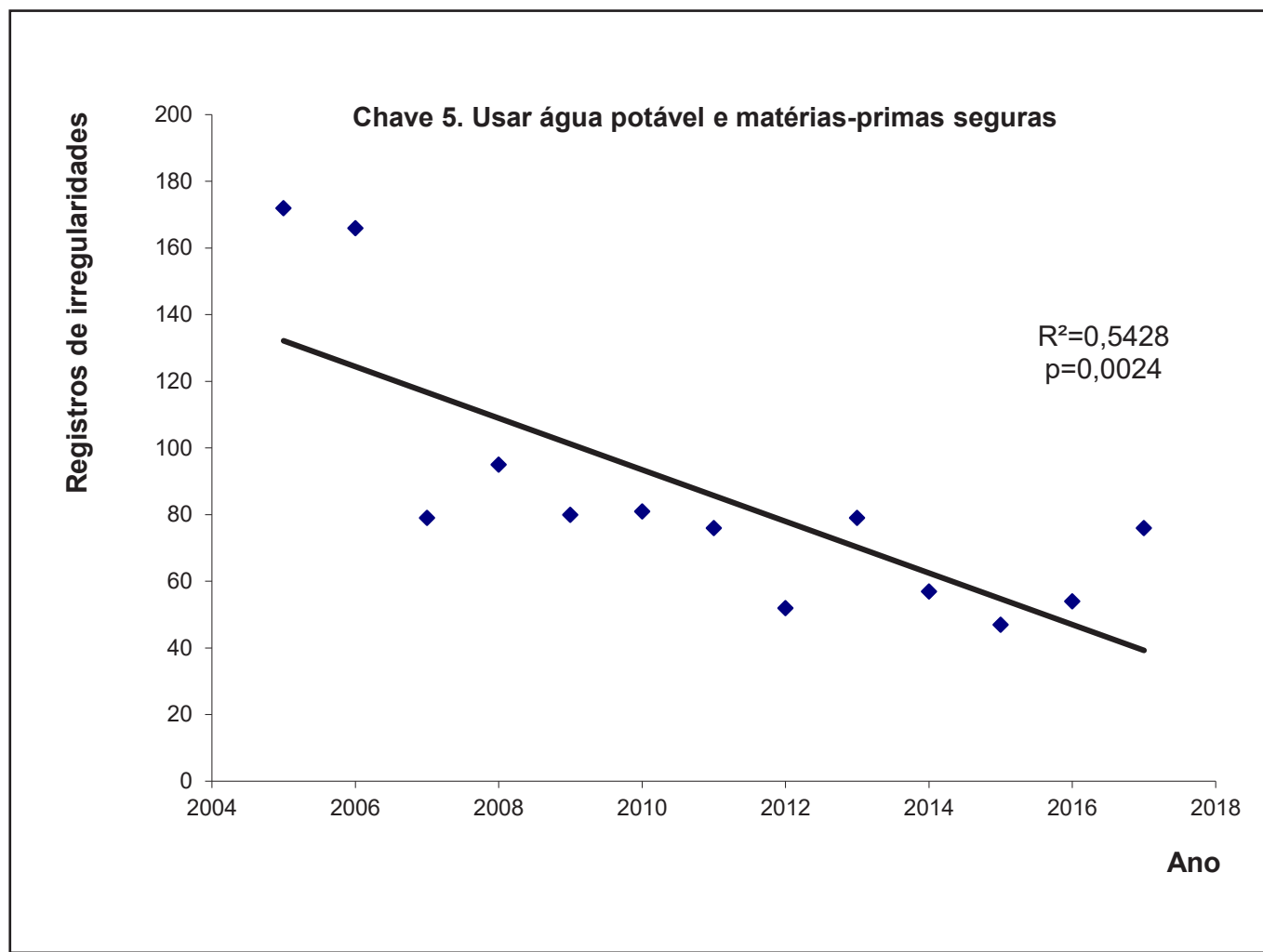


Figura 2. Tendência decrescente da descrição de irregularidades registradas pela vigilância sanitária do município de Curitiba – PR, durante as inspeções realizadas no período de 2005 a 2017, em restaurantes e similares, conforme a chave 5 usar água e matérias-primas seguras

DISCUSSÃO

Os registros das inspeções sanitárias realizados em restaurantes e similares demonstraram haver mais de uma descrição de irregularidades em cada local. Esses resultados são compatíveis com estudos realizados em restaurantes e similares no Brasil^{3,6,13}, e revelam que mesmo com legislação específica para o segmento e órgãos fiscalizadores que determinam e orientam os requisitos de BP, ainda é um desafio implementar e manter esse programa em restaurantes e similares no país.

Essa dificuldade na implementação das BP também foi evidenciada em países como Estados Unidos, Finlândia, Arábia Saudita e República Tcheca¹⁷⁻¹⁹. Sendo que, os principais fatores que interferem na aplicação do programa, tanto no Brasil como em outros países, são a falta de recursos financeiros^{13,17}; desconhecimento dos manipuladores de alimentos e dos responsáveis pelos estabelecimentos sobre os riscos relacionados a segurança dos alimentos^{7,20,21}; a falta de experiência na área de alimentos^{13,22} e de motivação dos indivíduos envolvidos na segurança sanitária dos alimentos^{13,22}. Nesse sentido, seria importante a presença do Nutricionista nesses locais. A área de controle de qualidade, no qual está inserido a implementação das BP, é uma atribuição desses profissionais no Brasil¹⁸. Assim, eles têm o papel essencial nesse processo, pois auxiliam a empresa a estabelecer uma abordagem sistemática do controle dos contaminantes alimentares, proporcionando mudanças significativas na rotina de trabalho, por meio de controle e melhoria das etapas do processo, e da padronização dos procedimentos de BP²³.

Além disso, pesquisas relacionam a ausência de adequação das BP em restaurantes e similares com falhas durante as inspeções sanitárias, em função da ausência de padronização das ações e das diferentes medidas e tomadas de decisões dos fiscais frente aos riscos encontrados⁹.

Portanto, a implementação do programa de BP em restaurantes e similares requer, além do investimento para as melhorias necessárias, o conhecimento e o comprometimento dos gestores e manipuladores de alimentos. Esse processo deve ser viabilizado por meio da divulgação de informações e capacitações na empresa, a fim de promover maior motivação de todos os envolvidos na manipulação dos alimentos. A importância da fiscalização e orientação por parte dos órgãos oficiais também deve ser ressaltada, pois desempenham um papel fundamental na priorização das exigências sanitárias legais^{9,11,24}.

Isso foi observado em estudo realizado por Kaskela et al¹⁷ e Dardin et al²⁵, nos quais verificaram que os itens de BP com maior adequação eram aqueles exigidos pelos órgãos oficiais nas visitas de inspeções. Esses resultados reforçam a importância das ações dessas agências, cuja finalidade principal é orientar, monitorar e licenciar os estabelecimentos que manipulam, produzem, comercializam, distribuem e/ou armazenam alimentos^{8,9,24}. Contudo, vale ressaltar que, para garantir que os mesmos requisitos de BP sejam efetivamente aplicados nos restaurantes e similares, os órgãos oficiais devem ter critérios estabelecidos e padronizar suas ações durante as fiscalizações sanitárias^{9,11,25}.

Com relação às irregularidades mais descritas, houve destaque para a categoria edificações, instalações, equipamentos, móveis e utensílios, o que indica a necessidade de melhorias em relação aos aspectos estruturais dos estabelecimentos. Vale ressaltar que uma infraestrutura adequada é essencial para o correto andamento do serviço, e um importante determinante das práticas de segurança dos alimentos em restaurantes e similares²⁶.

Entretanto, a aquisição/substituição de novos equipamentos e a manutenção preventiva de instalações e equipamentos são problemas recorrentes nesse setor¹³. Isso pode estar relacionado à ausência

de verificação das necessidades de melhoria das instalações, equipamentos, mobiliários e utensílios; falta de compreensão sobre a importância da sua manutenção adequada, uma vez que podem causar contaminação cruzada; e falta de investimentos financeiros e tecnológicos, no qual muitas vezes as empresas não têm ou não priorizam o recurso para essa finalidade^{13,20}.

A prevalência dos registros de irregularidades dessa categoria também pode ocorrer pela facilidade dos inspetores em verificar esses itens, pois além de não demandar muito tempo de observação, a maioria das inspeções sanitárias considera a estrutura física como requisito inicial para avaliação das BP⁹⁻¹¹. Contudo, a tendência decrescente na descrição de irregularidades dessa categoria, evidenciadas nesse estudo, indicam uma mudança no olhar das equipes de inspeção a respeito do levantamento de riscos nos restaurantes e similares. Segundo Kaskela et al¹⁷, quanto maior a percepção de risco dos indivíduos, menor é a probabilidade das pessoas relacionarem o risco com questões estruturais, mas com situações que envolvem a contaminação, a conservação e a manipulação dos alimentos.

A categoria de documentação e registro também apresentou elevado número de irregularidades, principalmente pela ausência de registros dos controles realizados durante as etapas e preparação dos alimentos. Esse resultado sugere que os gestores dos restaurantes e similares não priorizam esses requisitos, seja por dificuldade na elaboração e/ou aplicação desses documentos ou pela sobrecarga de trabalho, o que faz com que eles negligenciem critérios relacionados à higiene, pois os profissionais sobrecarregados acabam executando outras atividades que possam ter maior prioridade^{25,27}.

Contudo, a ausência na adequação da categoria de documentação e registro, pode prejudicar as condutas adotadas na empresa em relação à implementação das BP, pois os documentos auxiliam na padronização dos processos de trabalho, na avaliação do desempenho e orientação dos funcionários para a correta execução das tarefas e o histórico dos procedimentos realizados^{9,17,20}.

Destaca-se ainda o elevado número de descrições de irregularidades nas categorias de preparação dos alimentos e matérias-primas, ingredientes e embalagens, referentes às BP, e as de manter a limpeza (chave 1) e usar água e matérias-primas seguras (chave 5), pois são as categorias que, de fato, podem colocar os alimentos em situação mais próxima de vir a causar DTHA. Isso ocorre porque a maioria dos itens tem relação direta com os alimentos que estão sendo preparados e, portanto, quando ocorre violação destes, aumentam as chances de ocorrência de doenças causada pelo consumo de alimentos contaminados^{23,24,26}.

Nesse sentido, pensando nos itens que deveriam ser priorizados em restaurantes e similares, levando em consideração o seu risco para o alimento quando as violações favorecem a contaminação direta, multiplicação e sobrevivência de microrganismos e do número de irregularidades que apresentaram ao longo dos anos do estudo, destacam-se: a identificação das matérias-primas e dos alimentos armazenados sob temperatura controlada; a separação entre os alimentos crus dos prontos para o consumo; a elaboração de protocolos para produtos reprovados ou com prazos de validade vencidos; o armazenamento adequado dos alimentos; medidas para o combate de vetores e pragas urbanas; presença de coletores com tampa acionadas sem contato manual no preparo e armazenamento de alimentos; capacitação para os manipuladores de alimentos; e melhoria dos utensílios utilizado na higienização e da conservação do reservatório de água.

Vale destacar que muitas dessas irregularidades não requerem grandes investimentos financeiros para adequação, mas de capacitações frequentes e supervisão^{3,13,20}. Portanto, ações e estratégias voltadas a esses requisitos devem ser implementadas nesses estabelecimentos, para que esses itens sejam efetivamente praticados por todos os envolvidos.

Em relação ao comportamento das irregularidades, evidenciou-se, no geral, uma tendência decrescente na descrição de irregularidades ao longo dos anos estudados. Contudo, essa diminuição não foi evidenciada nos itens da categoria de preparação dos alimentos referentes às BP, e as de manter a limpeza (chave 1), que tem um maior risco de causar doença. Esse resultado reforça a necessidade de melhorias e maior atenção quanto aos itens dessas categorias, tanto por parte dos estabelecimentos como dos órgãos legisladores oficiais.

Foi observado no estudo uma prevalência na descrição das irregularidades nos anos de 2005, 2006 e 2013, o que pode estar relacionado à publicação da legislação nacional de BP para serviços de alimentação no Brasil¹² e do Manual das “cinco chaves para uma alimentação mais segura” da organização Mundial da Saúde¹⁰, bem como ao ano de 2013, o período em que os restaurantes e similares passaram pelo processo de categorização para a Copa do Mundo no Brasil.

Esses dados demonstram que a implementação de novas legislações, bem como as cobranças de fiscalização, categorização, acompanhamento de estabelecimentos para a participação em grandes eventos e do registro constante dessas atividades nos sistemas de vigilância, podem gerar resultados mais efetivos quanto às irregularidades encontradas durante as inspeções nos restaurantes e similares. Além disso, reforça a importância do papel das autoridades sanitárias em gerar informações e subsídios para a tomada de decisões que venham proteger a saúde da população^{9,11,25}. Isso demonstra que a participação ativa dos órgãos fiscalizadores é vital para que os serviços de alimentação sigam as legislações e façam a gestão eficiente dos programas de qualidade^{9,24,25}.

Por fim, destaca-se que os resultados do estudo poderão ser utilizados por gestores das empresas, manipuladores de alimentos, fiscais e pelo governo, para nortear políticas públicas, e para auxiliar no planejamento de ações e processos que busquem minimizar os riscos de contaminação dos alimentos em restaurantes e similares, pois a partir da compreensão da realidade e necessidades desse segmento, é possível ter um ambiente de trabalho mais digno e a aplicação efetiva dos requisitos de BP.

CONCLUSÃO

O presente estudo revelou que ainda é um desafio implementar e manter as BP em restaurantes e similares no Brasil. As principais irregularidades registradas durante as inspeções sanitárias nesses estabelecimentos foram referentes às categorias de estrutura física e de documentação e registro, as quais impactam diretamente no adequado funcionamento da unidade, bem como na padronização, melhoria das condutas e correta execução das atividades e procedimentos da rotina.

Além disso, houve elevado número de irregularidades nas categorias de preparação dos alimentos e matérias-primas, ingredientes e embalagens, referentes às BP, e as de manter a limpeza (chave 1) e usar água e matérias-primas seguras (chave 5), onde a maioria dos itens tem relação direta com os alimentos que estão sendo preparados e, quando violados, aumentam as chances de ocorrência de DTHA. Vale destacar que as descrições de irregularidades das categorias de preparação dos alimentos e de manter a limpeza, continuaram aumentando ao longo dos anos, o que reforça a necessidade de maior atenção desses critérios, tanto por parte dos estabelecimentos como dos órgãos fiscalizadores.

Portanto, para garantir maior segurança dos alimentos comercializados em restaurantes e similares, é necessário, por parte dos proprietários/gestores dos estabelecimentos: investimentos financeiros,

conhecimento, treinamento frequente e supervisão. A presença de um Nutricionista também poderia auxiliar no processo, garantindo maior controle, padronização e melhoria das BP. Por fim, destaca-se a importância da participação ativa e processos padronizados de atuação dos órgãos fiscalizadores, para que as legislações sejam cumpridas e para que ocorra a gestão eficiente dos programas de qualidade nesses locais.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não existir conflitos de interesse.

FINANCIAMENTO

Não houve financiamento para a pesquisa.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem à Secretaria Municipal de Saúde de Curitiba, ao Centro de Saúde Ambiental e ao Distrito Sanitário do Bairro Novo, pela disponibilidade e acesso às informações e por todo apoio e suporte recebido durante o desenvolvimento do trabalho.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Patrícia Vitória Olmedo, Lize Stangarlin-Fiori contribuíram substancialmente para a concepção, planejamento, análise e interpretação dos dados. Caroline Opolski Medeiros e Sila Mary Rodrigues Ferreira contribuíram significativamente na elaboração do rascunho e na revisão crítica do conteúdo. Todos os autores participaram da aprovação da versão final do manuscrito.

REFERÊNCIAS

1. Kraak VI. The US chain restaurant industry must transform its business model to market healthy menu items to americans to reduce obesity and chornic disease risks. J Nutr. 2020;150(4):656-7.
<https://doi.org/10.1093/jn/nxaa041>
2. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Pesquisa de Orçamentos Familiares POF 2017-2018: evolução de indicadores não monetários de pobreza e qualidade de vida no Brasil. [acesso 2022 Mar 08]. Disponível em:
<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/sociais/protecao-social/24786-pesquisa-de-orcamentos-familiares-2.html?=&t=resultados>
3. Cunha DT. Improving food safety practices in the food service industry. Curr Opin Food Sci. 2021;42:127-33.
<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.05.010>
4. World Health Organization – WHO. Food Safety, 2020. [acesso 2022 Mar 27]. Disponível em:
<https://www.who.int/health-topics/food-safety>

5. Ministério da Saúde – MS. Surtos de doenças de transmissão hídrica alimentar no Brasil. Informe 2023. Disponível em:
<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/publicacoes/surtos-de-doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar-no-brasil-informe-2022/view>
6. Olmedo PV, Stangarlin-Fiori L, Medeiros CO, Tondo EC, Ferreira SMR. A profile of foodservices in Curitiba and a critical analysis of the results of sanitary inspections at these establishments. J Food Saf. 2018;38(1):e12377.
<https://doi.org/10.1111/jfs.12377>
7. Lima DP, Medeiros CO, Dardin FD, Stangarlin-Fiori L. Implementation of good hygiene practices in food trucks with and without the intervention of a food safety expert. J Food Saf. 2019;39:e12637.
<https://doi.org/10.1111/jfs.12637>
8. Marins BR, Araújo IS. Materiais educativos de vigilâncias sanitárias: perfil de produção e circulação no tema dos alimentos. Trabalho Educação e Saúde. 2016;14(1):137-54.
<http://dx.doi.org/10.1590/1981-7746-sip00090>
9. Olmedo PV, Fiori LS, Medeiros CO, Ferreira SMR. Perfil dos profissionais de vigilância sanitária da área de alimentos em uma capital brasileira. Vigil Sanit Debate. 2019;7(1):23-32.
<https://doi.org/10.22239/2317-269X.01144>
10. World Health Organization – WHO. Five keys to safe food manual. 2006. [acesso 2022 Mar 20]. Disponível em:
<https://www.who.int/publications/i/item/9789241594639>
11. Dardin FD, Stangarlin-Fiori L, Olmedo PV, Serafim AL, Medeiros CO. Elaboration and validation of a checklist for the evaluation of good hygiene practices in food trucks. Br Food J. 2019;121(10):2490-2507.
<https://doi.org/10.1108/BFJ-02-2019-0093>
12. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004. Dispõe sobre regulamento técnico de boas práticas para serviços de alimentação. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 16 set 2004. Seção 1(179):25-8.
13. Serafim AL, Stangarlin-Fiori L, Hecktheuer LHR. Good handling practices in food and beverage areas of hotels: evaluation of improvements achieved versus financial investments. J Food Saf. 2018;38(6):e12543.
<https://doi.org/10.1111/jfs.12543>
14. Kaskela J, Vainio A, Ollila S, Lundén J. Food business operators' opinions on disclosed food safety inspections and occurrence of disagreements with inspector grading. Food Control. 2019;105:248-55.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.06.005>

15. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Classificação Nacional de Atividades Econômicas (CNAE): versão 2.0: subclasses para uso na administração pública. Comissão Nacional de Classificação. Subcomissão Técnica para a CNAE – Subclasses; 2022. [acesso 2022 Mar 26]. Disponível em: <https://concla.ibge.gov.br/busca-online-cnae.html>
16. Lopes LFD, Müller I, Souza AM, Ansuji AP, Moraes DAO, Junior FJM et al. Caderno didático: estatística geral. Santa Maria: UFSM. 3.ed. 2008.
17. Kaskela J, Sund R, Lundén J. Efficacy of disclosed food safety inspections in restaurants. Food Control. 2021;123:107775. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107775>
18. Conselho Federal de Nutricionistas (CFN). Resolução Nº 600, de 25 de fevereiro de 2018. Dispõe sobre a definição das áreas de atuação do nutricionista e suas atribuições, indica parâmetros numéricos mínimos de referência, por área de atuação, para a efetividade dos serviços prestados à sociedade e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 20 abr 2018. Seção 1(76):157.
19. Bukhari MA, Banasser TM, El-Bali M, Bulkhi RA, Qamash RA, Trenganno A et al. Assessment of microbiological quality of food preparation process in some restaurants of Makkah city. Saudi J Biol Sci. 2021;28(10):5993-97. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.06.050>
20. Lee JH, Seo KH. An integrative review of hygiene practice studies in the food service sector. J Food Prot. 2020;83(12): 2147-57. <https://doi.org/10.4315/JFP-19-488>
21. Sha Y, Song X, Zhan J, Lu L, Zhang Q, Lu Y. Regional character, restaurant size, and food safety risk: evidence from food safety violation data in Gansu Province, China. J Food Prot. 2020;83(4):677-85. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-457>
22. DiPietro RB, Harris K, Jin D. Employed in the foodservice industry: likelihood of intervention with food safety threats. Int Hosp Rev. 2020;34(2):243-62. <https://doi.org/10.1108/IHR-07-2020-0021>
23. Cunha DT, Rosso VV, Stedefeldt E. Food safety performance and risk of food services from different natures and the role of nutritionist as food safety leader. Ciênc Saúde Colet. 2018;23(12):4033-42. <https://doi.org/10.1590/1413-812320182312.21042016>
24. Lundén J, Kosola M, Kiuru J, Kaskela J, Inkinen T. Disclosed restaurant inspection results on food safety show regional and local differences in Finland. Food Control. 2021;119:107462. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107462>

25. Dardin FD, Medeiros CO, Diz MN, Costa RL, Stangarlin-Fiori L. Evaluation of good hygiene practices in food trucks from the perspective of internal and external auditors. J Qual Assur Hosp Tour. 2020;22(2):143-62.
<https://doi.org/10.1080/1528008X.2020.1756023>
26. Cunha DT, Amorim ALB, Leite FHM, Stedefeldt E, Rosso VV, Bandoni DH. Dimensioning of the physical area and required number of food handlers for school food services. Rev Nutr. 2019;32:e180188.
<https://doi.org/10.1590/1678-9865201932e180188>
27. Harris K, Taylor S, DiPietro RB. Antecedents and outcomes of restaurant employees' food safety intervention behaviors. Int J Hosp Manag. 2021;94(4):102858.
<https://doi.org/10.1016/j.ijhm.2021.102858>





Factors interfering with the production of *Histoplasma capsulatum* antigens

Fatores que interferem na produção de antígenos de *Histoplasma capsulatum*

Roseli Santos de Freitas-Xavier^{1,2*} , Isabel Alves Feitosa Maciel³ , Vera Lúcia Teixeira de Freitas⁴ , Adriana Pardini Vicentini⁵ 

¹ Medical Mycology Laboratory, Institute of Tropical Medicine, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

² Disease Control Coordination, São Paulo State Health Department, Graduate Program in Science, São Paulo, SP, Brazil.

³ Laboratory of Dermatology and Immunodeficiencies, Dermatology Department, Institute of Tropical Medicine, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

⁴ Laboratory of Medical Investigation in Immunology, Institute of Tropical Medicine, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

⁵ Immunology Center, Adolfo Lutz Institute, São Paulo, SP, Brazil.

* Corresponding author/Autor de correspondência: r.freitas@hc.fm.usp.br

Received/Recebido: 06.04.2023 – Accepted/Aceito: 22.09.2023

ABSTRACT

Histoplasma capsulatum causes systemic mycosis that depends on host susceptibility, fungal virulence, and factors associated with the infectious process. We evaluated the possible interference of the phenotype of 12 samples of *H. capsulatum* isolated from HIV-positive and negative patients in obtaining antigens, aiming at the serological diagnosis through the gender-specific recognition of the H and M fractions. The antigens were evaluated by double immunodiffusion against *H. capsulatum* anti-antigen polyclonal antibody and serum samples from patients with histoplasmosis. The phenotypic evaluation revealed differences in the identification of the fungal agent and in the expression of H and M antigens, considered serological markers of the disease, associated with pigmentation and the production of conidia. It was found that antigenic preparations obtained from *H. capsulatum* isolated from HIV-positive patients may have satisfactory antigenic capacity. The patient's immune status does not seem to interfere with the expression of antigenic proteins secreted by *H. capsulatum*. However, we suggest that prolonged use of antiretrovirals drugs or steroids can cause important phenotypic alterations. We showed that some fungal samples from patients with a long history of immunosuppressive drugs produced atypical cellular elements and low reactivity against the H and M fractions.

Keywords. Histoplasma, Histoplasmosis, Phenotypic Variation, Antigens, Antiretroviral Therapy.

RESUMO

Histoplasma capsulatum causa micose sistêmica endêmica que depende da suscetibilidade do hospedeiro, da virulência fúngica e de fatores associados ao processo infeccioso. Avaliamos a possível interferência do fenótipo de 12 amostras de *H. capsulatum* isolados de pacientes HIV positivos e negativos na obtenção de antígenos, visando o diagnóstico sorológico por meio do reconhecimento gênero-específico das frações H e M. Os antígenos foram avaliados por imunodifusão dupla, frente a anticorpo policlonal anti-antígeno de *H. capsulatum* e frente a amostras de soro de pacientes com histoplasmose. A avaliação fenotípica revelou diferenças, não só na identificação do agente fúngico, mas também na expressão dos antígenos H e M, considerados marcadores sorológicos da doença, associados à pigmentação e produção de conídios. Verificou-se que preparações antigênicas obtidas de *H. capsulatum* isoladas de pacientes HIV positivos podem ter capacidade antigênica satisfatória. O estado imunológico do paciente parece não interferir na expressão de proteínas antigênicas secretadas por *H. capsulatum*. No entanto, sugerimos que o uso prolongado de antirretrovirais e/ou esteróides pode causar alterações fenotípicas importantes. Verificou-se que algumas amostras fúngicas isoladas de pacientes com longo histórico de uso de imunossupressores produziram elementos celulares atípicos e baixa reatividade sorológica contra as frações H e M de *H. capsulatum*.

Palavras-chave. Histoplasma, Histoplasmose, Variação Fenotípica, Antígenos, Terapia Antirretroviral.

INTRODUCTION

Histoplasma capsulatum, the etiologic agent of classical histoplasmosis (HP), is a widespread dimorphic fungus causing a mycosis that principally affects the lungs and other organs of the endothelial reticulum system^{1,2}. Sahaza et al³ reported that this mycosis has different clinical presentations depending on the host susceptibility, fungal virulence, and other factors associated with the infection process. HP is the most common systemic mycosis in North America, with an evident increase in the incidence of cases in the Americas. This is the first or second most prevalent mycosis in areas of Central and South America, causing progressive infections, particularly in individuals who are immunocompromised by hematologic malignancies, cytotoxic therapy, and especially among patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)^{1,2}. Disseminated HP affects up to a quarter of all HIV-1 patients. The majority of HP cases occur when HIV-positive individuals have CD4 T-cell counts < 100 cells/mm^{3,4}. In Brazil, there were cases of HP in all regions of the country⁵. Human infection results primarily from inhalation of aerosolized microconidia, the mold form of *H. capsulatum*, which transforms into the yeast form in the lungs⁶. The clinical spectrum of HP ranges from asymptomatic to severely disseminated forms of the disease¹. The majority of the exposed population has a mild self-limiting or subclinical form of infection¹; however, infants and immunocompromised individuals may contract acute symptomatic or progressive life-threatening disseminated forms^{1,5,7}. The definitive diagnosis of HP relies on the isolation of *H. capsulatum* by culture from clinical specimens^{8,9}.

Microscopic identification of yeast forms of fungi in clinical materials such as bone marrow, sputum, and tissue is usually difficult⁸. Isolation of *H. capsulatum* by culturing clinical specimens is a standard method of microbial identification; however, the isolation of *H. capsulatum* is costly and time-consuming^{1,2,9}. If a biopsy is possible and less harmful to the patient, Gomori-Grocot staining can assist in confirmatory diagnosis through the observation of intracellular *H. capsulatum* yeast cells^{1,8-11}. Many cases of HP have been serologically diagnosed^{2,8-11}. Antigens from mycelial-form cultures of *Histoplasma* species consistently appear to produce either H or M antigens or both and can be identified using the double immunodiffusion (DI) assay¹¹⁻¹³. Several molecular in-house assays have also been developed and presented encouraging results. Nonetheless, none of these assays are commercially available¹¹. In addition, these assays require standardization and validation processes¹¹. Antigen detection assays have high sensitivity in disseminated pulmonary HP cases and are of great value in the follow-up of patients with HP. A limitation of *Histoplasma* antigen testing is its significant cross-reactivity with other fungal antigens, including *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Penicillium marneffeii*, and, less commonly, *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii*. Although useful, antigen detection is expensive and is only performed in a few laboratories⁹⁻¹¹.

This study evaluated the genus-specific interference of antigenic products obtained from 12 different *H. capsulatum* isolates for recognition of H and M fractions through DI assay.

MATERIAL AND METHODS

H. capsulatum isolates

Twelve *H. capsulatum* samples, molecularly confirmed by Nested PCR using primers against *H. capsulatum* 18S rRNA (HC18S), 5.8S rRNA ITS (HC5.8S-ITS) and a 100 kDa protein (HC100)¹⁴, isolated

from different clinical specimens (bronchoalveolar lavage fluid, blood, cerebrospinal fluid, skin, bone marrow, and urine) from patients with HP co-infected with or without HIV were selected for this study. The isolates (**Table 1**) were maintained in the Culture Collection of the Mycology Laboratory of the Institute of Tropical Medicine of São Paulo (LIM-53) Brazil. These isolates were maintained in potato agar medium (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) at room temperature (27 °C), and sub-cultured every three months, in the mycelial form, respecting biosafety standards.

Phenotypic Analysis

Mycelial cells from *H. capsulatum* samples were cultured at 27 °C on Sabouraud dextrose agar (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) for 90 days to evaluate their macromorphological characteristics. The micromorphological aspects were analyzed according to Riddell¹⁵. Fungal samples were cultured at 27 °C in agar potato (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) for 45 days.

Preparation of *H. capsulatum* antigen

To prepare the antigen of each isolate of *H. capsulatum*, we employed the Kaufman and Standard's method¹², with certain modifications^{16,17}. The *Histoplasma* DI antigen (H50110) was used as a reference antigen (IMMY, Norman, OK, USA). Briefly, mycelial cells of all isolates were grown in solid Sabouraud-dextrose (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) medium at 27 °C during 15 and 33 days. Following the incubation period, the cultures were treated with an aqueous solution of thimerosal-borato 1:5,000 (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) and incubated at room temperature for 24 h. Afterward, the supernatants were filtered through Whatman® no. 1 paper (Whatman, Brentford, UK). The antigen solutions were concentrated 10- to 20-fold using a lyophilization procedure. After protein dosage using the Bradford method¹⁶, antigenic preparations were stored at -20 °C until use. The *Histoplasma* DI antigen (H50110) was used as a reference antigen (IMMY, Norman, OK, USA).

H. capsulatum polyclonal antibodies production

Anti-*H. capsulatum* sera were produced in New Zealand with female rabbits immunized subcutaneously with the *H. capsulatum* antigen (culture filtrate of VME, CFLA, and 879 *H. capsulatum* isolates) using the Mckinney and Parkinson¹⁸ method. We also used H and M *H. capsulatum* reference antisera (IMMY, Norman, OK, USA). The negative control antisera used was anti-*P. brasiliensis* and anti-*Aspergillus fumigatus*¹⁶.

Double immunodiffusion assay (DI)

The DI assay was performed according to Freitas et al^{16,17}.

RESULTS

H. capsulatum isolates

Fifty percent of *H. capsulatum* isolates were obtained from patients with AIDS and co-infected with *H. capsulatum*. In samples 49, 802, 879, and 2030, the anatomical site of infection was the kidneys. Half of

these patients had AIDS, and the other three had renal failure. Isolates 200 and 361 were obtained from immunocompetent individuals. Sample 268 was isolated from a patient without HIV/AIDS. This patient had chronic meningitis and intracranial hypertension, and was treated for 17 days with high doses of corticosteroids. Of the patients with AIDS, 66.7% presented with irregular use of antiretroviral treatment, while 33.3% reported abandonment or absence of antiretroviral treatment (**Table 1**). Antifungal treatment of HP with itraconazole occurred in 66.7% of patients, while 33.3% used liposomal amphotericin B. Four patients used liposomal amphotericin B (75%), and three of these patients died. Fifty percent (6) of the patients died, and of these, five cases were from patients with HIV/AIDS (**Table 1**).

Phenotypic analysis of *H. capsulatum* samples

The macromorphological aspects of *H. capsulatum* cultures revealed that 75% had a cottony texture, 25% were velutinous, and 83.3% had a membranous border. White pigmentation was observed in 58.3% of these cultures, whereas 41.7% demonstrated pigmentation ranging from beige to ocher. The central surface of the culture revealed areas of elevation and depression (33.3%) and protrusion (33.3%); however, a flat texture was observed in 50% of the median surface (**Table 2** and **Figure**). According to the methodology described by Ridell¹⁵, 91.7% of micromorphology from hyphae was typical, except for isolate 268, which presented thick hyphae and absence of conidia, which is unusual for this genus. This sample was isolated from the cerebrospinal fluid of a patient treated with high doses of corticosteroids (**Table 2** and **Figure**).

We observed the presence of a germ tube in isolates 299 and 584 (from HIV/AIDS patients). Seventy-five percent of these isolates had typical microconidia, except for isolates 212, 268, and 340. Macroconidia with a club-shaped ornamentation was observed in 75% of the isolates. Absent, smooth, and degenerate macroconidia occurred in isolates 212, 268, and 340, respectively. When relating colony pigmentation to conidia production, we found that isolates 200, 299, 361, and 406 expressed macroconidia with club-shaped ornamentation, pigmentation ranging from beige to ocher. Additionally, we observed microconidia and macroconidia with club-shaped ornamentation, except for isolate 340, which, despite having an ocher colony, did not produce conidia (**Table 2** and **Figure**). In contrast to certain atypical cultures from HIV/AIDS patients, the other cultures were found to be in intense sporulation, including the 879 sample, had undergone 13 years of maintenance in the LIM-53 Culture Collection (**Table 2** and **Figure**).

Double immunodiffusion analysis

Antigenic preparations obtained from 12 samples of *H. capsulatum* yielded improved results after they were concentrated 20 times. Analysis of the precipitation lines showed 100% specificity when evaluated against genus-specific antibodies¹⁴. Among the samples of *H. capsulatum* (49 and 2030) isolated from patients with HIV/AIDS, it was observed that isolates that presented typical morphology showed serological reactivity for polyclonal antibody anti-*H. capsulatum*, polyclonal antibody anti-fractions H and M, serum samples from patients with HP disease, and strong reactivity for patients with HP infection. Among the *H. capsulatum* samples (200, 406, 802, 879) isolated from patients without immunosuppression caused by HIV it was observed that only sample 200 had a wavy edge and the other membranous edges, samples 200 and 802 had a velvety texture, but samples 406, 802 and 879 had a cottony texture, of which the isolate 200 and 406 had ocher and beige pigmentation, respectively, while

Table 1. Isolation source profiles of the evaluated isolates

Isolates With HIV/AIDS	Site of isolation	Co-infection AIDS	Antiretroviral treatment	HP treatment	CD4	Outcome
49	Kidney and lung	Pneumocystosis, tuberculosis and cryptococcosis	Abandonment	Liposomal Amphotericin B	77	Death
212	Nervous system	Absent	Irregular	Itraconazole	Unrealized	Death
299	Disseminated	Absent	Irregular	Itraconazole	1	Clinical and mycological cure
340	Disseminated	Absent	Irregular	Itraconazole	70	Death
584	Disseminated	Neurotoxoplasmosis, Human papillomavirus, and ganglionic tuberculosis	Irregular	Itraconazole	12	Death
2030	Kidney and lung	Acute kidney failure, staphylococcal disease, pulmonary cryptococcosis, and disseminated intravascular coagulation	Absent (1)	Liposomal Amphotericin B	Unrealized	Death
Non-HIV/AIDS isolate	Site of isolation	Other Pathologies		HP treatment		Outcome
200	Cutaneous	Absent		Itraconazole		Clinical and mycological cure
268 (2)	Nervous system	Hydrocephalus with Intracranial hypertension, and cytomegalovirus		Corticosteroids and Liposomal Amphotericin B		Death
361	Cutaneous	Absent		Itraconazole		Clinical and mycological cure
406	Nervous system	Hepatitis		Liposomal Amphotericin B		Clinical and mycological cure
802	Kidney	Diabetes mellitus type II, renal failure and kidney transplant		Itraconazole		Clinical and mycological cure
879	Kidney	Addison's syndrome, diabetes mellitus type II, and failure renal		Fluconazole and itraconazole		Clinical and mycological cure

Note: (1) HIV Diagnosis during hospitalization
 (2) Late diagnosis of HP

Table 2. Phenotypic aspects of *H. capsulatum* isolates used for antigenic production

		MACROMORPHOLOGY				MICROMORPHOLOGY		
	Surface	Edge	Colony texture	Pigment	Hyphae	Germ tube	Microconidia	Macroconidia
Isolates from HIV/AIDS patients								
49	Central: grooves Median: flat	Membranous	Cottony	White	Typical	Absent	Typical	Club-shaped ornamentation
212	Central: Elevation and depression areas Median: flat	Smooth	Cottony	White	Typical	Absent	Absent	Smooth and generation
584	Central: protruding Median: grooves	Membranous	Cottony	White	Typical	Present	Typical	Club-shaped ornamentation
299	Central: Elevation and depression areas Median: flat	Membranous	Velvet	Beige	Typical	Present	Typical	Club-shaped ornamentation
340	Central: Elevation and depression areas Median: flat	Membranous	Cottony	Ocher	Typical	Absent	Absent	Absent
2030	Central: protruding Median: grooves	Membranous	Cottony	White	Typical	Absent	Typical	Club-shaped ornamentation
Isolates from Non-HIV/AIDS patients								
200	Central: concentric bands Median: radial grooves	Wavy	Velvet	Ocher	Typical	Absent	Typical	Club-shaped ornamentation
268	Central: Elevation and depression areas Median: flat	Membranous	Cottony	White	Atypical	Absent	Absent	Absent
361	Central: grooves Median: Elevation and pleated	Membranous	Cottony	Beige	Typical	Absent	Typical	Club-shaped ornamentation
406	Central: grooves Median: Elevation and pleated	Membranous	Cottony	Beige	Typical	Absent	Typical	Club-shaped ornamentation
802	Central: protruding Median: flat	Membranous	Velvet	White	Typical	Absent	Typical	Club-shaped ornamentation
879	Central: protruding Median: grooves	Membranous	Cottony	White	Typical	Absent	Typical	Club-shaped ornamentation

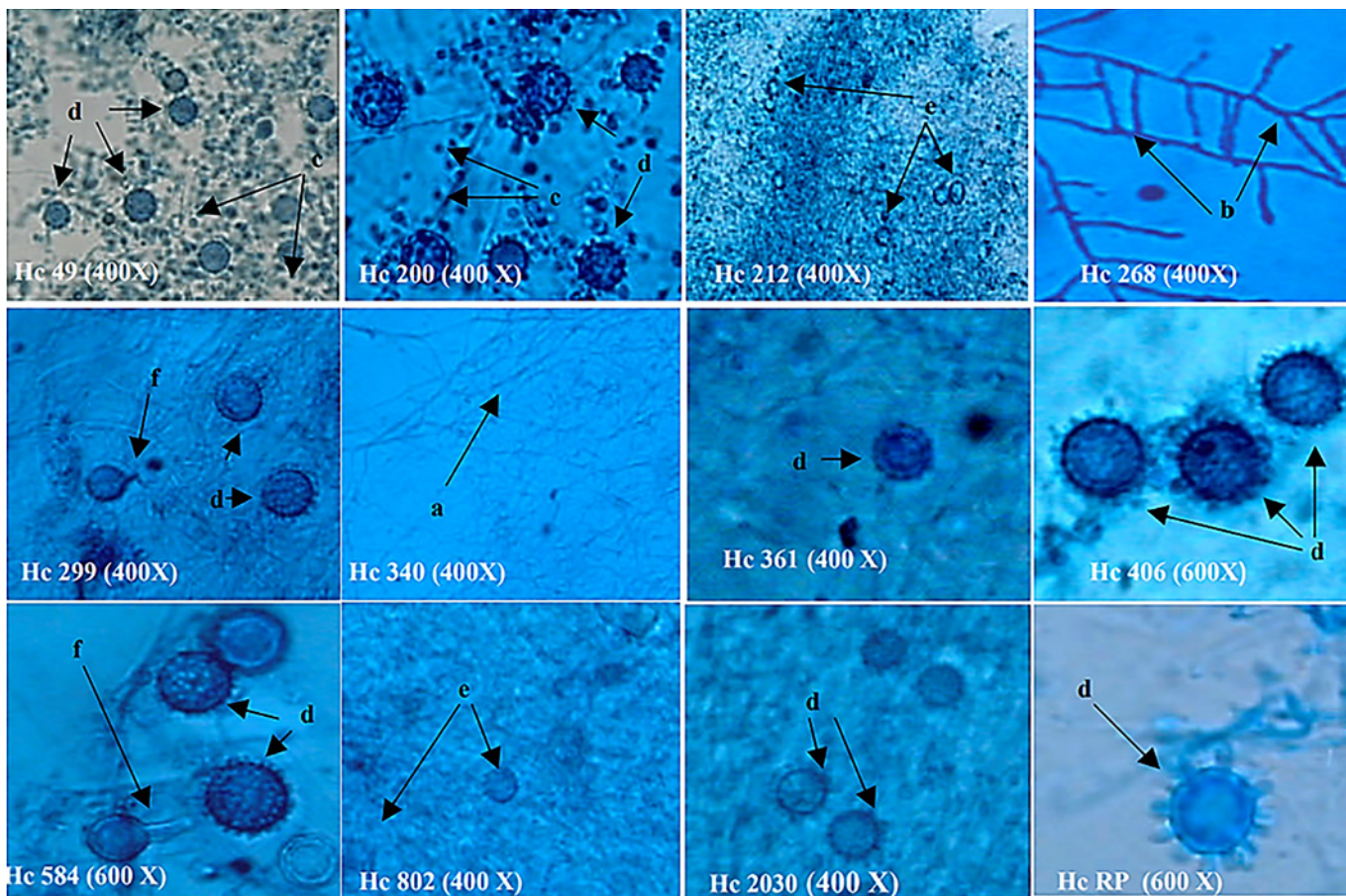


Figure. Micromorphological aspects of *H. capsulatum* isolates used for antigenic production

others being white. Micromorphologically, all were typical, and they presented serological reactivity for polyclonal antibody anti-*H.capsulatum* and anti-H and M fractions, serum from patients with HP disease, and strong reactivity for patients with HP infection. Among *H. capsulatum* samples (212, 299, 340, and 584) isolated from patients with HIV/AIDS; and from sample 361, from non-HIV/AIDS patients who did not show reactivity against anti-H and M polyclonal antibodies, and from serum samples from patients with HP disease. Alterations on micromorphological analysis of isolates 299 and 584 (tube germ), smooth edge, and alterations from micromorphology of conidia in the isolates 212, 340, and 268, in addition, isolate 268 had atypical hyphae. Isolate 268, which despite showing reactivity against species-specific polyclonal antibodies, did not show reactivity against serum samples from patients with infection and disease by *H. capsulatum* (Table 3).

DISCUSSION

In a previous study, Freitas et al¹⁶ used the same 12 *H. capsulatum* isolates to obtain antigens for diagnostic purposes and demonstrated the sensitivity, specificity, and stability of the *H. capsulatum* antigens. However, in this study, we sought to analyze the factors that could interfere with obtaining them. According to Hussain et al¹⁹, early and accurate diagnosis is critical for successful treatment, of

Table 3. Screening of antigen obtained within 33 days against polyclonal antibody, and serum positive patients with infectious disease caused by *Histoplasma*

Isolate	Polyclonal anti-exoantigen antibody of <i>H. capsulatum</i>	Anti- <i>Histoplasma</i> polyclonal antibody, H and M fraction(1)	Sera from patients with HP diseases	Sera from patients with HP infection
49	Strong positive	Positive	Positive	Strong positive
212	Weak positive	Negative	Positive	Strong positive
299	Strong positive	Weak positive	Negative	Weak positive
340	Weak positive	Negative	Negative	Weak positive
584	Strong positive	Positive	Negative	Weak positive
2030	Weak positive	Positive	Positive	Strong positive
200	Strong positive	Positive	Positive	Strong positive
268	Strong positive	Strong positive	Negative	Weak positive
361	Strong positive	Positive	Negative	Weak positive
406	Strong positive	Strong positive	Positive	Strong positive
802	Weak positive	Positive	Positive	Strong positive
879	Weak positive	Positive	Positive	Strong positive
Reference (2)	Positive	Positive	Positive	Positive

Note: (1) H and M *H. capsulatum* reference antisera (IMMY, Norman, OK, USA)

(2) DI Antigen (H50110) (IMMY, Norman, OK, USA)

infections caused by fungal pathogens. Diagnosis allows the implementation of adequate antifungal therapy, reducing the unnecessary use of toxic drugs and minimizing the emergence of multidrug-resistant fungal strains¹⁹. The presence of α - and β -glucans in the cell walls of different fungal species is related to distinct biological functions and changes during fungal morphogenesis²⁰. β -Glucans are found predominantly during the filamentous phase of *H. capsulatum*; at room temperature, there is an increase in the synthesis of polysaccharide β -(1,3) glucans²¹⁻²³. β -Glucans have antigenic properties²¹, and they are found predominantly during the filamentous phase of *H. capsulatum*; at room temperature, there is an increase in the synthesis of polysaccharide β -(1,3) glucans²²⁻²⁵. In the yeast form, at 37 °C, the fungus increases the synthesis of α -(1,3) glucans and decreases the synthesis of β -(1,3) glucans. Studies have shown that in murine models, in respiratory infection, avirulent strains of *H. capsulatum* are deficient in α -(1,3) glucans in the cell wall^{25,26}. This fungal morphogenesis is considered relevant to *H. capsulatum* virulence. Considering this characteristic of the cell wall, we produced agent antigens in the filamentous phase. This antigen is produced in the early stages of fungal development and is

detectable by DI assay or enzyme immunoassays. The methodology showed specific results during the exponential growth phase of the fungus^{12,16,17}.

According to Ehrhard and Pine²⁷, the antigen obtained from the filamentous phase culture filtrate contains H and M fractions. We verified that the antigens obtained from isolates 299 and 584, even at room temperature, exhibited a germ tube. This characteristic occurs during the parasitic phase and a probable decrease in β -glucan levels. These isolates showed excellent results against polyclonal anti-antigen antibodies of *H. capsulatum* and anti-H and M fractions but did not show reactivity when evaluated against serum samples from patients with HP disease. Additionally, weak reactivity was observed in serum samples from patients with infection by the pathogen. Despite having a typical morphology for the species, isolate 361 yielded an antigen with a low antigenic expression profile, with similar responses to isolates 299 and 584 in patients with infection or disease. The antigenic preparations obtained from isolates 212, 268, and 340, which showed relevant micromorphological alterations, revealed a deficient antigenic response to species-specific polyclonal antibodies, serum samples from patients with HP disease or infection. Nonetheless, the antigen obtained from isolate 268 showed serological reactivity against species-specific polyclonal antibodies. When evaluating the phenotypic aspects and serological reactivity profile against species-specific polyclonal antibodies and sera from patients with HP disease and/or infection, we observed optimal results for the antigenic preparations obtained from 50% of the isolates (49, 200, 406, 802, 2030, and 879). These isolates showed the typical morphology of the genus *Histoplasma*. Samples 49 and 2030 were isolated from patients with HIV/AIDS with irregular and absent antiretroviral drug use, respectively. These isolates revealed the presence of hyphae, microconidia, and macroconidia with club-shaped ornamentation typical of *H. capsulatum*.

Other studies have demonstrated that the culture medium results in phenotypic alterations in terms of the macro- and micromorphology of the isolates. According to Berliner²⁸, there are two distinct colonies of *H. capsulatum*: albino (type A) and brown (type B). One is characterized by the presence of aerial mycelium, thick hyphae, a large amount of smooth and/or macroconidia with club-shaped ornamentation, and microconidia present or absent; the other is brown or type B, characterized by the presence of many macroconidia with club-shaped ornamentation and a low frequency of microconidia. The author noted that type A cultures with successive subcultures become non-sporulating (mycelial sterilia). Borok²⁹ evaluated *Histoplasma* isolates maintained by sub-cultivation on Sabouraud agar at 27 °C for at least three years. The authors observed that brown cultures, which become a non-sporulating albino form, could be reversed by manipulating the substrate used in the culture, suggesting that the induction-suppression of this mechanism may be involved in the morphological variations of this species. Our results are consistent with those of Borok²⁹ regarding the induction-suppression mechanism of the sporulate state and its relationship with the substrate used for cultivation and origin from isolation. This is because there is a difference in conidiogenesis between isolated samples from individuals with and without HIV/AIDS. Isolates from individuals without HIV/AIDS showed intense conidiogenesis, even after a long period of *in vitro* maintenance. This includes the 879 isolate, which had 13 years since isolation and typical micromorphology. However, it appears that samples of *H. capsulatum* isolated from HIV/AIDS individuals tend to lose sporulation capability more quickly. Additionally, degeneration of macroconidia with club-shaped ornamentation occurs, as observed in sample 212, and absence of

conidia as in sample 340, particularly with continuous or irregular use of antiretroviral. In parallel, morphological alterations of hyphae and the absence of conidia occurred in sample 268 from a patient with a late diagnosis of HP, chronic meningitis, and intracranial hypertension treated with high doses of corticosteroids. Treatment with corticosteroids and other immunosuppressive agents that suppress cell-mediated immunity is a major predisposing factor for fungal diseases.

Freitas et al³⁰ examined superficial mycosis in cutaneous allergy patients using corticosteroids and verified that treatment with steroids can cause misleading results because the anti-inflammatory effect may attenuate and mask cutaneous lesions, although they are risk factors for the development of superficial mycosis in cutaneous allergy patients. We verified that there is a tendency for morphological alteration due to the use of antiretroviral drugs and corticosteroids. Our results are consistent with those of Cresnar and Zakelj-Mavric³¹, who described the action of steroids on the fungal response. The authors observed that dimorphic fungi require a morphogenetic transition to survive and invade the host, and the presence of estrogens affects the morphology of the fungus, including the formation of germ tubes. Cresnar and Zakelj-Mavric³¹ reported that corticosteroid intrusion by fungal cells causes stretching of the cell membrane and induction and phosphorylation of protein C-like kinase 2 (pck2), thus altering its integrity. In view of this, the authors emphasized the importance of the cell wall in the growth and morphogenesis of the fungus, as it can modify the interaction of the yeast with the environment or host, acting on adhesion, recognition by the host's immune system, and virulence. Another study observed the presence of mycelial and yeast forms, in addition to that with germ tube formation on histopathologic examination of patients with endovascular infections caused by *H. capsulatum*³². The authors did not report the use of corticosteroids and the presence of a germ tube in patients with endovascular infections, whereas in this study, isolates 299 and 584 produced them at room temperature.

A study conducted by Damasceno et al³³ on HP in an HIV patient from northeastern Brazil described the isolation of fifty-one strains. They presented colonies with surfaces ranging from pale white to beige (70.6%) to dark brown (29.4%). In this study, 82.4% of the cultures had cottony texture and 17.6% had a powdery texture. Microconidia were observed in all isolates, whereas macroconidia were identified in 74.5% of *H. capsulatum* isolates. The authors reported that the DI assay yielded only 17.6% positivity for *H. capsulatum* exoantigens. In our study, the antigens obtained from HIV patients, especially those using antiretroviral drugs, demonstrated a low profile of recognition of antigenic fractions H and M on DI. A similar result was observed for antigens obtained from patients using corticosteroids and antiretroviral drugs.

A limiting factor of this study included sampling. However, these data support future studies that relate the immune status of individuals with HIV/AIDS, antiretroviral and corticosteroid treatment, and drug interactions with the dimorphism of these samples, emphasizing atypical morphology. The isolation and identification of *H. capsulatum* is important for the diagnosis of HP.

In conclusion, despite the great variability of existing and available methodologies in the diagnosis of HP, it is of fundamental importance to study the characteristics of *H. capsulatum* isolates. Differences can be demonstrated not only in the identification of the fungal agent but also in obtaining immunobiological agents such as antigens. There is a relationship between the expression of H and M antigens and the morphologies of these isolates. The factor interfering with obtaining immunobiological agents is not the patient's immune status, but the use of drugs such as antiretroviral and/or steroids. These change the

production of atypical cellular elements in culture, leading to a low profile of recognition of antigenic fractions H and M on DI.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicting interests.

FUNDING

Not applicable.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Miss Lucia Cupertino Barreto (*in memoriam*), Mr. Almir Robson Ferreira, and Mrs. Maria Iranides Santana de Oliveira for their Technical assistance. We also thank Dr. Adriano Abudd for his assistance in improving the image of the micromorphological aspects of *H. capsulatum*. The study was supported by Instituto Adolfo Lutz (CTC-IAL#06/04), Disease Control Coordination, São Paulo State Health Department, and Institute of Tropical Medicine of São Paulo (#10/03 e # 983/03).

AUTHOR'S CONTRIBUTIONS

All authors have contributed significantly to this study: Roseli Santos de Freitas-Xavier conducted laboratory evaluations and drafted version of the article, Isabel Alves Feitosa Maciel made version of the text, Vera Lúcia Teixeira de Freitas collaborated in the version of the text, Adriana Pardini Vicentini made a critical revision of the text. All authors read and approved the final manuscript.

PRESENTATION NOTE

The results of this article are based on the master's dissertation of Roseli Santos de Freitas-Xavier, entitled "Phenotypic characterization and standardization of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* antigens for the diagnosis of histoplasmosis", defended in 2005 by the Graduate Program in Science of the Disease Control Coordination of the São Paulo State Health Department.

REFERENCES

1. Wheat LJ, Azar MM, Bahr NC, Spec A, Relich RF, Hage C. Histoplasmosis. Infect Dis Clin North Am. 2016;30(1):207-27.
<https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.10.009>
2. Azar MM, Loyd JL, Relich RF, Wheat LJ, Hage CA. Current concepts in the epidemiology, diagnosis, and management of histoplasmosis syndromes. Semin Respir Crit Care Med. 2020;41(1):13-30.
<https://doi.org/10.1055/s-0039-1698429>
3. Sahaza JH, Pérez-Torres A, Zenteno E, Taylor ML. Usefulness of the murine model to study the immune response against *Histoplasma capsulatum* infection. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2014;37(3):143-52.
<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2014.03.002>

4. Armstrong-James D, Meintjes G, Brown GD. A neglected epidemic: Fungal infections in HIV/AIDS. Trends Microbiol. 2014;22(3):120-7.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2014.01.001>
5. Almeida MA, Almeida-Silva F, Guimarães AJ, Almeida-Paes R, Zancopé-Oliveira RM. The occurrence of histoplasmosis in Brazil: A systematic review. Int J Infect Dis. 2019;86:147-56.
<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.07.009>
6. Adenis AA, Aznar C, Couppié P. Histoplasmosis in HIV-infected patients: A review of new developments and remaining gaps. Curr Trop Med Rep. 2014;1:119-28.
<https://doi.org/10.1007/s40475-014-0017-8>
7. Franklin AD, Larson L, Rauseo AM, Rutjanawech S, Hendrix MJ, Powderly WG et al. A comparison of presentations and outcomes of histoplasmosis across patients with varying immune status. Med Mycol. 2021;59(6):624-33.
<https://doi.org/10.1093/mmy/myaa112>
8. Arango-Bustamante K, Restrepo A, Cano LE, Bedout C, Tobón AM, González A. Diagnostic value of culture and serological tests in the diagnosis of histoplasmosis in HIV and non-HIV Colombian patients. Am J Trop Med Hyg. 2013;89(5):937-42.
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0117>
9. Azar MM, Hage CA. Laboratory diagnostics for histoplasmosis. J Clin Microbiol. 201;55(6):1612-20.
<https://doi.org/10.1128/JCM.02430-16>
10. Caceres DH, Chiller T, Lindsley MD. Immunodiagnostic assays for the investigation of fungal outbreaks. Mycopathologia. 2020;185(5):867-80.
<https://doi.org/10.1007/s11046-020-00452-x>
11. Toscanini MA, Nusblat AD, Cuestas ML. Diagnosis of histoplasmosis: current status and perspectives. Appl Microbiol Biotechnol. 2021;105:1837-59.
<https://doi.org/10.1007/s00253-021-11170-9>
12. Kaufman L, Standard P. Improved version of the exoantigen test for identification of *Coccidioides immitis* and *Histoplasma capsulatum* cultures. J Clin Microbiol. 1978;8(1):42-5.
<https://doi.org/10.1128/jcm.8.1.42-45.1978>
13. Kaufman L, Standard P. Immuno-identification of cultures of fungi pathogenic to man. Curr Microbiol. 1978;1:135-40.
<https://doi.org/10.1007/BF02601665>
14. Dantas KC, Freitas RS, Silva MV, Criado PR, Luiz OC, Vicentini AP. Comparison of diagnostic methods to detect *Histoplasma capsulatum* in serum and blood samples from AIDS patients. PLoS One. 2018;13(1):e0190408.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190408>

15. Riddell RW. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. *Mycologia*. 1950;42(2):265-70.
<https://doi.org/10.2307/3755439>
16. 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>
17. Freitas RS, Carvalho-Vivi JO, Zamboni IM, Assis CM, Costa-Martins JE, Vicentini-Moreira AP. The importance of serological assays in diagnosing acute pulmonary histoplasmosis. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2009;15(2):278-88.
<https://doi.org/10.1590/S1678-91992009000200010>
18. Mckinney MM, Parkinson A. A simple non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluids. *J Immunol Meth*. 1987;96(2):271-8.
[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(87\)90324-3](https://doi.org/10.1016/0022-1759(87)90324-3)
19. Hussain K, Malavia D, Johnson EM, Littlechild J, Winlove CP, Vollmer F et al. Biosensors and diagnostics for fungal detection. *J Fungi*. 2020;6(4):349.
<https://doi.org/10.3390/jof6040349>
20. Domer JE. Monosaccharide and chitin content of cell walls of *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis*. *J Bacteriol*. 1971;107(3):870-7.
<https://doi.org/10.1128/jb.107.3.870-877.1971>
21. 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>
22. Kanetsuna F, Carbonell LM, Azuma I, Yamamura Y. Biochemical studies on the thermal dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol*. 1972;110(1):208-18.
<https://doi.org/10.1128/jb.110.1.208-218.1972>
23. Kanetsuna F, Carbonell LM, Gil F, Azuma I. Chemical and ultrastructural studies on the cell walls of the yeast like and mycelial forms of *Histoplasma capsulatum*. *Mycopathol Mycol Appl*. 1974;54(1):1-13.
<https://doi.org/10.1007/BF02055967>
24. Kanetsuna F. Ultrastructural studies on the dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*, *Blastomyces dermatitidis* and *Histoplasma capsulatum* Sabouraudia. 1981;19(4):275-86.
<https://doi.org/10.1080/00362178185380451>
25. Klimpel KR, Goldman WE. Cell walls from avirulent variants of *Histoplasma capsulatum* lack alpha-(1,3)-glucan. *Infect Immun*. 1988;56(11):2997-3000.
<https://doi.org/10.1128/iai.56.11.2997-3000.1988>

26. Rappleye CA, Engle JT, Goldman WE. RNA interference in *Histoplasma capsulatum* demonstrates a role for α -(1,3)-glucan in virulence. Mol Microbiol. 2004;53(1):153-65.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04131.x>
27. Ehrhard HB, Pine L. Factor influencing the production of H and M antigens by *Histoplasma capsulatum*: Development and evaluation of shake culture procedure. Appl Microbiol. 1972;23(2):236-49.
<https://doi.org/10.1128/am.23.2.236-249.1972>
28. Berliner MD. Primary subcultures of *Histoplasma capsulatum*: I. Macro and micromorphology of the mycelial phase. Sabouraudia. 1968;6(2):111-8.
<https://doi.org/10.1080/00362176885190211>
29. Borok R. The mycelial status and reversibility in *Histoplasma capsulatum*. Sabouraudia. 1980;18(4):249-53.
<https://doi.org/10.1080/00362178085380431>
30. Freitas RS, Neves PS, Charbel CE, Criado PR, Nunes RS, Santos-Filho AM et al. Investigation of superficial mycosis in cutaneous allergy patients using topical or systemic corticosteroids. Int J Dermatol. 2017;56(10):e194-e198.
<https://doi.org/10.1111/ijd.13651>
31. Cresnar B, Zakelj-Mavric M. Aspects of the steroid response in fungi. Chem Biol Interact. 2009;178(1-3):303-9.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.11.002>
32. Ledtke C, Rehm SJ, Fraser TG, Shrestha NK, Tan CD, Rodriguez ER et al. Endovascular infections caused by *Histoplasma capsulatum*: A case series and review of the literature. Arch Pathol Lab. 2012;136(6):640-5.
<https://doi.org/10.5858/arpa.2011-0050-OA>
33. Damasceno LS, Teixeira MM, Barker BM, Almeida MA, Muniz MM, Pizzini CV et al. Novel clinical and dual infection by *Histoplasma capsulatum* genotypes in HIV patients from Northeastern, Brazil. Sci Rep. 2019;9:11789.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-48111-6>





Panorama da qualidade biológica da água destinada ao tratamento dialítico em pacientes sob cuidados críticos em Unidades de Terapia Intensiva

Overview of the biological quality of water intended for dialysis treatment in patients under critical care in Intensive Care Units

Adriana Aparecida Buzzo Almodovar¹ , Ellen Gameiro Hilinski² , Márcia Liane Buzzo^{3*} 

¹ Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil.

² Núcleo de Ensaios Biológicos e de Segurança, Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil.

³ Núcleo de Contaminantes Inorgânicos, Centro de Contaminantes, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil.

* Autor de correspondência/Corresponding author: marcia.buzzo@ial.sp.gov.br

Recebido/Received: 03.10.2023 – Aceito/Accepted: 07.12.2023

RESUMO

A incidência da lesão renal aguda caracteriza-se como evento frequente em pacientes críticos internados em Unidades de Terapia Intensiva e está associada ao aumento de mortalidade, causando grande impacto à Saúde Pública. As intercorrências clínicas são minimizadas com intervenções dialíticas, acarretando a exposição do paciente a volumes expressivos de água tratada durante a terapia renal em leito. As análises microbiológicas e de determinação de endotoxinas bacterianas em amostras de água tratada e em soluções de dialisato foram executadas em dois hospitais públicos do município de São Paulo, seguindo metodologias analíticas preconizadas em compêndios oficiais. A avaliação demonstrou que a porcentagem de resultados satisfatórios no período de 2010 a 2022 variou entre 35,2 a 100% e de 40 a 100% para as unidades hospitalares I e II para a água tratada, respectivamente; e, 100% para as soluções de dialisato para a unidade hospitalar I. A eficácia de ações delineadas pelas equipes técnicas das unidades hospitalares, na adequação da água destinada à terapia dialítica, aponta para a importância em estimular outras instituições hospitalares na padronização e implantação de melhoria contínua de seus sistemas de tratamento de água para uso em procedimento dialítico, prevenindo riscos adicionais aos pacientes expostos à terapia renal.

Palavras-chave. Lesão Renal Aguda, Diálise, Qualidade da Água, Bactérias Heterotróficas, Endotoxinas, UTI.

ABSTRACT

The incidence of acute kidney is high among critically ill patients admitted to Intensive Care Units and is associated with increased mortality, having a major impact on public health. Clinical complications are minimized with dialysis interventions, which expose patients to significant volumes of treated water during in-bed renal therapy. Microbiological analyzes and determination of bacterial endotoxins were performed on treated water samples and dialysate solutions in two public hospitals in São Paulo city, using analytical methodologies recommended in official compendia. The evaluation showed that the percentage of satisfactory results for treated water ranged from 35.2% to 100% in Hospital Unit I and from 40% to 100% in Hospital Unit II between 2010 and 2022. For dialysate solutions in Hospital Unit I, the percentage of satisfactory results was 100% during the same period. The effectiveness of actions implemented by the technical hospital teams, in adapting water for dialysis therapy, points to the importance of encouraging other hospital institutions to standardize and implement a program of continuous improvement for their water treatment systems used in dialysis procedures. This will help to prevent additional risks to patients exposed to renal therapy.

Keywords. Acute Kidney Injury, Dialysis, Water Quality, Heterotrophic Bacteria, Endotoxins, ICU.

INTRODUÇÃO

Embora grandes avanços tenham sido introduzidos nas intervenções terapêuticas destinadas aos pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) nas últimas décadas, parte destes pode desenvolver a Lesão Renal Aguda (LRA), distúrbio que afeta todas as faixas etárias de pacientes hospitalizados em nível mundial¹⁻³. Esta síndrome vem emergindo como grande preocupação de Saúde Pública, que pode estar relacionada ao aumento das taxas de riscos de mortalidade e morbidade^{1,3}, e também aliada a custos financeiros significativos de assistência médica⁴⁻⁶.

A LRA é reconhecida como uma condição crítica na qual ocorre a deterioração súbita da função renal, caracterizada pela perda da capacidade do rim em filtrar os resíduos metabólicos, sais e líquidos do sangue, podendo ocasionar falência renal, com consequente necessidade de suporte renal artificial⁷. Esta manifestação está associada a processos fisiopatológicos, e os pacientes acometidos por esta patologia podem apresentar etiologia multifatorial vinculada com indicadores de danos à saúde, como: sepse^{8,9}, insuficiência cardíaca¹⁰, diabetes¹¹, Covid-19^{2,6}, dentre outras implicações clínicas.

A gravidade do insulto renal torna-se um fator de risco significativo para o desenvolvimento da doença renal crônica¹² e pode exigir o emprego de Terapia Renal Substitutiva (TRS) como suporte para o tratamento de pacientes severamente enfermos com LRA⁷. Dentre as modalidades disponíveis, nas quais a substituição parcial da função do rim visa abrandar os sintomas do paciente dialítico, a hemodiálise ou a diálise peritoneal podem ser indicadas^{13,14}.

Nos casos de procedimento de tratamento por hemodiálise, os pacientes são expostos a volumes expressivos de água com a finalidade de correção de anormalidades metabólicas e depuração das toxinas, restabelecendo o equilíbrio hidroeletrólítico, a retirada de substâncias tóxicas e o excesso de água e sais minerais do organismo¹⁵. Neste tipo de intervenção, a qualidade da água destinada aos pacientes durante o procedimento dialítico é um fator responsável pelo risco de infecção causada por bacteremia¹⁶⁻²⁰.

Desta forma, considerando a preocupação com a segurança e agravos à saúde de pacientes portadores de quadros de insuficiência renal, dois hospitais públicos da cidade de São Paulo foram selecionados para integrar um estudo piloto, de modo a avaliar a qualidade da água tratada utilizada para procedimentos dialíticos em pacientes internados em UTI das respectivas instituições. O estudo avaliou a qualidade da água tratada para diálise através da realização dos ensaios de contagem de bactérias heterotróficas, pesquisa de coliformes totais e determinação de endotoxinas bacterianas, comparando os resultados obtidos com os limites regulatórios estabelecidos para avaliação da qualidade da água empregada para o tratamento dialítico de pacientes portadores de insuficiência renal crônica^{21,22}, visto não existir especificação estabelecida em legislação para avaliação da qualidade da água utilizada para o tratamento dialítico de pacientes portadores de insuficiência renal aguda.

MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos de colheita, preservação, acondicionamento e transporte das amostras de água tratada foram executados por profissionais de saúde das unidades hospitalares I e II, seguindo as orientações definidas no Manual para Orientação – Análise de Água no Instituto Adolfo Lutz²³, as quais estão baseadas nas recomendações da *American Public Health Association* (APHA)²⁴.

Caixas isotérmicas contendo gelo reciclável e frascos foram disponibilizadas às instituições públicas previamente às datas de colheita das amostras de água tratada para diálise e soluções de dialisato destinadas à pacientes internados em leitos de UTI e que apresentassem quadro de LRA, no período entre janeiro de 2010 a dezembro de 2022. Os ensaios laboratoriais, representados pela contagem de bactérias heterotróficas,

pesquisa de coliformes totais e determinação de endotoxinas bacterianas, seguiram as recomendações de compêndios oficiais^{24,25}.

Os parâmetros investigados, relativos ao ponto contíguo à entrada da água tratada na máquina de diálise para as unidades hospitalares I e II, visaram à observação ao atendimento aos limites máximos permitidos em legislação vigente à época de execução das análises^{21,22}. A partir de 2017, novo tipo de amostra foi incluído para avaliação de contagem de bactérias: solução de dialisato para a unidade hospitalar I.

As identificações das máquinas de diálise portáteis onde foram executadas as colheitas das amostras foram fornecidas pelos hospitais. No caso de não possuir identificação, as máquinas foram genericamente nomeadas sequencialmente como M. Já as representações por iniciais A, B, C, D e E remetem às descrições de distintas marcas de equipamentos apontados no processo de encaminhamento das amostras, as quais foram preservadas a fim de não expor os fabricantes (**Tabela 1**).

Em abril de 2017, de acordo com informações fornecidas pelos representantes da unidade hospitalar I, a antiga rede de tratamento de água foi desativada, e nova rede foi implantada, a partir da qual as colheitas de amostras passaram a ser efetuadas.

Os cronogramas de coletas das amostras e os tipos de ensaios avaliados foram acordados com os hospitais no decorrer do tempo de estudo (**Tabela 1**). Não foram recebidas amostras da unidade hospitalar II no ano de 2022.

Tabela 1. Número de amostras e de ensaios laboratoriais executados no período de 2010 a 2022, referentes às unidades hospitalares I e II: contagem de bactérias heterotróficas (CPP), pesquisa de coliformes totais (CT) e determinação de endotoxinas bacterianas (EB)

Ano	Identificação da máquina	Amostras	Ensaio realizado		
			CPP	CT	EB
Unidade hospitalar I					
Ponto contíguo à máquina de diálise					
2010	M1, A	7	7	7	7
2011	M1, M4, M7 a M10	3	3	3	3
2012	M1, M2 a M7	14	14	14	14
2013	M1 a M6, B5, B6	28	28	28	28
2014	M1, M2, M4, M5, M6, A1, A2, A4, B4, B5, B6	50	50	50	50
2015	M1, M2, M4 a M7, A1, B4 a B7	43	43	43	43
2016	M1, M2, M4 a M7, A1, A3, B4 a B7	54	53	53	54
2017	A1, A2, B4 a B7	48	48	48	48
2018	A2, A3, B4 a B7, C8, C9	43	43	34	43
2019	A1, A3, B4, B5, B7, C8, C9, E1 a E4	50	38	49	50
2020	A1, B1, C1 a C4, D1 a D4, E2 a E8	52	52	52	52
2021	M8, E4 a E8, D1, B	20	20	20	20
2022	E3 a E9	37	37	37	37
Total de ensaios executados		449	436	438	449

Continua na próxima página

Continuação

Ano	Identificação da máquina	Amostras	Ensaio realizado		
			CPP	CT	EB
Dialisato					
2017	A2, B4, B5, B7	8	8	–	–
2018	A2, A3, B4, B5	7	7	–	–
2019	A3, B5, C8, C9,	6	6	–	–
2020	C3, C6, C9, D2, E8	9	9	–	–
2021	M8, C7, C8	7	7	–	–
2022	C1, C4	3	3	–	–
Total de ensaios executados		40	40	–	–
Unidade hospitalar II					
Ponto contíguo à máquina de diálise					
2013	M1	3	3	3	3
2014	M1	9	9	9	9
2015	M1	10	10	10	10
2016	M1, A, B	11	11	11	11
2017	M1	4	4	4	4
2018	M1	12	12	10	12
2019	M1	9	8	9	9
2020	M1, B	15	15	15	15
2021	M1, B, D	19	19	19	19
Total de ensaios executados		92	91	90	92

Devido à inexistência de legislação específica para avaliação da qualidade da água destinada a pacientes com LRA, os resultados obtidos foram confrontados com os limites preconizados em legislação que estabelece regulamentos técnicos para o funcionamento de Serviços de Diálise específicos para tratamento de pacientes renais crônicos. Assim, no período de estudo entre janeiro de 2010 a fevereiro de 2014, as amostras foram comparadas com a Resolução RDC nº 154/2004²¹ e, a partir de março de 2014, com sua revogação, as amostras foram relacionadas com os limites estabelecidos pela Resolução 11/2014²², conforme indicado na [Tabela 2](#).

Tabela 2. Valores máximos permitidos em legislação para os ensaios de contagem de bactérias heterotróficas (CPP), pesquisa de coliformes totais (CT) e determinação de endotoxinas bacterianas (EB)

Legislação	Ensaio		
	CPP	CT	EB
Ponto contíguo à máquina de diálise			
Resolução RDC nº 154/2004 ²¹	200 UFC/mL	Ausência em 100 mL	2 UE/mL
Resolução RDC nº 11/2014 ²²	100 UFC/mL	Ausência em 100 mL	0,25 UE/mL
Dialisato			
Resolução RDC nº 11/2014 ²²	200 UFC/mL	–	–

RESULTADOS

A fim de apresentar um panorama geral dos laudos analíticos emitidos para as duas unidades hospitalares em estudo no ponto contíguo à máquina de diálise no período de 2010 a 2022, a **Figura 1** mostra as porcentagens de amostras consideradas satisfatórias, ou seja, quando todos os resultados das análises microbiológicas, incluindo contagem de bactérias heterotróficas, pesquisa de coliformes totais e determinação de endotoxinas bacterianas atenderam aos parâmetros preconizados em legislação vigente à época da realização dos ensaios. Resultados insatisfatórios, quando pelo menos um dos parâmetros encontrou-se em desacordo com os valores permitidos em legislação, também estão representados na **Figura 1**.

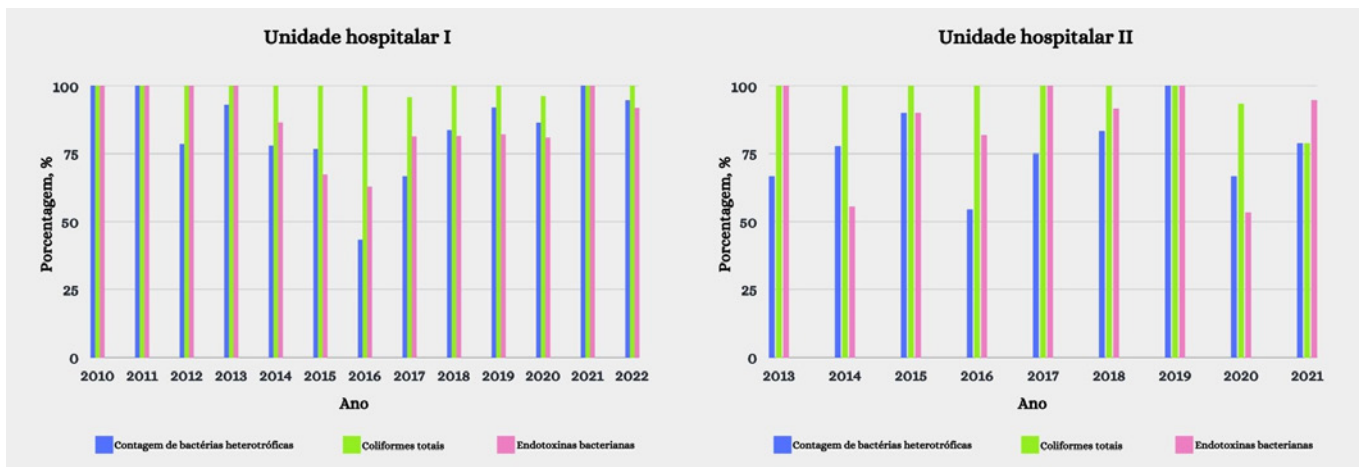


Figura 1. Panorama geral dos resultados obtidos para as unidades hospitalares I e II no ponto contíguo à máquina de diálise, para os ensaios de contagem de bactérias heterotróficas, pesquisa de coliformes totais e determinação de endotoxinas bacterianas, no período de 2010 a 2022

Além disso, uma avaliação mais detalhada para os ensaios microbiológicos e de endotoxinas bacterianas no ponto contíguo à máquina para as unidades hospitalares I e II é demonstrada na **Figura 2**.

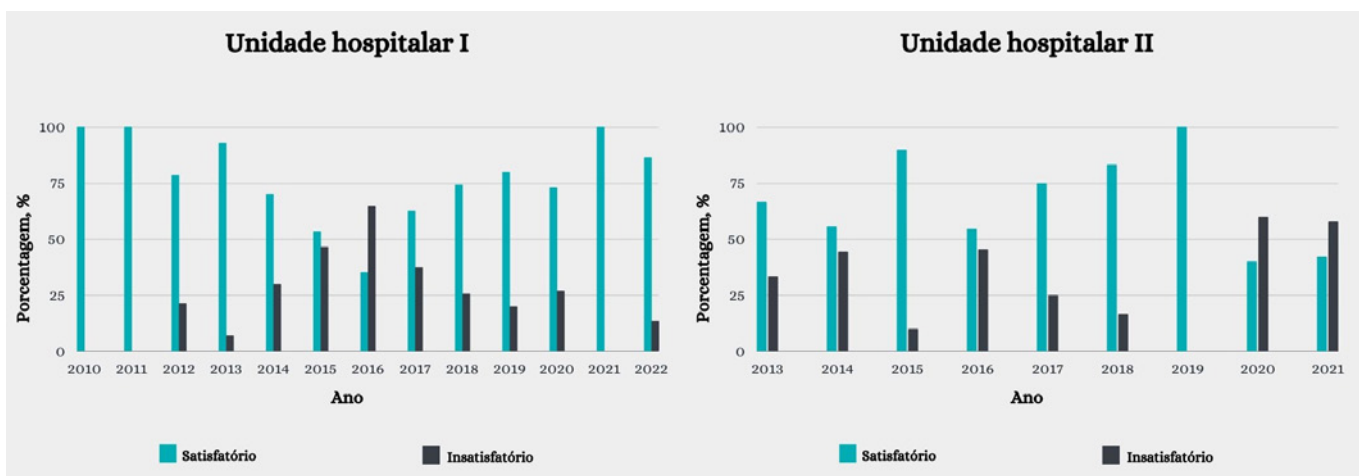


Figura 2. Porcentagem de resultados satisfatórios referente ao ponto contíguo à máquina de diálise para os ensaios de contagem de bactérias heterotróficas, pesquisa de coliformes totais e determinação de endotoxinas bacterianas, para as unidades hospitalares I e II, no período de 2010 a 2022

Considerando que a variação de resultados obtidos na pesquisa de coliformes totais para as duas unidades hospitalares em estudo foi observada apenas nos anos 2017, 2020 e 2021, estes não foram assinalados em formato de figura, sendo apenas descritos.

De modo semelhante, os resultados obtidos para o ensaio de contagem de bactérias heterotróficas em amostras de solução de dialisato efetuado somente para a unidade hospitalar I também não foram demonstrados em formato de figura, tendo em vista que todas as análises atenderam ao limite máximo estabelecido em legislação durante todo o período do estudo.

DISCUSSÃO

O presente estudo relacionado às avaliações microbiológicas, abrangendo a contagem de bactérias heterotróficas e pesquisa de coliformes totais e de determinação de endotoxinas bacterianas nos produtos água tratada e solução de dialisato, destinados aos procedimentos dialíticos empregados em ambientes de UTI, torna-se relevante no cenário nacional, visto que poucas pesquisas recentes são reportadas na literatura nacional.

O panorama geral obtido relacionado ao monitoramento efetuado nas unidades hospitalares I e II, para os ensaios biológicos de contagem de bactérias heterotróficas, pesquisa de coliformes totais e de determinação de endotoxinas bacterianas (**Figura 1**), demonstrou que ao longo do período de estudo, entre 2010 e 2022, as porcentagens de laudos analíticos emitidos com resultados satisfatórios, quando todos os ensaios apresentaram-se em conformidade com a legislação vigente à época da execução dos ensaios, variaram entre 35,2 e 100% para a unidade hospitalar I e entre 40 e 100% para a unidade hospitalar II.

Resultados concordantes com a legislação relativos ao ponto contíguo à máquina de diálise para contagem de bactérias heterotróficas apresentaram índices de variação entre 43,4 e 100% para a unidade hospitalar I e entre 54,5 e 100% para a unidade hospitalar II; enquanto para o ensaio de endotoxinas bacterianas a satisfatoriedade foi evidenciada em níveis que variaram entre 63 e 100% para a unidade hospitalar I e entre 53,3 e 100% para a unidade hospitalar II (**Figura 2**).

Por outro lado, a **Figura 1** também revela porcentagens de laudos analíticos emitidos com resultados em desacordo com a legislação vigente, que apresentaram no mínimo um parâmetro discordante. Os maiores índices insatisfatórios obtidos para os ensaios de contagem de bactérias heterotróficas, coliformes totais e de endotoxinas bacterianas situaram-se entre os anos de 2014 a 2016 para a unidade hospitalar I, e entre os anos de 2014, 2016, 2020 e 2021 para a unidade hospitalar II (**Figura 2**).

Do total de análises realizadas para contagem de bactérias heterotróficas, as faixas de porcentagens de resultados discordantes com a legislação situaram-se entre 0 a 56,6% para a unidade hospitalar I e entre 0 a 45,5% para a unidade hospitalar II. Já para o ensaio de determinação de endotoxinas bacterianas, as taxas de resultados discordantes variaram entre 0 e 37% para a unidade hospitalar I e entre 0 e 46,7% para a unidade hospitalar II.

Relacionado à pesquisa de coliformes totais, observou-se que foram obtidos resultados insatisfatórios relativos à unidade hospitalar I apenas nos anos de 2017 (4,2%) e de 2020 (3,8%), os quais correspondem a um total de 95,8 e 96,2% de resultados em conformidade com a legislação em vigor, respectivamente. Já

para a unidade hospitalar II, foram evidenciados 6,7 e 21,1% de resultados insatisfatórios nos anos de 2020 e 2021, respectivamente, indicando a presença de bactérias do grupo coliforme. Neste biênio, 93,3 e 78,9% dos resultados obtidos demonstraram conformidade com a legislação em vigor.

A incidência de valores em desacordo com a legislação para os parâmetros avaliados, considerando o período entre 2014 a 2016, pode estar associada ao período de estiagem no Estado de São Paulo, no qual a crise hídrica ocasionou a redução de oferta de água potável, afetando os níveis dos mananciais^{26,27}. A provável ocorrência de remanejamento de água de diferentes sistemas de abastecimento para compensação de queda de reservatórios, o consumo do volume morto das represas, a intermitência no fornecimento da água e a despressurização na rede de distribuição podem ter comprometido a qualidade da água produzida, tornando-a mais vulnerável à contaminação externa²⁸. Este fator pode ter acarretado prejuízos ao desempenho do tratamento da água destinada à utilização em processos dialíticos, em pacientes internados em UTI de instituições básicas, como os hospitais. Este aspecto importante também foi apontado em pesquisa referente à avaliação da qualidade da água tratada para hemodiálise, empregada em tratamento dialítico de pacientes renais crônicos, nos Serviços de Diálise do Estado de São Paulo^{18,20}.

Outra razão relacionada aos índices de resultados insatisfatórios pode ser atribuída ao período de transição da legislação no decorrer deste estudo^{21,22} que, a partir de 2014, preconiza valores máximos permitidos mais restritivos para os ensaios de contagem de bactérias heterotróficas e para determinação de endotoxinas bacterianas (**Tabela 2**). O novo dispositivo em vigor estabeleceu prazos de seis meses a quatro anos para a efetivação dos Serviços de Diálise no atendimento de descarte de dialisadores, linhas arteriais venosas, substituição do processamento manual dos dialisadores por sistema automatizado, e promoção das adequações necessárias para o cumprimento dos demais requisitos²².

Ainda, vale observar que a unidade hospitalar I passou a obter, novamente, maior porcentagem de resultados satisfatórios, relativos aos ensaios avaliados, tanto para as amostras da água tratada como para as amostras de solução de dialisato, após a implantação da nova rede de sistema de tratamento da água, efetivada a partir de abril de 2017, conforme indicado na **Figura 2**.

Os resultados obtidos corroboram com pesquisas na literatura quando resultados insatisfatórios foram obtidos e assinalam a ocorrência de significativa melhoria na qualidade da água destinada à terapia dialítica obtida após a adoção de protocolos específicos para o tratamento de sistemas nas plantas de diálise em clínicas ou em hospitais. As análises de contagem de bactérias heterotróficas, pesquisa de coliformes totais, e determinação de endotoxinas bacterianas executadas após a implantação de procedimentos de desinfecção e de retenção de possíveis contaminantes demonstraram o decréscimo na incidência de micro-organismos e formação de biofilmes o que contribui para possível liberação de endotoxinas bacterianas no sistema de diálise. Este fato aponta para a promoção da eficácia do processo e a provável redução de risco de ocorrência de inflamação no organismo do paciente submetido ao tratamento dialítico^{18,20,29-33}.

Investigações na literatura indicam a necessidade de melhoria de sistemas de tratamento da água quando resultados insatisfatórios são evidenciados. Em centros que oferecem serviços de diálise e que não dispõe de protocolos de manutenção do sistema de tratamento de água, a provável negligência quanto aos cuidados que deveriam ser destinados ao tratamento da água ofertada aos pacientes renais, pode resultar no aumento da taxa de contaminação microbiana e formação de biofilme no interior das tubulações dos sistemas de produção^{34,35}, com conseqüente comprometimento da qualidade final da água.

Dentro deste contexto, o desenvolvimento de regras específicas de assepsia do sistema de produção de água também pode ter sido adotado pelas equipes técnicas de profissionais das unidades hospitalares quando resultados insatisfatórios foram evidenciados para os ensaios considerados, e que ao longo do tempo podem ter representado maior êxito na implantação de normas para a adequação dos seus processos de tratamento da água aos limites restritivos, preconizados em legislação.

Por fim, o elevado índice de resultados satisfatórios observados na unidade hospitalar I, com relação ao ensaio de contagem de bactérias heterotróficas para as soluções de dialisato, pode ser inferido à possibilidade de utilização de máquinas com a presença de módulos de ultrafiltração para retenção bacteriana do fluido de diálise (dialisato). Este equipamento, localizado imediatamente antes da entrada no dialisador, proporciona a redução de valores de contagens de bactérias heterotróficas provenientes da água tratada destinada à preparação do fluido de diálise e, desta forma, pode minimizar os efeitos prejudiciais à saúde do paciente exposto à terapia renal^{32,33,36-38}.

Resultados semelhantes aos obtidos na presente pesquisa para a qualidade da solução de dialisato foram descritos na literatura^{33,37,38}. No entanto, outros autores alcançaram conclusões discordantes em relação a este estudo, visto que a solução de dialisato pode ser suscetível à contaminação microbiana, com possível formação de biofilme ao longo das tubulações do sistema de produção do fluido de diálise, comprometimento da membrana do processo de osmose reversa, interferência na qualidade da manufatura da água e elevação dos níveis de contaminação acima do valor máximo permitido em legislação para contagem de bactérias heterotróficas^{19,36,38}.

Com base no exposto acima, evidenciou-se que os resultados insatisfatórios obtidos ensejaram a necessidade de estabelecimento de ações nos sistemas de produção da água destinada a procedimentos dialíticos nas duas unidades hospitalares e, que ao longo do tempo, levaram ao incremento de resultados dentro dos padrões estabelecidos em legislação, com relação aos ensaios avaliados na presente pesquisa.

Protocolos eficazes de tratamento da água destinada à terapia dialítica também foram sugeridos por outros autores quando da comprovação da qualidade insuficiente da água destinada ao tratamento de pacientes renais. A implementação de novas tecnologias nas rotinas de manutenção do sistema de tratamento da água e parâmetros operacionais também podem ter sido empregados como intervenções pelas unidades hospitalares, e que corroboraram para a melhoria na efetividade dos resultados analíticos, relacionados a itens, como: **(i)** implantação de rotinas de desinfecção microbiológica, química e térmica da máquina nos serviços de diálise à beira do leito antes e após a sessão do tratamento, **(ii)** troca de dialisadores, **(iii)** implantação de gestão de manutenção preventiva e/ou corretiva de máquina portátil de osmose reversa destinada ao tratamento dialítico, **(iv)** troca de máquinas de diálise, **(v)** adaptações físicas ou reformas destinadas à instalação local, **(vi)** troca de rede de tratamento de água, **(vii)** capacitação/treinamento da equipe técnica de apoio ao serviço; entre outros indicadores, a fim de evitar contaminação cruzada da água^{29-33,39,40}.

Portanto, evidenciou-se que a obtenção de resultados em desacordo com a legislação, nos parâmetros avaliados, conduziu as equipes de profissionais das instituições hospitalares a promoverem maiores esforços para garantir a qualidade dos sistemas de tratamento da água destinada ao tratamento dialítico frente aos requisitos regulatórios utilizados no estudo. É possível concluir que a progressão dos resultados em conformidade com os padrões da legislação ao longo do tempo do processo, sob contínuo monitoramento,

permite inferir em melhor qualidade na produção da água ofertada aos pacientes internados em unidades de UTI, minimizando os riscos à saúde que possam estar associados ao tratamento dialítico.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo, relativos às contagens de bactérias heterotróficas, pesquisa de coliformes totais e à determinação de endotoxinas bacterianas em amostras de água tratada para diálise e solução de dialisato, coletadas em duas unidades hospitalares públicas da cidade de São Paulo, permitiram observar a evolução ocorrida ao longo do tempo, frente ao aumento nos níveis de resultados satisfatórios, indicando a eficácia na melhoria contínua da qualidade da água ofertada aos pacientes internados em UTI, submetidos a procedimentos dialíticos e com quadros de insuficiência renal aguda.

Além disso, os resultados objetivam estimular outras instituições a realizarem o monitoramento contínuo de seus sistemas de tratamento para a produção de água tratada e solução de dialisato, por meio de avaliações laboratoriais periódicas, com o objetivo de reduzir a ocorrência de contaminação do produto final ofertado em terapia dialítica, impactando de forma positiva a saúde dos pacientes expostos ao tratamento dialítico.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não existir conflitos de interesse.

FINANCIAMENTO

Não declarado pelos autores.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às instituições hospitalares públicas na execução deste estudo.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Adriana Aparecida Buzzo Almodovar e Ellen Gameiro Hilinski: concepção e delineamento das análises laboratoriais; coleta, análise crítica e interpretação dos resultados obtidos. Márcia Liane Buzzo: análise crítica e interpretação dos resultados obtidos e elaboração da redação. Todos os autores foram responsáveis pela redação, revisão e aprovação final do texto.

REFERÊNCIAS

1. Menon S, Krallman KA, Arikan AA, Fuhrman DY, Gorga SM, Mottes T et al. Worldwide exploration of renal replacement outcomes collaborative in kidney disease (WE-ROCK). *Kidney Int Rep.* 2023;8(8):1542-52.
<https://doi.org/10.1016/j.ekir.2023.05.026>
2. Passoni R, Lordani TVA, Peres LAB, Carvalho ARS. Occurrence of acute kidney injury in adult patients hospitalized with COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Nefrologia.* 2022;42(4):404-14.
<https://doi.org/10.1016/j.nefro.2021.09.002>

3. Meena J, Mathew G, Kumar J, Chanchlani R. Incidence of acute kidney injury in hospitalized children: A meta-analysis. *Pediatrics*. 2023;151(2):e2022058823.
<https://doi.org/10.1542/peds.2022-058823>
4. Koyner JL, Mackey RH, Rosenthal NA, Carabuena LA, Kampf JP, Echeverri J et al. Health care resource utilization and costs of persistent severe acute kidney injury (PS-AKI) among hospitalized stage 2/3 AKI patients. *KIDNEY* 360. 2023;360(4):316-25.
<https://doi.org/10.34067/KID.0005552022>
5. Schreider A, Moraes Júnior CS, Fernandes NMS. Three years evaluation of peritoneal dialysis and hemodialysis absorption costing: Perspective of the service provider compared to funds transfers from the public and private healthcare systems. *Braz J Nephrol*. 2022;44(2):204-14.
<https://doi.org/10.1590/2175-8239-JBN-2021-0118>
6. Pinheiro G, Ruiz PBO, Lima AFC. Custos dos tratamentos destinados a pacientes adultos com Covid-19 em cuidados intensivos: Revisão integrativa. *Rev Paul Enferm*. 2023;34:a03.
<https://doi.org/10.33159/25959484.repen.2023v34a03>
7. Oliveira IA. Síndrome da lesão renal aguda. Cap 29. In: Moraes Lu, Francescantonio PLC, Pereira MS, Sarkis CM, Taniguchi ALP, organizadores. *As bases do diagnóstico sindrômico*. Guarujá, SP: Editora Científica Digital Ltda; 2023. 222-7. Disponível em:
<https://downloads.editoracientifica.com.br/articles/230312429.pdf>
8. Zarbock A, Nadim MK, Pickkers P, Gomez H, Bell S, Joannidis M et al. Sepsis-associated acute kidney injury: consensus report of the 28th acute disease quality initiative workgroup. *Nature Reviews Nephrology*. 2023;19:401-17.
<https://doi.org/10.1038/s41581-023-00683-3>
9. Moreira-Quijije JX, Tigua-Ponce JA, Alcocer-Diaz S. Prevalencia mundial y factores de riesgo de la insuficiencia renal aguda en poblaciones pediátricas. *MQRInvestigar*. 2023;7(3):323-43.
<https://doi.org/10.56048/MQR20225.7.3.2023.323-343>
10. De Clercq L, Ailliet T, Schaubroeck H, Hoste EAJ. Acute and chronic cardiovascular consequences of acute kidney injury: A systematic review and meta-analysis. *Cardiorenal Med*. 2023;13(1):26-33.
<https://doi.org/10.1159/000527198>

11. Meena J, Yadav J, Kumar J, Dawman L, Tiewosh K, Mittal A et al. Incidence, predictors, and short-term outcomes of acute kidney injury in children with diabetic ketoacidosis: A systematic review. *Pediatric Nephrology*. 2023;38:2023-31.
<https://doi.org/10.1007/s00467-023-05878-1>
12. Turgut F, Awad AS, Abdel-Rahman EM. Acute kidney injury: Medical causes and pathogenesis. *J Clin Med*. 2023;12(1):375.
<https://doi.org/10.3390/jcm12010375>
13. Ethgen O, Murugan R, Echeverri J, Blackowicz M, Harenski K, Ostermann M. Economic analysis of renal replacement therapy modality in acute kidney injury patients with fluid overload. *Critical Care Explorations*.
<https://doi.org/10.1097/CCE.0000000000000921>
14. Hu X, Yang M, Li X, Chen Y, Ouyang S, Li L. Knowledge, attitude, and practice of nephrologists on the decision for renal replacement therapy. *BMC Public Health*. 2023;23:654.
<https://doi.org/10.1186/s12889-023-15530-0>
15. Centers for Disease Control Prevention – CDC. Water use in dialysis. [acesso 2023 Jul 21]. Disponível em:
<https://www.cdc.gov/dialysis/guidelines/water-use.html>
16. Saito AK, Wu S. High-grade *Staphylococcus lugdunensis* bacteremia in a patient on home hemodialysis. *Fed Pract*. 2023;40(4):123-7.
<https://doi.org/10.12788/fp.0361>
17. Tai T, Yamamoto T, Yamaguchi K, Watanabe M, Tanaka H, Muraki Y et al. Evaluation of the meropenem dosage and administration schedule in patients with bacteremia initial therapy. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2023;29(8):749-53.
<https://doi.org/10.1016/j.jiac.2023.04.004>
18. Hilinski EG, Almodovar AAB, Silva FPL, Pinto TJA, Bugno A. Is dialysis water a safe component for hemodialysis treatment in São Paulo State, Brazil? *Braz J Pharm Sci*. 2020;56:e17835.
<https://dx.doi.org/10.1590/s2175-97902019000417835>
19. Jesus PR, Ferreira JAB, Carmo JS, Albertino SRG, Vicentini Neto SA, Santos LMG et al. Monitoring the quality of the water used in mobile dialysis services in intensive care units in the city of Rio de Janeiro. *Braz J Nephrol*. 2022;44(1):32-41.
<https://doi.org/10.1590/2175-8239-JBN-2020-0217>

20. Almodovar AAB, Buzzo ML, Silva FPL, Hilinski EG, Bugno A. Effectiveness of the monitoring program for ensuring the quality of water treated for dialysis in the state of São Paulo. *Braz J Nephrol.* 2018;40(4):344-50.
<https://doi.org/10.1590/2175-8239-JBN-2018-0026>
21. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 154, de 15 de junho de 2004. Estabelece o regulamento técnico para o funcionamento dos serviços de diálise. *Diário Oficial da União.* Brasília, DF, 17 jun 2004. Seção 1(115):65-9.
22. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 11, de 13 de março de 2014. Dispõe sobre os requisitos de boas práticas de funcionamento para os serviços de diálise e dá outras providências. *Diário Oficial da União.* Brasília, DF, 14 mar 2014. Seção 1(50):40-2.
23. Instituto Adolfo Lutz. Manual para Orientação – Análise de Água no Instituto Adolfo Lutz. Segunda Revisão, 2012. Disponível em:
http://www.ial.sp.gov.br/resources/editorinplace/ial/2016_4_25/manual_de_colheita_de_agua.pdf?attach=true
24. American Public Health Association (US) – APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater. 23^a ed. Washington, DC. 2017. ISBN: 978-0-87553-287-5.
25. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Farmacopeia Brasileira. 2019. 6^a ed. v.1. Disponível em:
<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira/VOLUME1FB6at2Erratappdfcomcapa.pdf>
26. Cesar Neto, JC. A crise hídrica no estado de São Paulo. *Geosp – Espaço e Tempo (Online).* 2016;19(3):479-84.
<http://dx.doi.org/10.11606/issn.2179-0892.geosp.2015.101113>
27. Marengo JA, Nobre CA, Seluchi ME, Cuartas A, Alves LM, Mendiondo EM et al. A seca e a crise hídrica de 2014-2015 em São Paulo. *Revista USP.* 2015;106:31-44.
<https://doi.org/10.11606/issn.2316-9036.v0i106p31-44>
28. Soriano E, Londe LR, Di Gregorio LT, Coutinho MP, Santos LBL. Water crisis in São Paulo evaluated under the disaster's point of view. *Ambient Soc.* 2016;19:21-42.
<https://doi.org/10.1590/1809-4422asoc150120r1v1912016>
29. Totaro M, Casini B, Valentini P, Miccoli M, Giorgi S, Porretta A et al. Evaluation and control of microbial and chemical contamination in dialysis water plants of Italian nephrology wards. *Journal of Hospital Infection.* 2017;97:169-74.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2017.05.011>

30. Parreira AG, Sousa FV, Rocha AP, Souza TM. Monitoramento microbiológico em sistema inovador e sustentável de tratamento de água destinada à hemodiálise. RAHIS. 2017;48-65.
<https://doi.org/10.21450/rahis.v13i3.3609>
31. Gaibor NGT, Sacaluga LG, Ojeda FC, Cotén JRM, Lazo MS. Thermal disinfection in hemodialysis using the A0 concept as dispenser. Nefrologia. 2019;39(5):482-8.
<https://doi.org/10.1016/j.nefro.2019.10.006>
32. Iorio B, Micco L, Bruzzese D, Nardone L, Russo L, Formisano P et al. Ultrapure dialysis water obtained with additional ultrafilter may reduce inflammation in patients on hemodialysis. J Nephrol. 2017;30:795-801.
<https://doi.org/10.1007/s40620-017-0422-x>
33. Humadat YR, Al-Naseri SK, Abdul-Majeed MA, Jaafar MS, Al-Naemi AN, Najim LA. Membrane filtration enhanced by ultrasound for reducing endotoxin in dialysis water. Desalination and Water Treatment. 2022;272:31-6.
<https://doi.org/10.5004/dwt.2022.28842>
34. Morghad T, Hassaine H, Boutarfi Z, Gaouar S, Bellifa S, Meziani Z. Bacteriological water quality and biofilm formation in the treatment system of the hemodialysis unit in Tlemcen, Algeria. Seminars in Dialysis. 2020;33:394-401.
<https://doi.org/10.1111/sdi.12898>
35. Tawab MEAE, Arafa RAM, Helmy A, Daigham GES. Management of water quality in some dialysis centers between 1 April 2020 and 31 March 2021 in Cairo hospitals, Egypt. The Arab Journal of Scientific Research. 2023;7(7):85-102.
<https://doi.org/10.21608/ajsr.2023.296409>
36. Câmara SAV, Pivetta ANS, Uehara GHM. Pesquisa de endotoxinas em água de hemodiálise. Vigil sanit debate. 2018;6(4):42-6.
<https://doi.org/10.22239/2317-269x.01158>
37. Bolasco P. The production of on-line dialysis water for extracorporeal dialysis: Proposals for an increased safety upgrade: A viewpoint. Journal of Nephrology. 2020;33:405-15.
<https://doi.org/10.1007/s40620-019-00667-2>
38. Shahryari A, Nikaeen M, Hatamzadeh M, Dastjerdi MV, Hassanzadeh A. Evaluation of bacteriological and chemical quality of dialysis water and fluid in Isfahan, Central Iran. Iran J Public Health. 2016;45(5):650-6. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4935709/pdf/IJPH-45-650.pdf>


39. Lima BS. Avaliação do desempenho essencial das máquinas de hemodiálise de um EAS de grande porte [trabalho de conclusão de curso]. Uberlândia (MG): Universidade Federal de Uberlândia; 2020. Disponível em:
<https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/29941>
40. Gomes AJS. O impacto da gestão da manutenção nos equipamentos de hemodiálise na segurança e qualidade do atendimento do paciente [trabalho de conclusão de curso de pós-graduação do MBA]. Salvador (BA): Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial. 2018. Disponível em:
<http://repositoriosenaiba.fieb.org.br/bitstream/fieb/1403/1/AILTON%20JOS%c3%89%20DE%20SOUZA%20GOMES.pdf>





Avaliação da rotulagem de cosméticos clareadores de pele comercializados em Juazeiro, Bahia, Brasil

Evaluation of the labeling of skin lightening cosmetics marketed in Juazeiro, Bahia, Brazil

Amanda Santana Gomes^{1,2} , Raquel Deodato Silva Rodrigues¹ , Joyce Kelly Marinheiro da Cunha Gonsalves^{1*} 

¹ Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, PE, Brasil.

² Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, PE, Brasil.

*Autor de correspondência/Corresponding author: joyce.gonsalves@univasf.edu.br

Recebido/Received: 15.08.2023 – Aceito/Accepted: 28.11.2023

RESUMO

A hiperpigmentação da pele, principalmente na região facial, resulta em um incômodo estético que afeta a qualidade de vida do indivíduo, levando a busca por produtos clareadores. Este estudo avaliou a conformidade dos rótulos de cosméticos comercializados como “produtos clareadores de pele”, bem como a existência de substâncias clareadoras proibidas neste tipo de produto. Foi realizada uma análise transversal descritiva qualitativa no período de abril a maio de 2022, em busca por cosméticos comercializados em estabelecimentos farmacêuticos e lojas de produtos cosméticos localizadas no município de Juazeiro/BA. Foram selecionados 18 produtos e os desvios de rotulagem identificados com base na legislação utilizada vigente à época do estudo, foram: ausência de informações sobre advertências/restrições de uso e número de registro incompleto, equivalente a 16,7% (n = 3) das amostras. A hidroquinona, proibida nesse tipo de produto, foi encontrada em um cosmético (5,5%). Embora a maioria das amostras analisadas esteja em conformidade com as exigências legais, os resultados evidenciam descumprimentos, indicando a necessidade de uma fiscalização mais rigorosa a fim de evitar possíveis danos à saúde do usuário.

Palavras-chave. Preparações Clareadoras de Pele, Hiperpigmentação, Rotulagem de Cosméticos.

ABSTRACT

Skin hyperpigmentation, particularly in the facial region, can be an aesthetic nuisance that affects an individual's quality of life, leading them to seek out whitening products. This study evaluated the compliance of cosmetics labels marketed as “skin lightening products”, and assessed the presence of whitening substances prohibited in this type of product. A qualitative, descriptive, cross-sectional analysis was conducted between April and May 2022 in Juazeiro, Bahia, Brazil, focusing on cosmetics sold in pharmaceutical establishments and cosmetic product stores. Eighteen products were selected, and labeling deviations identified based on the legislation in force at the time of the study. These included a lack of information on warnings/use restrictions and incomplete registration numbers, affecting 16.7% (n = 3) of the samples. Hydroquinone, prohibited in this type of product by the legislation, was detected in one cosmetic (5.5%). Although most of the analyzed samples comply with legal requirements, the observed non-compliance highlights the need for more stringent inspection to prevent potential harm to user's health.

Keywords. Skin Lightening Preparations, Hyperpigmentation, Cosmetic Labeling.

INTRODUÇÃO

A hiperpigmentação da pele é uma condição ocasionada por distúrbios na produção da melanina e é gerada a partir de fatores como a exposição contínua à radiação ultravioleta (UV), mediadores inflamatórios, radicais livres e hormônios¹. Quando na face, a hiperpigmentação está geralmente associada a um incômodo estético afetando a aparência, autoestima e qualidade de vida².

Assim, produtos clareadores de pele estão disponíveis comercialmente em diversas formulações cosméticas a fim de oferecer uma alternativa para a correção de manchas oriundas da hiperpigmentação dérmica³. Estas formulações contam com ativos clareadores, como o ácido kójico, ácido salicílico, niacinamida, alfa-arbutin, substâncias naturais, e antioxidantes, como o ácido ascórbico⁴. O mecanismo de ação dos agentes clareadores, conforme descrito na literatura científica, baseia-se na diminuição da síntese de melanina (atuando principalmente na ação das enzimas tirosinase, Tyrp1 e Tyrp2), na degradação do pigmento ou até mesmo na eliminação de queratinócitos carregados com a molécula de melanina, resultando na redução da hiperpigmentação cutânea⁵.

Os clareadores de pele são classificados no Brasil de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 752, de 19 setembro de 2022⁶, publicada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), como Produtos de Grau 2. Esses produtos possuem indicações específicas e suas características exigem comprovação de segurança e/ou eficácia, bem como informações de cuidados, modo e restrições de uso. A rotulagem obrigatória geral preconizada pela legislação compreende: nome e grupo/tipo de produto, marca, número de registro, lote, prazo de validade, conteúdo, país de origem, fabricante ou importador, domicílio do fabricante ou importador, modo de uso, advertências/restrições de uso e a lista de ingredientes/composição.

Assim, através da análise do rótulo é possível identificar a presença de ingredientes de uso proibido em cosméticos, que são listados na Resolução RDC nº 529, de 04 de agosto de 2021⁷, por oferecerem riscos inerentes à saúde humana. Em cosméticos clareadores de pele, estão entre as substâncias proibidas a tretinoína (ácido retinóico e seus sais) e a 1,4-dihidroxibenzeno (hidroquinona), por apresentarem uma série de efeitos adversos descritos na literatura, como irritação e/ou sensibilização da pele, dermatites de contato, ocronose, alergia, entre outros⁸.

Com a indústria cosmética endossando e tornando acessíveis diversas formulações “clareadoras”, há a utilização desses produtos de venda livre sem supervisão, expondo o consumidor a potenciais riscos e efeitos adversos da utilização sem o devido acompanhamento de um profissional habilitado⁹. Desse modo, este estudo teve como objetivo avaliar produtos clareadores de pele em relação ao cumprimento de exigências estabelecidas para a rotulagem de cosméticos e verificar a existência de substâncias clareadoras de pele proibidas neste tipo de produto.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo apresenta uma análise transversal descritiva qualitativa de rótulos de embalagens cosméticas contendo ativos clareadores. Para este objetivo, foi realizada uma busca por cosméticos caracterizados como “produtos clareadores de pele” de diferentes marcas comercializados em centros comerciais, sendo dois estabelecimentos farmacêuticos e quatro lojas de produtos cosméticos, situados na região central do município de Juazeiro/BA, no período de abril a maio de 2022.

Os rótulos foram fotografados e seus dados transcritos para posterior análise. Os critérios de seleção definidos incluíam as variáveis formulações de aplicação facial e ênfase na embalagem de termos referentes à ação clareadora do produto. Foram excluídos cosméticos de aplicação em áreas que não faciais, como pescoço, colo, mãos e corpo.

Os rótulos dos produtos selecionados foram analisados quanto à presença dos itens obrigatórios descritos pelo anexo V da Resolução RDC nº 07, de 10 de fevereiro de 2015¹⁰, legislação vigente à época do estudo e que, posteriormente, foi revogada pela Resolução RDC nº 752, de 19 de setembro de 2022⁶, a qual dispõe sobre a rotulagem obrigatória geral de cosméticos. Dentre as alterações que constam nesta última, está a exclusão da descrição do domicílio do fabricante/importador e foi acrescida a obrigatoriedade da inclusão de dados de atendimento ao consumidor (telefone, e-mail, página da *web* ou outro meio). Contudo, os parâmetros avaliados neste trabalho não sofreram modificações.

Além disso, foi investigado se os ativos descritos na embalagem estavam presentes na lista de ingredientes/composição e, posteriormente, os produtos foram avaliados, ainda, quanto à presença de ativos de uso proibido em cosméticos contidas na Resolução RDC nº 529, de 04 de agosto de 2021⁷.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A regulamentação de produtos cosméticos passa pela adequação das embalagens usadas para os fins aos quais se destinam, nas quais informações básicas e acessíveis devem ser ilustradas e destacadas pelos fabricantes, visando o alcance máximo da informação. Contudo, por vezes, informações incompletas ou subjetivas podem levar a erros de aplicação e graves consequências ao usuário. Esta pesquisa primou pela observação de rótulos de embalagens de produtos ditos clareadores, comercializados na região central do município de Juazeiro/BA, Brasil. A escolha do local comercial se deu devido à boa localização e fácil acesso a diversos produtos e formas farmacêuticas.

Ao todo, 30 cosméticos diferentes foram encontrados, dos quais, 18 enquadraram-se nos requisitos mínimos para comporem o estudo e foram selecionados. A análise dos rótulos seguiu conforme a Resolução RDC nº 07 (Anexo V), de 10 de fevereiro de 2015¹⁰, vigente à época do estudo, a qual tratava sobre os requisitos mínimos e obrigatórios que deveriam constar na rotulagem de um cosmético. Os produtos

estudados foram representados por numerais (1 a 18), a fim de preservar a identidade do fabricante, e todos os dados analisados foram expostos na **Tabela 1**.

Tabela 1. Resultado da análise dos rótulos seguindo o modelo de rotulagem obrigatória geral de produtos cosméticos da Resolução RDC nº 7, de 10 de fevereiro de 2015¹⁰

Parâmetro	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Nome e grupo/tipo de produto	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Marca	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Número de registro	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓
Lote	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Prazo de validade	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Conteúdo	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
País de origem	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Fabricante/importador	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Domicílio do fabricante/importador	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Modo de uso	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Advertências/restrições de uso	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Ingredientes/composição	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Legenda: ✓ – Consta; X – Não consta

Dos 18 produtos analisados, 16,7% (n = 3) estavam em desacordo com a rotulagem obrigatória preconizada pela citada Resolução, sendo que um (n = 1) produto apresentou o número do registro incompleto e outros dois (n = 2) produtos não apresentaram informações a respeito de advertências e/ou restrições de uso. O número de registro do produto é um componente essencial e corresponde ao número de identificação da empresa e o número de autorização de comercialização¹⁰. No cosmético em questão, o fabricante destacou apenas os cinco primeiros números ocultando com a letra 'x' o restante da numeração, dificultando a busca por informações a respeito do produto no sítio eletrônico da ANVISA. Desse modo, isto pode causar impactos relacionados à confiança quanto à procedência, eficácia e segurança do produto para uso pelo consumidor. Segundo a Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976¹¹, quando há ausência deste tipo de informação, deve ser realizada a retirada imediata do produto do comércio e, então, exigida a regularização desta pendência sob pena de apreensão do produto em todo o território nacional.

Os dois (n = 2) produtos que não apresentaram em seus rótulos informações sobre advertências e restrições de uso também estavam em desacordo com a resolução vigente à época do estudo. A ausência dessas informações deixa margem para a utilização incorreta, sendo preocupante por expor a população a possíveis danos à saúde, como irritações na pele, queimaduras e alergias, os quais podem ser evitados ou minimizados com a presença desse tópico informativo¹².

Por mais que a legislação seja clara e a fiscalização rigorosa, a observância de erros de rotulagens é frequentemente encontrada. Em seu estudo, Rito et al¹² analisaram o rótulo de 120 produtos cosméticos,

dentre eles alguns clareadores de pele, e constataram que apenas 6% de todos os produtos avaliados estavam em total acordo com a resolução vigente. Foram detectados os seguintes desvios de rotulagem: ausência de número de registro, erros no nome do produto, modo de uso, fabricante/importador, embalagem dos produtos, data de validade e fabricação, ausência de número de lote e textos de advertências/restrições de uso. Estes achados evidenciam que é comum encontrar cosméticos irregulares no comércio e de fácil acesso à população, caracterizando como uma ocorrência grave e que merece atenção, pois pode oferecer inúmeros riscos à saúde do consumidor, como o aparecimento de reações adversas, por exemplo.

A identificação clara do ativo no rótulo do produto faz-se necessária para que seja possível verificar se o cosmético apresenta substâncias relacionadas à sua atividade principal. Dentre as amostras avaliadas neste estudo, o agente ativo clareador foi facilmente identificado na embalagem primária, bem como na embalagem secundária da maioria dos produtos (77,8%, n = 14). Após a análise dos dados, foram contabilizadas 21 substâncias descritas como clareadoras (**Tabela 2**).

Tabela 2. Levantamento dos ativos com potencial clareador encontrados nos cosméticos de venda livre

Ativo clareador	
Alfa-arbutin	Decapeptídeo-12
Ácido Ascórbico	Extratos de folhas de <i>Ginkgo biloba</i>
Ácido Etil Ascórbico	Feniletil Resorcinol
Ácido Ferúlico	Hidroquinona
Ácido Glicólico	Isobutylamido Thiazolyl Resorcinol
Ascorbil Glucosídeo	Niacinamida
Ácido Kójico	Óleo de Rosa Mosqueta
Ácido Salicílico	Palmitato de Ascorbila
Ácido Tranexâmico	Resorcinol
<i>Calycophyllum spruceanum</i>	Retinol
Capryloyl Salicylic Acid	

Dos 18 cosméticos estudados, 14 evidenciaram na embalagem o ativo responsável pelo efeito clareador da pele. Porém, dois (n = 2) desses produtos (11,1%) não apresentaram na lista de ingredientes/composição o ativo clareador informado, sendo a Niacinamida, Ácido Kójico e Procerad, o que pode levantar preocupações a respeito da precisão da rotulagem. Outros quatro (n = 4) cosméticos (22,2%) não evidenciaram na embalagem o ativo clareador, mas este se encontrava bem descrito na lista de ingredientes/composição.

Ademais, foi detectado um (n = 1) produto (5,5% das amostras) contendo ativo proibido em aplicações cosméticas, conforme preconizado pela RDC nº 529/2021⁷, sendo este a hidroquinona, presente em uma concentração de 4%, conforme rotulagem. Este ativo em concentrações acima de 2% pode ocasionar, em seu uso prolongado, efeitos adversos como o cronose, dermatite, catarata e milium colóide pigmentado¹³. Ribas et al¹⁴ publicaram um relato de caso de quatro pacientes que desenvolveram o cronose devido ao uso prolongado de clareadores a base de hidroquinona em concentrações entre 2 e 6%, com relatos de referidas exposições à radiação UV, sem uso regular de protetor solar, evidenciando que existe

correlação entre o aparecimento de efeitos adversos com o uso desse ativo, nas concentrações estudadas e sem supervisão de um profissional habilitado. A Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976, em seu artigo 6º traz que se comprovado que determinado produto é nocivo à saúde, este deve ser retirado imediatamente do comércio e exigido a modificação da fórmula e composição sob pena de cancelamento do registro e da apreensão do produto, em todo o território nacional¹¹.

CONCLUSÃO

Sendo um produto de fácil acesso, pela disponibilidade do mercado ou pelo valor economicamente acessível, os produtos com finalidade clareadora da pele, em sua maioria, apresentam-se confiáveis para a utilização pela população em geral. Porém, mesmo sendo obrigatória a presença de informações essenciais para compor o rótulo desse tipo de produto, ainda há descumprimentos das legislações no que diz respeito às informações de número de registro e advertências e restrições de uso, além da presença de substância proibida em cosméticos. É necessário que a empresa detentora do produto atenda às legislações vigentes antes de lançá-lo no mercado e que exista uma maior fiscalização pelos órgãos de vigilância em busca de produtos irregulares para que sejam corrigidos, a fim de minimizar possíveis e eventuais danos de qualquer natureza ao consumidor.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não existir conflitos de interesse.

FINANCIAMENTO

Não declarado pelos autores.

AGRADECIMENTO

Não declarado pelos autores.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Amanda Santana Gomes: conceituação, metodologia, pesquisa e redação. Raquel Deodato Silva Rodrigues: análise formal e escrita. Joyce Kelly Marinheiro da Cunha Gonsalves: conceituação, metodologia, redação, revisão, edição e supervisão.

NOTA DE APRESENTAÇÃO

Os resultados desta pesquisa integram o Trabalho de Conclusão de Curso de Amanda Santana Gomes, intitulada “Cosméticos de venda livre de ação clareadora: análise de rotulagem e investigação da ação dos ativos descritos”, defendido no ano de 2022, no Colegiado de Farmácia da Universidade Federal do Vale do São Francisco.

REFERÊNCIAS

1. Chen Q, Kou L, Wang F, Wang Y. Size-dependent whitening activity of enzyme-degraded fucoïdan from *Laminaria japonica*. Carbohydrate Polymers. 2019;225:115211. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115211>

2. Kim S, Seo H, Mahmud HA, Islam MI, Sultana OF, Lee Y et al. Melanin bleaching and melanogenesis inhibition effects of *Pediococcus acidilactici* PMC48 isolated from korean perilla leaf kimchi. J Microbiol Biotechnol. 2020;30(7):1051-59.
<https://doi.org/10.4014/jmb.2003.03007>
3. Gillbro JM, Olsson MJ. The melanogenesis and mechanisms of skin-lightening agents - Existing and new approaches. Int J Cosmet Sci. 2011;33(3):210-221.
<https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2010.00616.x>
4. Sanadi RM, Deshmukh R. The effect of Vitamin C on melanin pigmentation – A systematic review. Journal of Oral and Maxillofacial Pathology. 2020;24(2):374.
https://doi.org/10.4103/jomfp.jomfp_207_20
5. Guerrero D. Prise en charge dermo-cosmétique des hyperpigmentations. Ann Dermatol Venereologie. 2012;139(3):S115-S118.
<https://doi.org/10.1016/S0151-9638%2812%2970121-7>
6. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 752, de 19 de setembro de 2022. Dispõe sobre a definição, a classificação, os requisitos técnicos para rotulagem e embalagem, os parâmetros para controle microbiológico, bem como os requisitos técnicos e procedimentos para a regularização de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 21 set 2022. Seção 1(180):177-81.
7. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 529, de 04 de agosto de 2021. Dispõe sobre a lista de substâncias que não podem ser utilizadas em produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes e internaliza a Resolução GMC MERCOSUL nº 62/14, alterada pela Resolução GMC MERCOSUL nº 37/20. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 11 ago 2021. Seção 1(151):101-18.
8. Katsambas AD, Stratigos AJ. Depigmenting and bleaching agents: coping with hyperpigmentation. Clin Dermatol. 2001;19(4):483-8.
[https://doi.org/10.1016/s0738-081x\(01\)00182-1](https://doi.org/10.1016/s0738-081x(01)00182-1)
9. Saade DS, Maymone MBC, Secemsky EA, Kennedy FK, Vashi NA. Patterns of over-the-counter lightening agent use among patients with hyperpigmentation disorders: a united states-based cohort study. J Clin Aesthet Dermatol. 2018;11(7):26-30. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6057735/>

10. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 7, de 10 de fevereiro de 2015. Dispõe sobre os requisitos técnicos para a regularização de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 11 fev 2015. Seção 1(29):39-43.
11. Presidência da República (BR). Casa Civil. Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, 23 set. de 1976. Seção 1:12647.
12. Rito PN, Presgrave RF, Alves EN, Bôas MHSV. Perfil dos desvios de rotulagem de produtos cosméticos analisados no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde entre 2005 e 2009. Vig Sanit Debate. 2014;2(3):44-50.
<https://doi.org/10.3395/vd.v2n3.199>
13. Jeon JS, Kim HT, Kim MG, Oh MS, Hong SR, Yoon MH et al. Simultaneous determination of water-soluble whitening ingredients and adenosine in different cosmetic formulations by high-performance liquid chromatography coupled with photodiode array detection. Int J Cosmet Sci. 2016;38(3):286-93.
<https://doi.org/10.1111/ics.12292>
14. Ribas J, Schettini APM, Cavalcante MSM. Exogenous ochronosis hydroquinone induced: a report of four cases. An Bras Dermatol. 2010;5(85):669-703.
<https://doi.org/10.1590/S0365-05962010000500017>





O consumo de substitutos de origem vegetal é nutricionalmente mais vantajoso que os produtos cárneos?

Is the consumption of plant origin substitutes nutritionally more advantageous than meat products?

Rosana Ribeiro Christ¹, Christiane Mileib Vasconcelos^{1,2*} 

¹ Curso de Nutrição, Universidade Vila Velha, Vila Velha, ES, Brasil.

² Laboratório de Biotecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, Universidade Vila Velha, Vila Velha, ES, Brasil.

*Autor de correspondência/Corresponding author: christiane.mileib@uvv.br

Recebido/Received: 17.04.2023 – Aceito/Accepted: 21.12.2023

RESUMO

A busca por um padrão alimentar mais saudável, bem como fatores éticos e de sustentabilidade relacionados ao consumo de carne, vem fazendo com que a cada dia mais pessoas se tornem adeptas a dietas à base de plantas. Concomitantemente, com o aumento de adeptos a essas dietas, vem crescendo nos países ocidentais a oferta de alimentos industrializados de base vegetal, que tem como objetivo substituir os produtos cárneos. O presente estudo comparou os rótulos de produtos de origem animal (POA) e seus análogos de origem vegetais (POV) comercializados nas principais redes de supermercados da grande Vitória, Espírito Santo, e avaliou a contribuição nutricional deles ao consumidor. Foram avaliadas 80 embalagens de produtos, sendo 42 de POA e 38 POV. POV, quando comparados aos POA, não apresentaram diferenças ($p > 0,05$) quanto ao valor calórico, proteínas, gordura total, gordura saturada e sódio. Se sobressaindo apenas no maior teor de carboidratos e fibras e em não possuir gorduras *trans* em sua composição. Assim, conclui-se que, os POV possuem equivalência em alguns dos constituintes nutricionais analisados. Por isso, se não há restrições para o consumidor, seja por questões de saúde, cultura ou hábito, a substituição de POA por POV não se faz nutricionalmente tão superior.

Palavras-chave. Dieta à Base de Plantas, Informação Nutricional, Rotulagem de Alimentos, Alimentos Ultraprocessados.

ABSTRACT

The growing interest in healthier eating patterns, coupled with ethical and sustainability concerns about meat consumption, has led to a rise in the adoption of plant-based diets. In response to this trend, Western countries have witnessed a surge in the availability of plant-based processed foods aiming to replicate meat products. This study examines the labels of commercially available meat products (MPs) and their plant-based alternative (PbAs) found in major supermarket chains in greater Vitória, Espírito Santo, Brazil. It further evaluates their nutritional content and potential impact on consumer choice contribution to the consumer. Eighty product packages were assessed, comprising 42 MPs and 38 PbAs. Compared to MPs, PbAs showed no significant differences ($p > 0,05$) in caloric value, protein, total fat, saturated fat, or sodium. Notably, PbAs had higher carbohydrate and fiber content and no trans fats. Therefore, PbAs offer comparable levels of several analyzed nutrients. Consequently, in the absence of specific dietary restrictions (health, cultural, or habitual), substituting MPs with PbAs does not confer significant nutritional advantages.

Keywords. Diet Vegetarian, Nutritional Facts, Food Labeling, Ultra-processed foods.

INTRODUÇÃO

A carne é composta principalmente por tecido muscular estriado esquelético, além dos tecidos conjuntivo, epitelial e nervoso. Em relação à sua composição nutricional, as carnes podem conter: 65 a 85% de umidade, 16 a 22% de proteína, 3 a 13% de gordura, cerca de 1% de carboidratos (glicogênio), além de vitaminas e minerais, com destaque para as vitaminas B2, B3 e B12, o ferro-heme e o zinco. Já os produtos cárneos processados tendem a ser mais densos em energia, gorduras saturadas e *trans*, açúcar adicionado e sódio, bem como apresentar maior quantidade de aditivos em sua composição^{1,2}.

Produtos cárneos são aqueles obtidos de carnes, miúdos e de partes comestíveis de diferentes espécies animais, que passam por tratamento físico, químico e/ou biológico, em processos que podem envolver a adição de ingredientes, aditivos ou coadjuvantes de tecnologia³.

O alto consumo de carne vermelha, especialmente de carne processada, está associado a um maior risco de desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT's), como diabetes mellitus tipo 2, doenças cardiovasculares e câncer, além do aumento de risco de mortalidade por essas doenças⁴. Associado aos malefícios individuais que o consumo excessivo de carne pode causar, a produção gera impacto no meio ambiente devido a emissão de gases de efeito estufa, ocupação de áreas terrestres destinada ao cultivo de ração, abrigo do gado, uso de água e alterações na qualidade dessa água por conta de resíduos animais, além do grande emprego de fertilizantes e de pesticidas⁵.

Nesse sentido, a busca por um padrão alimentar mais saudável, bem como fatores éticos e de sustentabilidade relacionados ao consumo de carne, vem fazendo com que a cada dia mais pessoas se tornem adeptas a dietas à base de plantas. O termo “dietas à base de plantas” ou “*plant based*” compreende uma ampla gama de padrões alimentares voltados ao maior consumo de produtos de origem vegetal como hortaliças, leguminosas, frutas e sementes, assim como a retirada ou ingestão moderada de alimentos de origem animal. Esses padrões alimentares abrangem os flexitarianos (com baixo consumo de carne), lacto/ovo-vegetarianos, pescetarianos (consumo de frutos do mar) e veganos, que por sua vez, não consomem e nem utilizam produtos de origem animal⁶.

Com isso, essas dietas tendem a estimular o maior consumo de carboidratos complexos, fibras e compostos bioativos e a menor ingestão de gorduras totais, especialmente gorduras saturadas e *trans*, e maior consumo de ácidos graxos insaturados, trazendo como benefício o menor risco de desenvolvimento de DCNT's e a menor taxa de mortalidade por essas doenças. Ademais, a produção da proteína vegetal requer menor uso de terra, água e energia, quando comparado à produção de carne bovina, além da diminuição da emissão de gases de efeito estufa^{7,8}.

Concomitantemente com o aumento de adeptos a dietas à base de plantas, vem crescendo nos países ocidentais a oferta de alimentos industrializados de base vegetal que tem como objetivo substituir os produtos cárneos, sendo grande parte desses produtos ultraprocessados. Assim, apesar dessas dietas estarem associadas a uma maior qualidade nutricional, a substituição frequente de alimentos *in natura* e minimamente processados por esses produtos pode ser prejudicial, devido à baixa qualidade nutricional e potenciais efeitos adversos associados ao consumo de alimentos ultraprocessados⁹.

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo comparar os rótulos de produtos cárneos e seus análogos vegetais comercializados nas principais redes de supermercados da grande Vitória, Espírito Santo, e avaliar sua contribuição nutricional ao consumidor.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram visitadas 10 redes de supermercados da Grande Vitória, Espírito Santo, no período de agosto a outubro de 2022, sendo um total de 80 embalagens de produtos cárneos e seus análogos de origem vegetal, fotografados para posterior análise.

Os produtos tinham diferentes tamanhos de porção, assim, todas as porções e valores nutricionais foram ajustados para representar uma porção de 80 g, sendo essa a quantidade encontrada na maioria dos rótulos.

A composição nutricional do produto foi analisada observando os componentes das amostras, como calorias, carboidratos, proteína, gordura total, gordura saturada, gordura *trans*, fibras e sódio.

Em relação à análise estatística, foi realizado um teste T para comparação geral dos produtos divididos em 2 grupos, produtos de origem animal (POA) e produtos de origem vegetal (POV), quanto aos constituintes de rotulagem obrigatória¹⁰ (calorias, carboidratos, proteínas, gordura total, gorduras saturadas, fibras e sódio), além de vitaminas e minerais presentes em algumas tabelas nutricionais.

A comparação dos diversos produtos em relação aos constituintes de rotulagem obrigatória¹⁰ foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) e, para resultados significativos ($p \leq 0,05$), as médias foram comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. Esses resultados foram analisados usando o software SAS (*Statistical Analysis System, SAS®*, University Edition), disponível em formato *online*. As vitaminas e minerais declarados foram apresentados como média e, quando possível, desvio padrão, para análise descritiva.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram encontrados nas redes de supermercados, um total de 80 produtos, dos quais 42 eram produtos cárneos e 38 análogos vegetais. Os produtos cárneos e seus análogos à base de plantas encontrados foram: hambúrguer, almôndega, kibe, empanado, salsicha, atum, frango e carne moída.

A comparação generalizada da composição dos produtos cárneos e análogos vegetais pode ser analisada na [Tabela 1](#).

Tabela 1. Média e desvio padrão da composição nutricional por porção de 80 g dos produtos de origem animal (POA) e origem vegetal (POV)

Origem	Animal – POA	Vegetal – POV
Valor calórico (Kcal)	145,32 ± 40,30	153,55 ± 53,14
Carboidratos (g)	3,28 ± 4,54	8,68 ± 6,29*
Proteínas (g)	14,01 ± 4,16	12,09 ± 5,59
Gordura total (g)	8,28 ± 5,28	7,79 ± 3,66
Gordura saturada (g)	3,96 ± 3,27	2,70 ± 2,49
Gordura <i>trans</i> (g)	0,08 ± 0,18*	0,00 ± 0,00
Fibras alimentares (g)	0,49 ± 0,66	3,70 ± 2,23*
Sódio (mg)	399,20 ± 277,79	446,34 ± 230,88

*Indica diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste T

De forma geral, os POV apresentaram valores significativamente ($p \leq 0,05$) maiores para carboidratos e fibras alimentares. Os ingredientes bases dos POV encontrados foram as leguminosas e farinhas como: trigo, milho, arroz e mandioca. Além dos ingredientes bases, também foram encontrados carboidratos como: glicose, sacarose, dextrose e amido; fibra de bambu e milho; e estabilizantes e/ou espessantes, que são compostos que interagem com a água fornecendo uma textura agradável ao produto, como: metilcelulose, carragena, goma guar e goma xantana, todos considerados carboidratos não digeríveis, ou fibras. Já as carnes possuem menos de 1% de carboidratos em sua composição (glicogênio), e não possuem fibras dietéticas. No entanto, vários POA ultraprocessados, também apresentaram em sua composição farinhas (trigo, arroz e milho); fécula de mandioca; açúcar, dextrose e maltodextrina; e estabilizantes e/ou espessantes, como: goma guar, goma xantana e carragena, agregando teores de carboidratos e fibras aos produtos; porém, em quantidades inferiores ($p \leq 0,05$) aos POV.

Valor calórico, proteínas, gordura total, gordura saturada e sódio não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$) entre os POA e POV. Apesar da ausência de diferença estatística quanto aos teores de proteínas, vale ressaltar que além da quantidade, a qualidade em termos de digestibilidade e composição de aminoácidos destas proteínas devem ser discutidos. As proteínas de origem animal são consideradas completas, pois possuem todos os aminoácidos essenciais em quantidades adequadas em sua composição. Quanto às proteínas vegetais, é sabido que elas apresentam menor quantidade de alguns aminoácidos essenciais: metionina, lisina, triptofano e treonina. Além disso, antinutrientes como fitatos, taninos e saponinas podem afetar a biodisponibilidade das proteínas vegetais. No entanto, essas desvantagens podem ser corrigidas, pois a associação de técnicas de pré-preparo e o processo de cocção, tendem a diminuir os antinutrientes dos alimentos. Ainda, a associação de alimentos complementares, como é o caso das leguminosas e dos cereais, aumentam o teor de proteínas e melhoram a qualidade proteica da alimentação, sendo capazes de suprir as necessidades dos indivíduos^{11,12}.

Os POV encontrados são constituídos principalmente por proteínas vegetais. As proteínas de soja, ervilha, grão-de-bico, feijão e glúten de trigo foram os principais ingredientes utilizados, sendo encontrados de diversas formas. A soja é a leguminosa mais comumente utilizada na formulação de análogos de carne. Nos POV a soja foi encontrada como proteína texturizada, concentrada, isolada e hidrolisada. O glúten de trigo, também chamado de *seitan*, obtido a partir da remoção do amido da farinha de trigo é amplamente utilizado, devido a sua capacidade de ligação e formação de uma massa coesa, conferindo aos produtos uma textura mastigável semelhante à carne¹¹.

Quanto aos teores de gordura total e saturada, os POA ultraprocessados que foram analisados possuíam grande quantidade de gorduras por ter como base diversos tipos de cortes de carne e partes comestíveis, além da adição de óleos vegetais em sua composição. Já os POV continham entre seus ingredientes, grande quantidade de óleos vegetais como: soja, girassol, algodão e canola; além de gorduras vegetais, como o óleo de coco e palma.

Com exceção da carne moída e frango, todos os produtos continham algum ingrediente rico em sódio adicionado em sua composição. Notou-se que, dentre esses ingredientes, tanto nos POV quanto POA apresentaram: sal, molho shoyu, fumaça em pó e glutamato monossódico. Além dos ingredientes citados, os POA apresentavam a adição de outros ingredientes derivados de sódio, como os realçadores de sabor guanilato de sódio e inosinato de sódio, os estabilizantes tripolifosfato e polifosfato de sódio e os antioxidantes isoascorbato e eritorbato de sódio. A utilização desses aditivos alimentares traz diversos benefícios à indústria por melhorarem as propriedades físicas dos alimentos. Porém, vale ressaltar que o emprego de aditivos derivados de sódio eleva o consumo diário desse mineral, o que pode ser prejudicial à saúde.

Os POA apresentaram média maior ($p \leq 0,05$) de gordura *trans* quando comparado com os POV. Vale mencionar que os POV deste estudo não apresentaram gordura *trans* em sua composição.

Para avaliação de forma individual dos diferentes POA e POV, foi realizada uma análise individual dos macro e micronutrientes declarados e os resultados são apresentados na [Tabela 2](#).

Tabela 2. Médias e desvio padrão da composição nutricional declarada dos produtos de origem animal (POA) e vegetal (POV) encontrados nas principais redes de supermercados da Grande Vitória, ES, e percentuais de adequação dos micronutrientes de acordo com o VDR (Valor Diário Recomendado) constante na legislação vigente – IN nº 75/2020¹³

Produto	Kcal	CHO g	PTN g	Gtotal g	Gsat g	Gtrans g	Fibras g	Sódio mg	Vit. A µg/%	Vit. B9 µg/%	Vit. B12 µg/%	Ferro mg/%	Zinco mg/%
Almôndega													
POA	166,50 ± 21,13 ^{a-c}	3,28 ± 0,80 ^{f-h}	12,25 ± 1,50 ^{c-e}	11,78 ± 2,18 ^{ab}	5,30 ± 1,73 ^b	0,10 ± 0,20 ^a	1,18 ± 0,69 ^{cd}	424,50 ± 169,75 ^{bc}	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.
POV	133,25 ± 32,62 ^{b-e}	4,93 ± 3,79 ^{e-g}	10,55 ± 1,91 ^{de}	7,95 ± 1,99 ^{b-e}	3,84 ± 2,82 ^{b-e}	0,00 ± 0,00 ^a	3,03 ± 1,85 ^{bc}	379,75 ± 208,48 ^{b-d}	s.i.	s.i.	0,72/30	2,10/15	s.i.
Atum													
POA	98,50 ± 10,97 ^{ef}	0,00 ± 0,00 ^h	22,00 ± 1,15 ^a	1,15 ± 1,11 ^f	0,41 ± 0,33 ^f	0,00 ± 0,00 ^a	0,27 ± 0,31 ^d	264,00 ± 77,36 ^{c-e}	s.i.	s.i.	s.i.	1,10/8	s.i.
POV	166,00 ^{a-c}	7,10 ^{c-e}	12,00 ^{c-e}	10,00 ^{a-c}	2,10 ^{b-f}	0,00 ^a	14,00 ^a	328,00 ^{b-d}	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.
Carne moída													
POA	162,00 ± 40,55 ^{a-c}	0,00 ± 0,00 ^h	15,90 ± 1,47 ^{bc}	9,75 ± 6,12 ^{a-d}	10,25 ± 3,40 ^a	0,22 ± 0,44 ^a	0,00 ± 0,00 ^d	101,25 ± 58,61 ^{de}	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.
POV	146,33 ± 8,82 ^{a-d}	5,40 ± 3,16 ^{e-g}	13,47 ± 6,25 ^{c-e}	7,93 ± 2,43 ^{b-e}	3,33 ± 2,59 ^{b-f}	0,00 ± 0,00 ^a	4,25 ± 2,16 ^b	449,83 ± 273,75 ^{bc}	98,00/12	39,00/15	0,49/20	2,40/17	1,00/9
Empanado													
POA	182,25 ± 17,02 ^a	14,75 ± 0,96 ^a	10,05 ± 1,42 ^e	9,4 ± 2,61 ^{a-d}	3,98 ± 2,72 ^{cd}	0,06 ± 0,13 ^a	1,20 ± 0,25 ^{cd}	424,00 ± 58,18 ^{bc}	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.
POV	165,80 ± 29,77 ^{a-c}	13,60 ± 4,50 ^{ab}	9,58 ± 1,54 ^e	7,28 ± 2,80 ^{b-e}	1,75 ± 1,24 ^{e-f}	0,00 ± 0,00 ^a	3,96 ± 2,20 ^b	427,40 ± 91,15 ^{bc}	s.i.	s.i.	0,38/16	1,49/11	s.i.
Frango													
POA	87,13 ± 8,59 ^f	0,00 ± 0,00 ^h	18,00 ± 2,45 ^b	1,71 ± 1,38 ^f	0,64 ± 0,63 ^{d-f}	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^d	41,36 ± 6,20 ^e	s.i.	s.i.	s.i.	0,97/7	s.i.
POV	110,75 ± 19,40 ^{d-f}	3,15 ± 1,77 ^{f-h}	14,70 ± 3,68 ^{b-d}	4,35 ± 3,14 ^{ef}	0,98 ± 1,49 ^{d-f}	0,00 ± 0,00 ^a	2,90 ± 0,77 ^{bc}	455,50 ± 121,29 ^{bc}	80,00/10	32,00/13	0,58/24	1,80/13	0,98/9
Hambúrguer													
POA	171,57 ± 18,46 ^{ab}	1,76 ± 0,50 ^{gh}	12,86 ± 0,90 ^{c-e}	11,99 ± 2,03 ^{ab}	5,21 ± 1,78 ^b	0,11 ± 0,17 ^a	0,29 ± 0,37 ^d	583,57 ± 145,72 ^{ab}	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.
POV	159,18 ± 34,34 ^{a-c}	6,36 ± 2,97 ^{d-f}	11,41 ± 2,46 ^{de}	9,75 ± 3,66 ^{a-d}	3,73 ± 2,35 ^{d-f}	0,00 ± 0,00 ^a	3,53 ± 1,47 ^b	456,10 ± 177,15 ^{bc}	104,00/13	43,60/15	0,70/29	2,70/19	1,26/11
Kibe													
POA	149,48 ± 20,40 ^{a-d}	7,48 ± 2,62 ^{c-e}	10,38 ± 1,13 ^{de}	8,39 ± 3,40 ^{b-e}	3,84 ± 1,77 ^{de}	0,10 ± 0,22 ^a	1,20 ± 0,76 ^{cd}	556,28 ± 189,13 ^{a-c}	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.
POV	128,00 ± 22,14 ^{c-f}	10,70 ± 2,82 ^{bc}	9,25 ± 0,53 ^e	5,50 ± 2,35 ^{c-f}	1,20 ± 1,13 ^{def}	0,00 ± 0,00 ^a	3,28 ± 0,87 ^b	457,75 ± 76,65 ^{bc}	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.
Salsicha													
POA	170,17 ± 27,14 ^{ab}	2,67 ± 1,01 ^{f-h}	10,27 ± 0,59 ^c	13,33 ± 3,08 ^a	4,55 ± 1,73 ^{bc}	0,67 ± 0,16 ^a	0,32 ± 0,78 ^d	785,67 ± 103,25 ^a	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.
POV	146,00 ± 21,07 ^{a-d}	9,93 ± 2,69 ^{cd}	15,93 ± 4,56 ^{bc}	4,90 ± 0,44 ^{d-f}	0,58 ± 0,20 ^{ef}	0,00 ± 0,00 ^a	3,93 ± 0,12 ^b	580,33 ± 598,89 ^{ab}	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.	s.i.

Letras diferentes na mesma coluna, indicam presença de diferença significativa, ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste Duncan
 Legenda: CHO – carboidratos; PTN – proteínas; G – gordura; sat: saturada; Vit – vitamina; s.i. – sem informação na embalagem

Dentre os alimentos analisados, o POA empanado foi o que obteve maiores valores de carboidratos, não diferindo ($p > 0,05$) apenas do empanado POV, mostrando similaridade entre o produto com mesma denominação de venda, mas sendo um de origem vegetal e outro animal. O alto teor de carboidratos em ambos está associado à incorporação das farinhas e açúcares. Em contrapartida, os alimentos com menor grau de processamento (atum POA, carne moída POA e frango POA) não apresentaram, como esperado, carboidratos em sua composição, e o frango POA foi o alimento com menor densidade calórica, não diferindo ($p > 0,05$) do atum POA, frango e kibe POV.

O atum POA foi o alimento com maior destaque ($p \leq 0,05$) em proteínas, possuindo 22 g, o que corresponde a 44% das necessidades diárias de acordo com o Valor Diário de Referência (VDR)¹⁰. Além disso, apresentou menor ($p \leq 0,05$) teor de gordura total em comparação ao atum POV. Por outro lado, em relação ao teor de gorduras saturadas, eles não se diferiram estatisticamente ($p > 0,05$).

A salsicha, quando comparado o POA com POV, se diferiu ($p \leq 0,05$) apenas no teor de carboidratos, gordura total e saturada e fibras. Chama a atenção o elevado teor de sódio de ambas, representando mais de 25% do VDR¹⁰.

A carne moída POA, apesar da ausência de carboidratos e baixo teor de sódio, especialmente em relação à carne moída POV, apresentou o maior teor ($p \leq 0,05$) de gordura saturada em sua composição (51,3% em relação a VDR¹⁰).

Em relação ao teor de fibras, os alimentos POV tiveram destaque, sendo que o atum vegetal foi o que apresentou maior percentual ($p \leq 0,05$). As carnes *in natura* não possuem fibras dietéticas em sua composição; no entanto, o atum POA obteve um pequeno percentual devido à adição de extratos vegetais entre seus ingredientes. O consumo de fibras está associado a diversos benefícios à saúde humana, dentre eles pode-se destacar: o aumento da saciedade; o aumento da viscosidade e volume do bolo fecal, o que auxilia na velocidade do trânsito intestinal; redução do risco de desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis; redução da pressão arterial; controle da glicemia em pacientes com diabetes; redução do peso corporal e melhora do sistema imunológico¹⁴. A recomendação de fibras, de acordo com a Ingestão Diária Recomendada (IDR) para maiores de 19 anos, é de 25 g a cada 2000 kcal ingerida¹³. Dessa forma, o atum POV, que possui 14 g de fibras em 80 g de produto, atingiu 70% dessa recomendação¹⁰.

Apesar de os teores de gordura *trans* não terem apresentado diferença estatística ($p > 0,05$) entre os produtos, devido aos valores encontrados serem baixos, observa-se que numericamente, a presença está concentrada nos alimentos de origem animal. Os ácidos graxos *trans* podem estar presentes naturalmente em alimentos originários de animais ruminantes ou ser produzidos industrialmente por meio da hidrogenação parcial de óleos vegetais. Esse processo fornece propriedades físicas e químicas de interesse industrial, pois a partir dele os produtos passam a ter um ponto de fusão maior, permanecendo sólidos em temperatura ambiente, tornando-os mais consistentes e estáveis¹⁵. Apresentaram gordura *trans* em sua composição, a carne moída e os produtos cárneos ultraprocessados bovinos: quibe, almôndega e hambúrguer, além do empanado e da salsicha. O alto consumo de ácidos graxos *trans* produzidos industrialmente vem sendo associado

ao risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, e em resposta a essa descoberta, diversos países promulgaram leis a fim de restringir ou proibir por completo a incorporação de gordura *trans* em produtos alimentícios. No Brasil, entrou em vigor em outubro de 2022 a Resolução RDC nº 429/2020¹⁰, que dispõe sobre a rotulagem nutricional dos alimentos embalados, e a Instrução Normativa – IN nº 75/2020¹³, que estabelece os requisitos técnicos para declaração da rotulagem nutricional desses alimentos. De acordo com as novas normas, a gordura *trans*, que até então não tinha um VDR definido, passa a ter um limite de 2 g, o que equivale a 0,9% do valor energético diário. Tal mudança está em consonância com as recomendações da Organização Mundial da Saúde de como seguir uma dieta saudável, em que se estabelece que o consumo de gordura *trans* seja menor que 1% do valor energético diário. No entanto, vale ressaltar que essa recomendação é para as gorduras *trans* presentes naturalmente nos alimentos, as produzidas industrialmente não fazem parte de uma dieta saudável e devem ser evitadas.

Alguns produtos avaliados declararam o teor de vitaminas e minerais em suas tabelas nutricionais (**Tabela 2**). Os valores médios encontrados nas tabelas nutricionais dos produtos correspondem de 9 a 30% em relação aos VDR constantes na legislação vigente – IN nº 75/2020¹³.

Apenas 2 POA (frango e atum) apresentaram em suas tabelas nutricionais os teores de ferro, enquanto 5 POV (empanado, hambúrguer, almôndega e carne moída) apresentaram, além do ferro, vitamina A, B9, B12 e zinco.

Os POV apresentaram médias superiores de ferro em relação ao frango e atum POA, pois além do ferro já presente nos alimentos, houve também a adição em todos os produtos. Vale ressaltar que as fontes vegetais de ferro (não-heme) são menos biodisponíveis do que as fontes de origem animal (ferro-heme). Além disso, fitato, proteína de soja e polifenóis/taninos podem diminuir ainda mais a absorção de ferro. Portanto, recomenda-se que a ingestão desse micronutriente entre os adeptos às dietas *plant-based* seja maior e/ou associada aos alimentos fontes de compostos redutores, como a vitamina C¹¹.

Em relação à denominação de venda dos produtos, no Brasil o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é o responsável pelos Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade (RTIQ) dos Produtos de Origem Animal. No entanto, até o momento não existe legislação acerca da denominação de venda e padrões de identidade e qualidade (PIQ) que abranja produtos vegetais que objetivem substituir produtos cárneos. Esse fato pode ser prejudicial para o consumidor, pois não especifica quais ingredientes podem ser utilizados, nem a quantidade específica de nutrientes que eles devem apresentar nos produtos.

CONCLUSÃO

De forma geral, os produtos vegetais análogos quando comparados aos produtos cárneos, não apresentaram diferenças estatísticas ($p > 0,05$) quanto ao valor calórico, proteínas, gordura total, gordura saturada e sódio. Se sobressaindo apenas no maior teor de carboidratos e fibras e em não possuir gorduras *trans* em sua composição. Ainda, em análise individual, para muitos produtos POA quando comparados com seus respectivos POV, as diferenças foram ausentes ou mínimas.

Nesse sentido, se não há restrições para o consumidor, seja por questões de saúde, cultura ou hábito, a substituição de POA por POV não se faz nutricionalmente tão superior. Ainda, ressalta-se que, ambos devem ser feito com moderação, visto que são considerados alimentos ultraprocessados.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

FINANCIAMENTO

Não declarado pelos autores.

AGRADECIMENTO

Não declarado pelos autores.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Rosana Ribeiro Christ: execução de todas as etapas do projeto de planejamento, busca e levantamento das embalagens nos supermercados, análises dos dados e redação do artigo científico. Christiane Mileib Vasconcelos: coordenação das etapas de planejamento, execução, análises dos dados e redação do artigo científico. Todos os autores foram responsáveis pela aprovação do documento final.

REFERÊNCIAS

1. Poti JM, Braga B, Qin B. Ultra-processed food intake and obesity: what really matters for health-processing or nutrient content? *Curr Obes Rep.* 2017;6(4):420-31.
<https://doi.org/10.1007/s13679-017-0285-4>
2. Soares KMP, Silva JBA, Góis VA. Parâmetros de qualidade de carnes e produtos cárneos: uma revisão. *Hig Aliment.* 2017;31(268-269):87-94.
3. Atos do Poder Executivo (BR). Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. *Diário Oficial da União.* Brasília, DF, 30 mar 2017. Seção 1(62):3-27.
4. Wolk A. Potential health hazards of eating red meat. *J Intern Med.* 2017;281(2):106-22.
<https://doi.org/10.1111/joim.12543>
5. Gibbs J, Cappuccio FP. Plant-based dietary patterns for human and planetary health. *Nutrients.* 2022;14:1614.
<https://doi.org/10.3390/nu14081614>
6. Trautwein EA, McKay S. The role of specific Components of a plant-based diet in management of dyslipidemia and the impact on cardiovascular risk. *Nutrients.* 2020;12(9):2671.
<https://doi.org/10.3390/nu12092671>

7. Hemler EC, Hu FB. Plant-based diets for personal, population, and planetary health. *Adv Nutr.* 2019;10(Supplement 4):S275S-S283.
<https://doi.org/10.1093/advances/nmy117>
8. Lynch H, Johnston C, Wharton C. Plant-based diets: considerations for environmental impact, protein quality, and exercise performance. *Nutrients.* 2018;10(12):1841.
<https://doi.org/10.3390/nu10121841>
9. Gehring J, Touvier M, Baudry J, Julia C, Buscail C, Srouf B et al. Consumption of ultra-processed foods by pesco-vegetarians, vegetarians, and vegans: associations with duration and age at diet initiation. *J Nutr.* 2021;151(1):120-31.
<https://doi.org/10.1093/jn/nxaa196>
10. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada – RDC nº 429, de 8 de outubro de 2020. Dispõe sobre rotulagem nutricional dos alimentos embalados. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 9 out 2020. Seção 1(195):106-10.
11. Alcorta A, Porta A, Tárrega A, Alvarez MD, Vaquero MP. Foods for plant-based diets: challenges and innovations. *Foods.* 2021;10(2):293.
<https://doi.org/10.3390/foods10020293>
12. Hurrell RF. Influence of vegetable protein sources on trace element and mineral bioavailability. *J Nutr.* 2003;133(9):2973S-2977S.
<https://doi.org/10.1093/jn/133.9.2973S>
13. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa – IN nº 75, de 8 de outubro de 2020. Estabelece os requisitos técnicos para declaração da rotulagem nutricional nos alimentos embalados. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 9 out 2020. Seção 1(195):113-24.
14. Bernaud FSR, Rodrigues TC. Fibra alimentar: ingestão adequada e efeitos sobre a saúde do metabolismo. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2013;57(6):397-405.
<https://doi.org/10.1590/S0004-27302013000600001>
15. Chopra S, Arora C, Malhotra A, Khurana SC. Industrially produced trans fat: usage, health implications, global and indian regulations. *Indian J Public Health.* 2021;65(1):71-5.
https://doi.org/10.4103/ijph.IJPH_851_20





AGRADECIMENTOS

O Corpo Editorial da Revista do Instituto Adolfo Lutz (RIAL) expressa seu reconhecimento e agradece a valiosa colaboração a todos os relatores abaixo relacionados que, com seu trabalho voluntário, contribuíram substancialmente na evolução das atividades de avaliação dos manuscritos, e consequente elevação do nível científico dos artigos publicados ao longo de 2023.

- **Adriane Elisabete Antunes de Moraes** Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas, Laboratório de Lácteos, Probióticos e Prebióticos. Campinas, SP
- **Aline Tiecher** Universidade Federal do Pampa. Itaqui, RS
- **Ana Lúcia de Magalhães Fittipaldi** Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, RJ
- **Anderson Fernandes de Carvalho** Instituto de Pesquisa e Ensino em Saúde de São Paulo. São Paulo, SP
- **Antônio Diogo Silva Vieira** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Alimentação e Nutrição Experimental, Laboratório de Microbiologia Alimentar. São Paulo, SP
- **Aparecida Erica Bighetti** Centro Universitário Padre Anchieta, Curso de Farmácia. Jundiaí, SP
- **Carla da Silva Carneiro** Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Farmácia, Departamento de Produtos Naturais e Alimentos. Rio de Janeiro, RJ
- **Carlos Alberto Martins Cordeiro** Universidade Federal do Pará, Faculdade de Engenharia de Pesca. Bragança, PA
- **Cyro Alves de Brito** Instituto Adolfo Lutz, Divisão Técnica de Biologia Médica, Centro de Imunologia. São Paulo, SP
- **Fabiana Martins de Paula** Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo, SP
- **Fernanda Barbosa Borges Jardim** Instituto Federal do Triângulo Mineiro. Uberaba, MG
- **Fernanda Fernandes Farias** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes, Núcleo de Ensaio Físicos e Químicos em Cosméticos e Saneantes. São Paulo, SP
- **Flávia Virgínia Fonseca** Instituto Butantan, Laboratório de Coleções Zoológicas. São Paulo, SP
- **Helena Hilomi Taniguchi** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Parasitologia e Micologia, Núcleo de Parasitoses Sistêmicas. São Paulo, SP
- **Hudson Alves Pinto** Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia. Belo Horizonte, MG
- **Jacqueline Tanury Macruz Peresi** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Laboratório Regional de São José do Rio Preto, Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas. São José do Rio Preto, SP
- **Jasilaine Andrade Passos** Universidade Federal da Bahia. Escola de Nutrição. Salvador, BA
- **Juliana Ruiz Fernandes** Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina. São Paulo, SP
- **Karina Correia da Silveira** Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Nutrição. Recife, PE
- **Luana Gimenez Lopes Budeanu** Centro de Vigilância Sanitária do Estado de São Paulo. São Paulo, SP
- **Marcelo Andreetta Corral** Faculdade de Engenharia de Sorocaba, Departamento Biomedicina. Sorocaba, SP
- **Mariana Cavalheiro Magri** Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Instituto de Medicina Tropical, Laboratório de Investigação Médica em Hepatologia. São Paulo, SP



- **Mário Mendes Bonci** Universidade de São Paulo. São Paulo, SP
- **Michele Soares Gomes Gouvêa** Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Instituto de Medicina Tropical, Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical. São Paulo, SP
- **Pedro Luiz Silva Pinto** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Parasitologia e Micologia, Núcleo de Enteroparasitas. São Paulo, SP
- **Raquel Martino Bemfeito Carvalho** Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais, Departamento Ciências Agrárias. Bambuí, MG
- **Rosana Goldbeck** Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas, SP
- **Rosana Puccia** Universidade Federal de São Paulo, Disciplina de Biologia Celular, Departamento de Microbiologia Imunobiologia e Parasitologia. São Paulo, SP
- **Rosimar Neris Martins Feitosa** Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas. Belém, PA
- **Rúbia Yuri Tomita** Instituto de Pesca, Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio do Pescado Marinho. Santos, SP
- **Taís Rondello Bonatti** Universidade Paulista. Campinas, SP
- **Terezinha de Jesus Andreoli Pinto** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia. São Paulo, SP
- **Tiago Alexandre Cocio** Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto, SP
- **Valéria Adriana Pereira Martins** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes, Núcleo de Ensaio Físicos e Químicos em Medicamentos. São Paulo, SP

Colaborações especiais dos pesquisadores científicos do Instituto Adolfo Lutz na execução das atribuições:

Revisão do inglês

- **Leonardo José Tadeu Araújo** Centro de Patologia, Núcleo de Patologia Quantitativa. São Paulo, SP

Revisão ortográfica e pré-diagramação

- **Márcia Liane Buzzo** Centro de Contaminantes, Núcleo de Contaminantes Inorgânicos. São Paulo, SP



Secretaria de
Saúde



SÃO PAULO
GOVERNO DO ESTADO

ISSN 0073-9855



9770073985009